

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

جامعة محمد بوقرة بومرداس



Faculté des sciences

Département de Biologie

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER II

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologies et Pathologies Moléculaires

THEME

L'effet de Thiabendazole et du thé vert sur le foie de *Rattus norvegicus*. Dosage plasmatique de la phosphatase alcaline, du calcium et du fer.

Présenté par :

Mme Bakhti Souad et Mme Brahmi Souhila

Déposé le : 16/10/2020

Le jury composé de :

- | | | |
|--------------------|---------------------|--------------|
| ▪ Mme LECHEKHAB Y. | MCB (FS/UMBB) | Présidente |
| ▪ Mme HAROUN N. | MCB (FS/UMBB) | Examinatrice |
| ▪ M. HAMDIS N. | MCB (FSNVST/UAM OB) | Promoteur |

Année universitaire
2019-2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Nous adressons aussi nos remerciements à notre promoteur Mr **Hamdis N** Maitre-assistant à l'université de Bouira pour avoir encadré et dirigé ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui nous honorent en évaluant ce travail :

A Madame **LECHEKHAB Y**, qui a aimablement accepté de faire partie de ce jury et d'adopter une réflexion critique à ce travail. Que ce travail lui témoigne de notre profonde gratitude.

A Madame **HAROUN N**, qui nous honore de sa participation à l'évaluation de ce modeste travail en apportant une vision de spécialiste. Que ce travail lui témoigne de notre profonde gratitude.

Nos remerciements les plus sincères vont à Monsieur **MESSAOUDENE J.**, chef du département de biologie et chef de la spécialité Biotechnologie et Photologies Moléculaires ainsi qu'à l'ensemble du personnel pédagogique, technique et administratif du département de Biologie de l'Université **M'HAMED BOUGARA** de **BOUMERDES**.

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a dotée d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui :

A vous mes chers parents Abdou et Kaknou qui m'ont dirigé, soutenus et aidés tout au long de ma vie et de mes études.

A vous mes chers frères Kamal et Mohamed, qui m'ont soutenu moralement et financièrement.

A vous mes petits frères Yahya et Siradj.

A vous mes adorables sœurs Nacira et Fatma Zohra qui m'ont réconforté de mener à bien mon travail.

A tout ma famille spécialement :Kaltoum, Mayada, Bagha, bella, Rahma, Fatma, Hayat.

A vous mes chers adorables amies qui m'ont accompagné tout au long de mes études universitaires et qui m'ont soutenu et partagé le doux et l'amertume avec moi : Souad, Siham, Manal, Hassna, Ouahiba, Nedjwa, Nafissa, Safa, Zohra, Maram, Biba, Houda, Ilham, Aziza, Maroua, Khadija, Halima, Saadia.

A mes amies de la promo BPM2020 spécialement Souhila, Sara, Sabrina et Meriem.

A toi mon amie spéciale, qui m'a soutenu et m'a donné de l'énergie positive et de l'optimisme.

A tous ceux qui m'ont soutu depuis le début.

BAKHTI SOUAD



Dédicace

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affectio me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma grand-mère, ma belle mère, mon beau père, mon frère et mes sœurs, puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A toi AZIZ qui m'a accompagné et aidé tout au long de mes études universitaires, qui m'a soutenu et m'a donné de l'énergie positive et de l'optimisme.

A vous spécialement Souad, Sara et Sabrina, Wissem et Wieme. Je vous aime de fond de mon cœur.

A mes amies de la promo BPM2020, et à tous ceux qui m'a soutien depuis le début.

BRAHMI Souhila

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01
Rappels bibliographiques	
I. Thiabendazole.....	02
I.1 Définition.....	02
I-2 Structure chimique du thiabendazole.....	02
I-3 Mécanisme d'action.....	03
I-4 La pharmacocinétique.....	03
I.5 Toxicité du thiabendazole.....	04
I. 5.1. L'apoptose.....	04
I. 5.2. L'hepatotoxicité.....	05
I. 5.3. La néphrotoxicité.....	05
II. Stress oxydatif.....	06
II.1. Définition.....	06
II.2. les radicaux libres	07
II. 2. 1. les sources des radicaux libres.....	08
II. 2. 1. 1. Les sources endogènes.....	09
II. 2. 1. 2. Les sources exogènes.....	11
II. 2. 2. Les Cibles des radicaux libre.....	11
II.3. Les anti-oxydants.....	14
II. 3.1. Anti-oxydants enzymatiques.....	14
II. 3. 2. Anti-oxydants non enzymatiques.....	15
II. 3.3. Les risques des antioxydants.....	17
II. 4. Signalisation cellulaire et le stress oxydant.....	17
II. 5. Pathologies liées au stress oxydatif.....	19
II.5. 1. L'athérosclérose	19

II.5. 2. Inflammation.....	19
II. 5. 3. Les maladies neurodégénératives.....	20
II. 6. Le Thiabendazole et le stress oxydant.....	20
III. La phosphatase alcaline (PAL) , le fer et le calcium.....	21
III.1. La phosphatase alcalin.....	21
III.2. Le fer	22
III.3. le calcium	22
IV. Le thé vert	
IV. 1. Description botanique.....	24
IV. 2. Classification.....	25
IV. 3. Composition chimique du thé vert.....	25
IV. 4. Thé vert et santé.....	26
Matériels et méthodes	
I. Matériels biologiques.....	28
II. Matériels non biologiques.....	30
III. Techniques analytiques.....	32
IV. Analyses statistiques.....	33
Résultats	
I. Les résultats des dosages du paramètre enzymatique	35
Discussions	
Discussion.....	38
Conclusion et perspectives	
Conclusion et perspective.....	41
Annexes	
Références bibliographiques	

Liste des figures

Numéro de la Figure	Titre de figure	Page
Figure 01	Structure chimique du thiabendazole.	02
Figure 02	les métabolismes de la Tbz chez les souris.	03
Figure 03	Schéma récapitulatif des vois d'activation d'apoptose par le Tbz.	05
Figure 04	Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.	06
Figure 05	Origine des différents radicaux libres(ROS) impliqués en biologie.	08
Figure 06	Le transport électronique à travers la chaine respiratoire mitochondriale et la production des ROS.	09
Figure 07	Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation ».	13
Figure 08	L'activation de Nrf2	18
Figure 09	Mecanisme d'hapatotoxicité du TBZ	21
Figure 10	<i>Camellia sinensis</i>	24
Figure 11	<i>Rattus norvegicus</i>	28
Figure 12	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	31
Figure 13	structure de la plaque.	32
Figure 14	Evaluation du taux de PAL plasmatique chez les <i>Rattus norvegicus</i> témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD).	34
Figure 15	Evaluation du taux de fer plasmatique chez les témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD) .	35
Figure 16	Evaluation du taux calcium chez les témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD.)	36

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre de tableau	Page
Tableau I	les espèces réactives radicalaire et non radicalaire.	07
Tableau II	Valeurs moyennes du taux de PAL plasmatique chez les <i>Rattus norvegicus</i> témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert(DT).	34
Tableau III	Valeurs moyennes du taux de Fer plasmatique chez les témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert(DT).	35
Tableau IV	Valeurs moyennes du taux de calcium plasmatique chez les témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert(DT).	36

Liste des abréviations

¹⁴C-Tbz : thiabendazole radioactif	DL₅₀ : Dose létale 50
¹O₂• : l'oxygène singulet	DSEO : dose sans effet observable
2H⁺ : ion d'hydrogéné	EC-SOD : Superoxyde dismutase extracellulaire
5OH-TBZ : 5-hydroxy thiabendazole	EGCG : épigallocatechine-3-gallate
8-OHdG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine	ERO : Espèces Réactives Oxydantes
ADN : Acide Déoxyribo Nucléique.	FADD : domaine de la mort associée au Fas
ADP : Adénosine-5'-DiPhosphate	FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide réduite
AMP : Adénosine monoPhosphate	Fe : le fer
AMPcyclique : Adénosine monophosphate cyclique	Fe⁺² : ions ferreux
Apaf-1 : facteur d'activation d'apoptose 1 (<i>Apoptosis activating factor-1</i>)	Fe⁺³ : Fer Ferrique ou Oxydé
ARE : éléments de réponse aux antioxydants	GPx : La glutathion peroxydase
ATP : Adénosine-5'-TriPhosphate	GPx1 : La glutathion peroxydase isoforme 1
BAX : BCL2 associé au X, régulateur d'apoptose (<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>)	GR : Glutathion Reductase
BCL2 : cellules lymphatique B (<i>B-cell lymphoma 2</i>)	GSH : Glutathion réduit
BPM : Bas poids moléculaire	GSSG : Glutathion oxydé
Ca⁺² : ion cuivre	GST : Glutathion S-transférase
CAT : catalase	H₂O : Eau
CoQ10 : Coenzyme Q10	H₂O₂• : le peroxyde d'hydrogène
COX : cyclo-oxygénases	HCl : acide chlorhydrique
Cu : cuivre	HO-1 : Hème Oxygénase-1
Cu/Zn SOD : cuivre /zinc superoxyde dismutase	ICAM : molécule d'Adhésion inter Cellular
Cul3 : Cullin 3	ICR : impression de la zone de contrôle (<i>imprinting control region</i>)
CYP1A2 : cytochrome P450 1 A2	IL6 : Interleukine 6
Cyt c : cytochrome c	Keap 1 :proteïn 1 associée aux ECH de type kelch (<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
	LDL : Lipoprotéines de Densité Légère
	Lox : lipo-oxygénases

MAF : Fibrosarcome musculoaponeurotique (*Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma*)

MCP-1 : Monocyte chimioattractant protéine-1

MDA : Malondialdéhyde

MMO : microsomal monooxygénase cytochrome P450-dépendant

Mn : manganèse

Mn-SOD : Super Oxyde Dismutase associé au Manganèse

NADH, H⁺ /NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit/oxydé

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH, H⁺ /NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphat réduit /oxydé

NF-κB : facteur nucléaire-κB (nuclear factor- κB)

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO• : monoxyde d'azote (Oxyde Nitrique)

NO₂• : Nitrique dioxyde

NO₃• : Leperoxynitrite

NOS : Nitric Oxyde Synthases

NOX : NADPH oxydase membranaire

NQO1 : NADPH Quinone Oxydoréductase 1

Nrf2 : Facteur 2 lié à NF-E2 (*NF-E2-related factor 2*)

O₂ : Oxygène

O₂•⁻ : anion superoxyde

O₃• : l'ozone

OH⁻ : Ion Hydroxyde

OH• : le radical hydroxyle

Se : le sélénium

SOD : Super Oxyde Dismutase

TBZ : thiabendazole

TFR1 : le récepteur de la transferrine 1

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α (*Tumor necrosis Factor α*)

PAL : La phosphatase alcaline

PFG : produits finaux de glycosylation

PH : Potentiel d'Hydrogène

Pi : phosphate inorganique

PN : polynucléaires neutrophiles

RE : Le réticulum endoplasmique

RL : radicaux libre

RNS : les espèces réactive de l'azote (*Reactive Nitrogen Species*)

RONs : les espèces réactive de l'oxygène et de l'azote (*Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)

ROO• : Radical peroxyde

ROS : les espèces réactive de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)

VCAM : molécule d'adhésion de cellules vasculaires (*vascular cell adhesion molecule*)

VDAC : canaux anioniques dépendant de la tension (*Voltage Dependent Anion Channels*)

XDH /XOD : Xanthine deshydrogenase / xanthine oxidase

Zn : le zinc

Les unités

μM : micromole

Cm : centimètre

g/ mM : gramme /Mili mol

H : heures

Kg : kilogramme

Mg / kg p.c. : milligramme/kilogramme

Poids corporel

ml : millilitre

INTRODUCTION

Notre état de santé est menacé suite à l'exposition aux xénobiotiques notamment les médicaments qui sont métabolisés essentiellement par le foie (**lochiot et Grima, 2004**).

Lorsque la quantité ou la puissance des métabolites toxiques des médicaments dépasse les capacités métaboliques du foie, les cellules hépatiques sont attaquées et détruites (**lochiot et Grima, 2004**). Parmi les médicaments qui conduisent à des dommages hépatiques on sélectionne le thiabendazole qui est un antihelminthique de large spectre utilisé chez l'homme et l'animal. Il est utilisé aussi comme un fongicide poste récolte pour les fruits et comme un additif alimentaire. Le thiabendazole provoque l'hépatotoxicité en induisant la formation des radicaux libres (ROS) par la déplétion du glutathion rénal et hépatique (**Mizutani et al., 1990**).

Afin de limiter les effets délétères des ROS, l'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des radicaux libres (**Halliwell et Gutteridge, 1990**). Les molécules contrôlant cette production sont dites « antioxydantes ». Ce système de défense est renforcé par la prise de l'alimentation riche essentiellement par les polyphénols comme le thé vert (**Halliwell et Gutteridge, 1990**).

Dans ce contexte nous avons visé à élucider l'effet du thiabendazole sur le foie et d'étudier l'effet antioxydant de thé vert sur 4 lots des rats blancs *Rattus norvegicus*. Pour tous les lots nous avons dosé le taux plasmatique des phosphatases alcalines (PAL), le fer et le calcium.

Le mémoire est structuré en :

- Une introduction situant ce travail dans une thématique globale.
- Un rappel bibliographique définissant le thiabendazole et ces effets, le stress oxydatif, les antioxydants et le thé vert.
- Une partie matériels et méthodes.
- Une partie résultats et discussion.
- Une conclusion et perspective suivi par des références bibliographique et de l'annexe.

RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le thiabendazole

I. 1. Définition

Le thiabendazole (TBZ) est un agent antihelminthique et antifongique, largement utilisé pour traiter les infections fongiques et parasitaires chez les animaux et les humains (**Dubey et Sanyal, 2010**). C'est un composé benzimidazole qui sert également de fongicide poste récolte dans les fruits (les agrumes) et les légumes importés pendant le transport et le stockage.

Le TBZ est utilisé dans les maladies infectieuses et parasitaires en association avec l'amoxicilline-acide clavulanique, la céphalosporine, la pénicilline, la rifampicine, roxithromycine, la stavudine, les sulfamides, le ritonavir, la tétracycline (**Kim et al., 2006**). En outre, le TBZ est autorisé en tant qu'additif alimentaire dans l'Union européenne (**Groten et al., 2000 ; Stierum et al., 2008**) et au Japon (**Sugihara et al., 1997**).

I. 2. Structure chimique du thiabendazole

Le TBZ ou 2-(4-thiazolyl) benzimidazole est un dérivé du benzimidazole substitué en position 2 par un groupement thiazolyle (Figure 01). C'est une poudre blanche inodore modérément polaire, qui fond à 304 C°, de formule brute est C₁₀H₇N₃S avec un poids moléculaire de 201,1g/mol. Le TBZ est pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans les solvants organiques tels que le dichlorométhane et assez soluble dans le méthanol et les acides minéraux (10.0 g/l dans HCl à PH=2). Le TBZ est également stable au contact d'acide, de la lumière et de la chaleur (**Anon, 1997**).

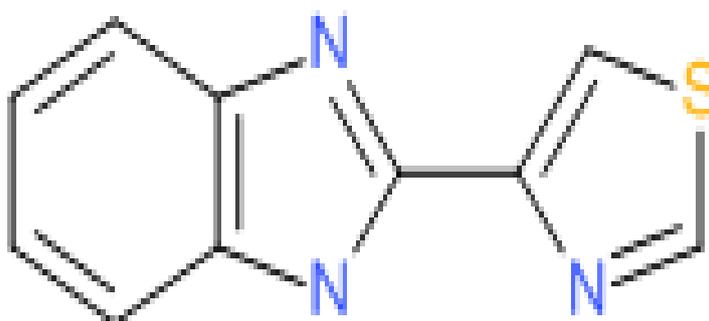


Figure 01 : Structure chimique du Thiabendazole (**Groh et al., 2012**)

I.3. Mécanisme d'action

Le benzimidazole provoque d'importantes modifications biochimiques chez les nématodes sensibles avec en particulier un blocage du métabolisme énergétique de la cellule par une inhibition de la fumarate-réductase mitochondriale, la réduction du transport du glucose et une atteinte de la phosphorylation oxydative. L'action principale réside en l'inhibition de l'assemblage des microtubules en se fixant à la β -tubuline entraînant une inhibition de la formation des microtubules. Ainsi, les transports intracellulaires sont interrompues, empêchant la division cellulaire, et provoquent des troubles de l'absorption des nutriments (15 à 24 heures après le début du traitement) pour le parasite (Bohand *et al.*, 2005).

I.4. La pharmacocinétique

L'administration orale de TBZ entraîne une absorption rapide par le tractus gastro-intestinal. Quand il est absorbé, il diffuse assez largement dans l'organisme, notamment dans les poumons (Craine, 1990). Il est métabolisé en 5-hydroxythiabendazole (5OH-TBZ) formé par hydroxylation du cycle aromatique catalysée par le CYP1A2, ces réactions sont complétées par des glucurono- et sulfoconjuguaisons. Le TBZ est éliminé à la fois par voie urinaire et biliaire sous forme des dérivés conjugués dans les 4 jours qui suivent l'administration (Tsuchiya *et al.*, 1987).

Après l'administration de thiabendazole radioactif, les concentrations plasmatiques maximales ont été trouvées 2 à 8 heures après le traitement et une moyenne de 85% de la dose est apparue dans les urines (61%) et les selles (24%) en 24 heures (Tocco *et al.*, 1996).

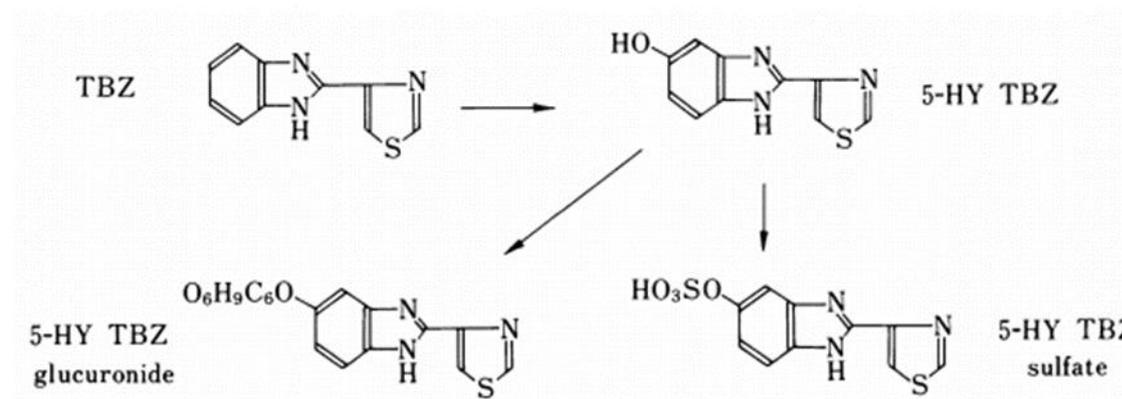


Figure 02 : Les métabolismes du TBZ chez la souris (Tsuchiya *et al.*, 1987).

I.5. La Toxicité du thiabendazole

L'utilisation thérapeutique du thiabendazole est limitée en raison de sa toxicité supérieure aux autres benzimidazolés (**Bohand et al., 2005**). Des effets toxiques de TBZ ont été trouvés chez l'homme (**Bion et al., 1995**) et les animaux (**Ogata et al., 1984**). D'après les études toxicologiques, la dose sans effet observé (DSEO) est de 10 mg/kg de poids corporel/jour (**EMA, 2004**). La dose quotidienne maximale recommandée de TBZ est de 3 g/jour pour les patients pesant 60 kg et la posologie habituelle de 50 mg/kg de poids corporel (**FDA, 2003**). La dose létale DL_{50} est égale à 1300 mg/kg.

Des effets secondaires souvent sont associés au TBZ : des troubles gastro-intestinaux, anorexie, diarrhée, nausée, vomissements, rash cutané, prurit, céphalée, asthénie, hyperglycémie, troubles de la vision des couleurs, leucopénie, bradycardie, troubles neurologiques (**Nicolas et al., 2006**).

Le TBZ peut induire aussi l'apoptose chez les hépatocytes, une toxicité hépatique et même un dysfonctionnement thyroïdien (**Fujitani et al., 1991**) et une puissante néphropathie entraînant de graves lésions rénales (**Mizutani et al., 1990**), c'est pourquoi il a été classé comme un cancérigène potentiel (**USEPA, 2002**). Le TBZ est contre-indiqué pour la femme enceinte et pendant l'allaitement à cause de leurs propriétés embryotoxiques et tératogènes (**Bohand et al., 2005**).

I. 5. 1. L'apoptose

Le Thiabendazole (à une dose 200-500 μ M) induit l'apoptose chez hépatocytes après 1h à 24h, entraînant la perte du potentiel de membrane mitochondriale, la libération du cytochrome c des mitochondries, la translocation du domaine de la mort associée au Fas (FADD) du cytosol vers les membranes et l'activation des caspases 3, 8 et 9. Ainsi, le thiabendazole va activer à la fois les voies mitochondriales et les récepteurs de la mort déclenchant l'apoptose (**Averill-Bates et al., 2015**).

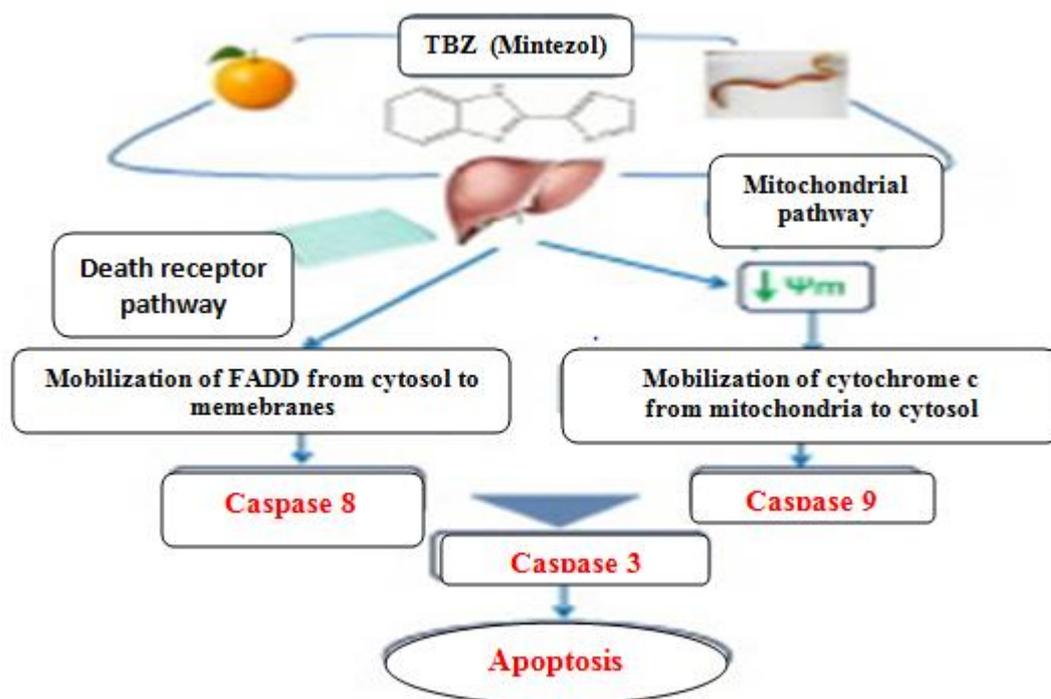


Figure 03 : Schéma récapitulatif des voies de l'activation de l'apoptose par le TBZ (Averill-Bates *et al.*, 2015).

I.5. 2. L'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité du Thiabendazole semble être due à une réaction immunologique au médicament chez l'humain, le Thiabendazole est métabolisé surtout par le foie, presque entièrement en composés inactifs excrétés principalement par les reins, mais aussi par la bile.

La plupart des cas ont signalés des lésions hépatiques induites par le thiabendazole étaient spontanément résolutifs, beaucoup étaient caractérisés par une cholestase sévère et prolongée.

Le début de la blessure survient généralement dans les 1 à 2 semaines suivant la fin d'un traitement de 1 à 5 jours. La lésion cholestatique peut être associée à des lésions des petits canaux biliaires et à une jaunisse prolongée et / ou un prurit et une élévation des phosphatases alcalines. Plusieurs cas de cholestase prolongée et de syndrome des voies biliaires de disparition chronique et de maladie hépatique en phase terminale ont été rapportés même après une dose unique de thiabendazole (Roy *et al.*, 1989).

I.5. 3. La néphrotoxicité

L'administration de TBZ (250 ou 500 mg / kg de poids corporel) pendant sept jours consécutifs chez les souris ICR a provoqué une polyurie et une augmentation du poids relatif

des reins (**Fujitani et al., 1999**). Histologiquement des lésions rénale et une dilatation des tubules rénaux a été observée chez les souris traitées (**Tada et al., 1989**). Il a été démontré aussi que le TBZ provoque une déplétion du glutathion rénal et hépatique *in vivo* suggérant la production de métabolites réactifs au cours de son métabolisme (**Mizutani et al., 1993**). L'observation au microscope électronique a mis en évidence des lésions glomérulaires telles que l'aplatissement des podocytes et des modifications œdémateuses du mésangium chez les souris traitées.

II. Le stress oxydatif

II.1. Définition

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, est un mécanisme physiopathologique qui résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (**Sergent et al., 2001**).

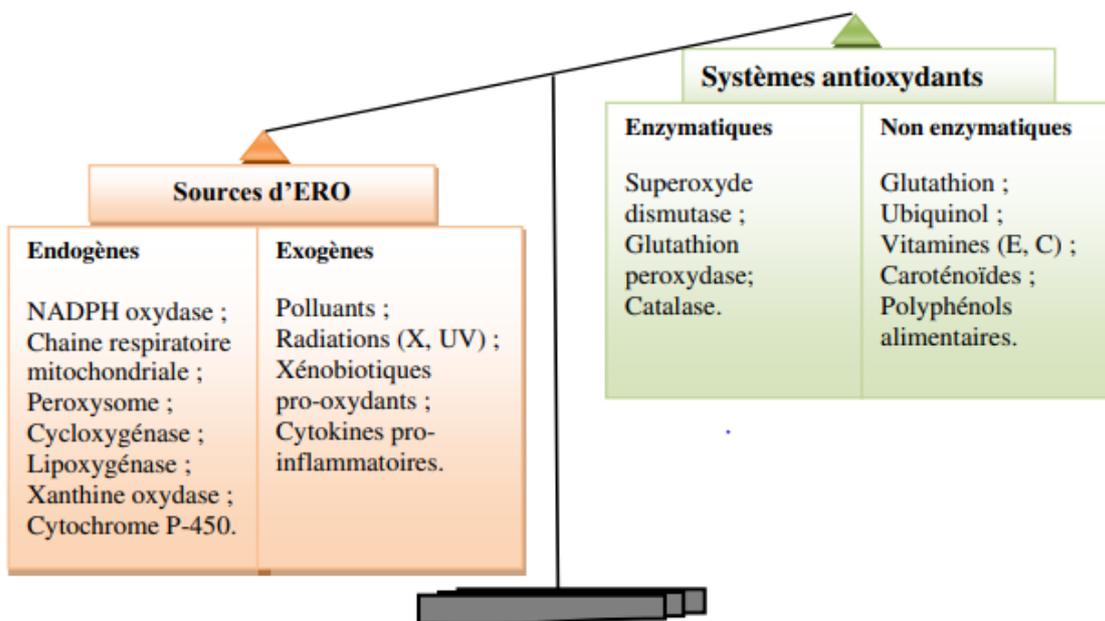


Figure 04 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (**Ghosh et Scheepns, 2009**).

II. 2. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule ou fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe, ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003 ; Finaud *et al.*, 2006**). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (**Goto *et al.*, 2008**).

Les radicaux libres sont divisés généralement en deux groupes, les espèces radicalaires (l'anion superoxyde, le radical hydroxyle...) et les espèces non radicalaires (l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène, le peroxydinitrite...) (**Yzydorkzyk., 2011**).

Tableau I: les espèces réactives radicalaire et non radicalaire (**Halliwell, 2007**).

Les radicaux libres	
Les ROS radicalaire	La Formule chimique
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyde	HOO^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Radical oxyde nitrique	NO^{\cdot}
Peroxydinitrite	$ONOO^{\cdot}$
Les ROS non radicalaires	Formule chimique
Hydroperoxyde	ROOH
Hypochlorite	ClOH
Ozone	O_3
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Dioxygène singulet	1O_2

Le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^{\cdot} sont encore appelés espèce réactive de l'oxygène (ROS) car, ces espèces sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. Toutefois, il existe d'autres ROS tels que les radicaux peroxydes ROO, hydro peroxydes ROOH ainsi que les radicaux alkoxyde RO, et des espèces réactives d'azote (RNS) tels que le NO, produit par le NO synthétase (**Mac Laren et al., 2007**).

Les espèces réactives azotées (RNS) ont été définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires et non radicalaires, que nous désignons par l'abréviation ROS (**Mac Laren et al., 2007**).

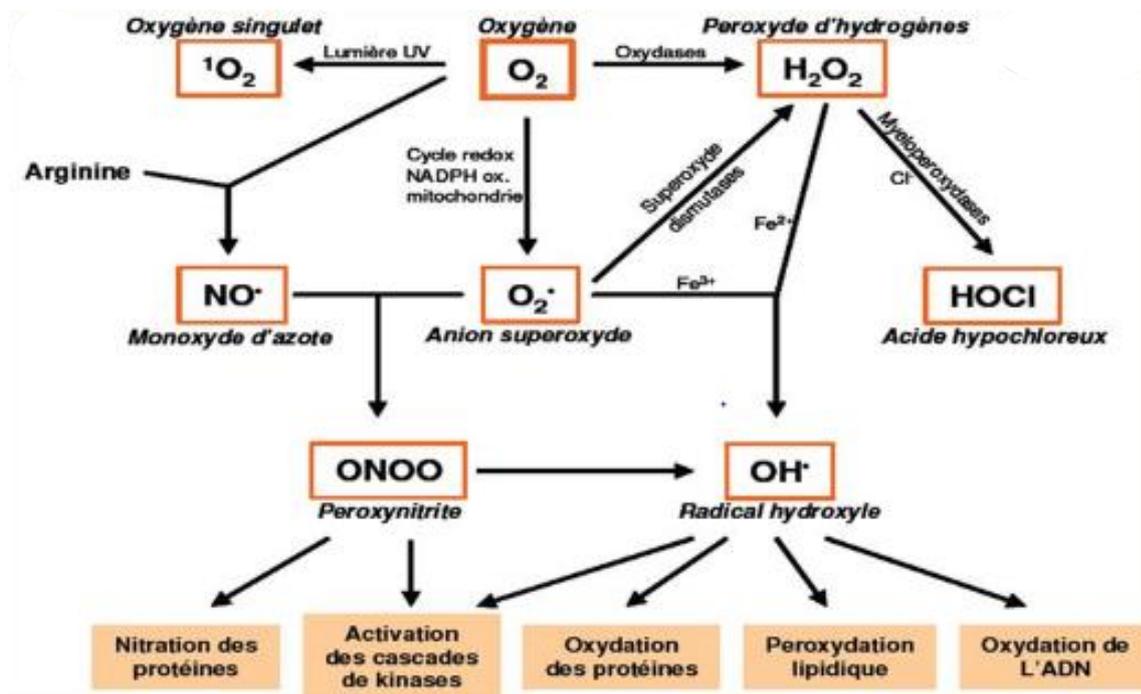


Figure 05 : Origine des différents radicaux libres (ROS) impliqués en biologie (**Favier, 2003**).

II. 2. 1. Les sources des radicaux libres

Les ROS sont générés à partir de sources endogènes et/ ou exogènes. De façon physiologique, les ROS existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables (**Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Sies, 1991**). Elles protègent, régulent la cellule

et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Les radicaux libres endogènes sont produits dans la chaîne respiratoire mitochondriale, des réaction immunitaires (phagocytose ; inflammation), la transduction des signaux cellulaires (prolifération des cellules musculaires lisses, l'apoptose, l'expression des gènes de défense, La vasodilatation) (**Gardès-Albert *et al.*, 2003**) et pendant l'exercice excessif. Il existe d'autres sources comme la libération du fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules, la cyclo-oxygénase et les lipoxygénases, ainsi que les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) (**Cai et Harrison, 2000**).

II. 2. 1. 1. Les sources endogènes

II. 2. 1. 1. 1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est considérée comme une source majeure des ROS. (**Mohammed *et al.*, 2015**), Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (**Balaban *et al.*, 2005**).

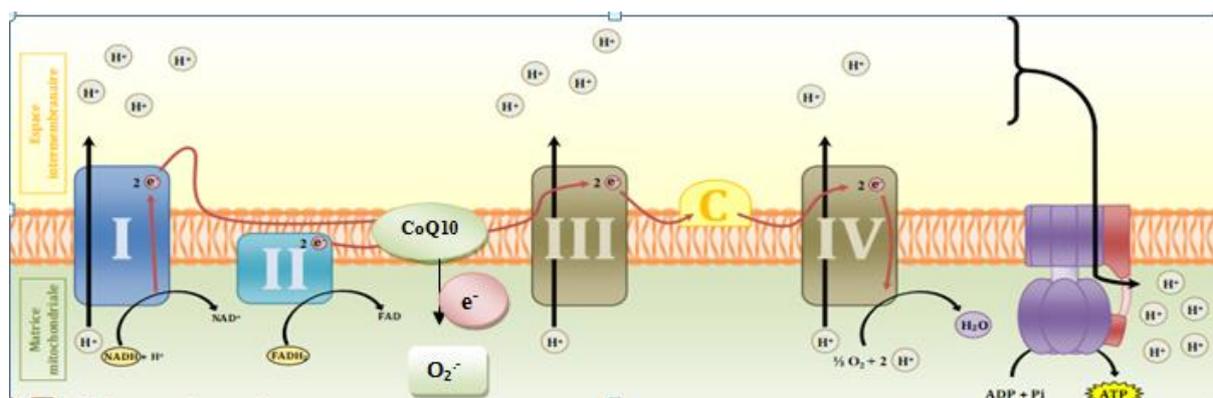


Figure 06: Le transport électronique à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la production des ROS.

Complexe I : NADH déshydrogénase, Complexe II : succinate déshydrogénase, Complexe III: Coenzyme Q-cytochrome C réductase, Complexe IV : Cytochrome C oxydase, CoQ10 : Coenzyme Q10. (**Li *et al.*, 2017**).

La membrane interne mitochondriale est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final qui est l'oxygène. Ces électrons proviennent des équivalents réduits NADH, H⁺ et FADH₂ issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides). A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire générant une force protonmotrice (**Mitchell, 2000**).

Les complexes I-IV sont localisés dans la membrane interne mitochondriale. Dans la chaîne respiratoire, si le complexe III ne peut pas recevoir des électrons de CoQ10, les électrons seraient acceptés par O_2 , qui pourrait produire les ROS et aboutir au stress oxydatif. (**Li et al., 2017**).

La production des ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace inter membranaire. L' $O_2^{\bullet-}$ généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par le superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD), l' H_2O_2 alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme.

L' $O_2^{\bullet-}$ produit dans l'espace intermembranaire est soit :

- Transformé par l'enzyme anti-oxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn SOD).
- Détoxifié par le cytochrome c.
- Transféré dans le cytoplasme via un canal voltage dépendant (VDAC : Voltage Dépendent Anion Channels), l' $O_2^{\bullet-}$ est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (**Han et al., 2003**).

II. 2. 1. 1. 2. Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires sont une autre source importante d'oxydants, elles libèrent des produits toxiques, qui incluent le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2^{\bullet}$) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). (**Baskaran et al., 2017**). Ces divers oxydants existent non seulement dans le phagocyte, mais sont aussi libérés dans le milieu extracellulaire où ils contribuent à la destruction microbienne de proximité. Inévitablement, ceci entraîne des lésions oxydatives des tissus environnants (**Deleo et al., 1999**). Afin de se protéger eux-mêmes contre l'oxydation, les phagocytes ont besoin de concentrations élevées en antioxydants car ceux-ci sont dégradés et doivent se renouveler rapidement au cours du stress oxydatif. La plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) via une activité NADPH oxydase membranaire (NOX), elle catalyse la réduction mono-électronique de l' O_2 en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (**Migdal et al., 2011**).

II. 2. 1. 1. 3. La vasodilatation

Le NO• est un agent vasodilatateur qui intervient dans la relaxation des muscles lisses. Au niveau cardiaque, il peut modifier la contraction cardiaque en modulant les flux calciques. Il intervient également dans les phénomènes de neurotransmission et les réactions inflammatoires en tant qu'agent cytotoxique. (Clémentine, 2013).

II. 2. 1. 1. 4. l'exercice excessif

Il est admis que l'exercice physique se caractérise par une augmentation du volume d'oxygène consommé. Ce volume élevé d'oxygène consommé va engendrer une augmentation concomitante de la production de radicaux libres (Sen, 1995). Ces derniers peuvent être générés en continu au cours du métabolisme normal de l'oxygène (O₂) *in vivo* (individu au repos) (Halliwell et Chirico, 1993) en très faible quantité, mais aussi en plus grande quantité pendant une consommation accrue d'oxygène consommé (individu à l'exercice) (Leeuwenburg et Heinecke, 2001). En effet, pendant un exercice très intense ou de longue durée, les ROS vont être produit de manière accrue par le système mitochondrial de transport des électrons (surtout au niveau musculaire), les cellules phagocytaires et les neutrophiles ou la voie de la xanthine oxydase. (Gauche et Hausswirth, 2006).

II. 2. 1. 2. Les sources exogènes

les ROS exogènes sont le résultat des sources environnementales comprennent les rayonnements ionisants, et les produits chimiques qui favorisent la formation des superoxydes tels que les herbicides, L'alimentation (comme l'alcool, café), pollution de l'air et de l'eau, la fumée de cigarette, de certains médicaments, et les solvants industriels (Hrycay *et al.*, 2015).

Les ions de métaux lourds, tels que le fer, le cuivre, le cadmium, Mercure, peuvent induire la génération de radicaux réactifs et provoquent des lésions cellulaires (Birben *et al.*, 2012).

II.2. 2. Les Cibles des radicaux libres

Les ROS réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cible les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les glucides (Beckman et Ames, 1998).

II. 2. 2. 1. Les acides nucléiques

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Ces attaques sont essentiellement causées par le HO^{*} (Cadet *et al.*, 2002).

Elles sont de différents types (Grandjean, 2005) :

- Modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN.
- Destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel.
- Destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule.
- Formation des pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (des aldéhydes mutagènes tel que le MDA, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine).

Ainsi nous constatons que ces dommages peuvent participer à une mutagénèse, à un arrêt des divisions cellulaires par blocage des mécanismes de réplication, à un arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription ou traduction, et enfin à une mort cellulaire.

II. 2. 2. 2. Les lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages.

II. 2. 2. 3. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des RNS. Les plus sensibles à son action sont les acides amines aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical OH^{*} s'additionne

et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine. (Franzini *et al.*, 1993).

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par OH^\bullet conduit à la formation de ponts disulfures et donc l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Le radical OH^\bullet est aussi capable de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Toutes ces modifications aboutissent à une désorganisation membranaire à l'origine du dysfonctionnement ou de la lyse cellulaire.

Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec l'apparition de groupements carbonyles, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes, ce pour ça La mise en évidence dans les milieux biologiques de l'oxydation des protéines par le radical OH^\bullet , se fait par la mesure des groupements carbonyles dont le nombre augmente. (Pasquier, 1995).

II. 2.2.4. l'oxydation des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation se fait en 2 mécanismes possibles (figure 07) (Halliwell et Gutteridge, 2007).

✓ Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles, de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG.

✓ Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ROS telles que HO^\bullet ou NO_3^\bullet pour former des PFG.

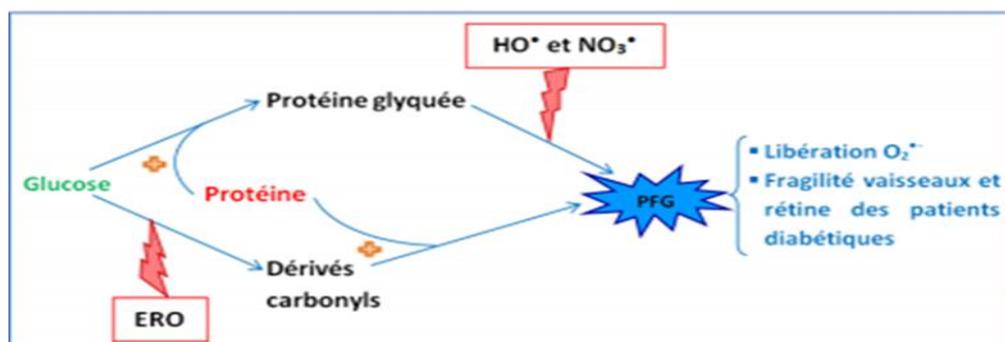


Figure 07 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation ».

Elle se fait Selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). Ces PFG sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d'O₂^{•-}, et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (**Grandjean, 2005**).

II. 3. Les anti-oxydant

Les antioxydants sont des substances qui retardent ou inhibent l'oxydation d'un substrat quand ils sont présents à faible concentration comparée à celle du substrat (**Mette, et al., 2001**). Ils ont pour rôle d'empêcher la formation de radicaux libres, de permettre leur élimination ou bien de réparer leurs dégâts. L'organisme dispose d'une large gamme d'antioxydants endogènes sous forme de systèmes enzymatiques, ou non enzymatiques (**Berger et al., 2001**).

II. 3.1. Anti-oxydants enzymatiques

II. 3.1.1. Les Superoxydes Dismutases (SOD)

Ce sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en deux produits : l'oxygène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène.



Elles sont présentées dans la majorité des organismes vivants et chez les eucaryotes, ce sont des enzymes ubiquitaires. Il existe plusieurs superoxydes dismutases (SOD) qui diffèrent par leur cofacteur (Manganèse, Cuivre ou Zinc), leur structure et leur localisation cellulaire : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (**Okado et Fridovich, 2001**).

II. 3.1.2. La glutathion peroxydase (GPx)

La GPx permet d'éliminer l'H₂O₂[•] en couplant sa réduction avec l'oxydation d'un substrat réducteur, le glutathion. Ainsi H₂O₂[•] est catalysé en H₂O tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). (**Zhang et al., 2008**). La GPx peut également catalyser d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique et qu'il en existe 5 isoformes de localisations tissulaires différentes. La plus abondante est l'BCL2(GPx1) présente au

niveau cytoplasmique et mitochondriale, et exprimée dans la plupart des cellules. (**Charlotte, 2012**).

II. 3. 1. 3. La catalase

La catalase est également responsable de l'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2^{\bullet}$ par une transformation en H_2O et O_2^{\bullet} . Contrairement à la GPX, l'affinité de la catalase pour l' $\text{H}_2\text{O}_2^{\bullet}$ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (**Mates *et al.*, 1999**).

II. 3. 2. Anti-oxydants non enzymatiques

II. 3. 2. 1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyglycine) ubiquitaire produit dans différents tissus où il est présent à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mM chez les mammifères (**Lu, 2013**). Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation de la vitamine E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' $\text{H}_2\text{O}_2^{\bullet}$ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Power et Lennon, 1999**).

II. 3. 2. 2. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes anti-oxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

II. 3. 2. 3. La vitamine C et E

La vitamine E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant.

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. (**Haleng *et al.*, 2007**).

La vitamine C ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant. Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ROS (superoxydes, hydroxyle, oxygène singulet, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH.

Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (**Duarte *et al.*, 2009**).

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Evans, 2000**).

II. 3. 2. 4. L'acide urique

L'acide urique est produit par oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. Au PH physiologique, il est majoritairement présent sous la forme ionisée (urate) pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire stable. Celle-ci est à son tour réduite par l'ascorbate régénérant l'urate. L'urate protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxydinitrite. Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique (**Whitman *et al.*, 2002**).

II. 3. 2. 5. La bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex : hémoglobine). Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux ROO^{*} et contre le H₂O₂^{*} (**Powers et Jackson, 2008**) et de piéger le ¹O₂, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Neuzil et Stocker, 1993**). Elle est alors transformée en biliverdine oxydée, qui sera recyclée grâce à la biliverdine réductase aux dépens d'une molécule de NADPH (**Liu, 2006**).

II. 3. 2. 6. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux constituent une famille importante d'antioxydants regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoides, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils réduisent les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices. Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, anti-athérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques,

antibactériens, antiviraux, anticancéreux, antiallergènes, vasodilatateurs (**Barbar Ali et al., 2007**).

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique, Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des anti-agrégant plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants (**Martim et Andriantsitohaina , 2002**).

II. 3. 3. Les risques des antioxydants

Un antioxydant peut devenir pro-oxydant et avoir l'effet contraire de celui escompté à partir du moment où la dose ingérée est trop importante, ainsi lors des suppléments, il ne faut pas dépasser les doses indiquées. Par exemple, La vitamine C est principalement antioxydant, mais en doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, elle peut exercer une action pro-oxydante à travers de son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réactions redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss. En augmentant la disponibilité du fer ferreux, la vitamine C pourrait favoriser les dommages causés à l'ADN (**Duarte et al., 2007**) et paradoxalement stimuler la réparation de l'ADN oxydé (**Duarte et al., 2009**). L'augmentation de l'acide urique peut aussi avoir des conséquences pro-oxydantes. (**Baillie et al., 2007**).

II. 4. Signalisation cellulaire et le stress oxydant

Différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation du stress oxydant seront décrits et plus particulièrement NF-E2-related factor 2 (Nrf2) en raison de son rôle prépondérant dans la régulation du système antioxydant.

II. 4. 1. Nrf2

Le rôle du facteur de transcription Nrf2 dans la protection de différents organes (le foie, le rein, l'estomac et le cerveau) et de cellules (macrophages, érythrocytes) vis-à-vis d'attaques toxiques est primordial.

II. 4. 1. 1. Activation de Nrf2

A l'état basal, le Nrf2 est inactif et présent dans le cytoplasme sous forme liée à Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) : Keap 1 se fixe via le domaine Neh2 de Nrf2. Keap 1 est également lié avec la Cullin 3 (Cul3) formant le complexe Cul3- Keap 1- ubiquitin E3 ligase. Nrf2 sous forme ubiquitinylée est dégradé par le protéasome. Une augmentation de la production des ROS induit un clivage Keap1/ Nrf2, ce dernier transloque alors sous sa forme

active dans le noyau où il s'hétérodimérise avec une protéine Maf. Une fois activé, Nrf2 se fixe sur les sites des éléments de réponse aux antioxydants (ARE) qui sont des séquences activatrices de la transcription de gènes intervenant dans le stress oxydant (**Cardozo *et al.*, 2013 ; Ma, 2013 ; Taguchi *et al.*, 2011**).

La fixation de Nrf2 sur ces sites localisés dans la région promotrice de nombreux gènes de détoxification, anti-oxydants (la GR, la CAT, la GPX, NQO1, HO-1), ou impliqués dans la dégradation protéique par le protéasome (**Kwak *et al.*, 2003**) et la prolifération cellulaire (**Malhotra *et al.*, 2010**), induit ainsi les différents systèmes de défense cellulaire (**Lee *et al.*, 2005 ; Taguchi *et al.*, 2011**).

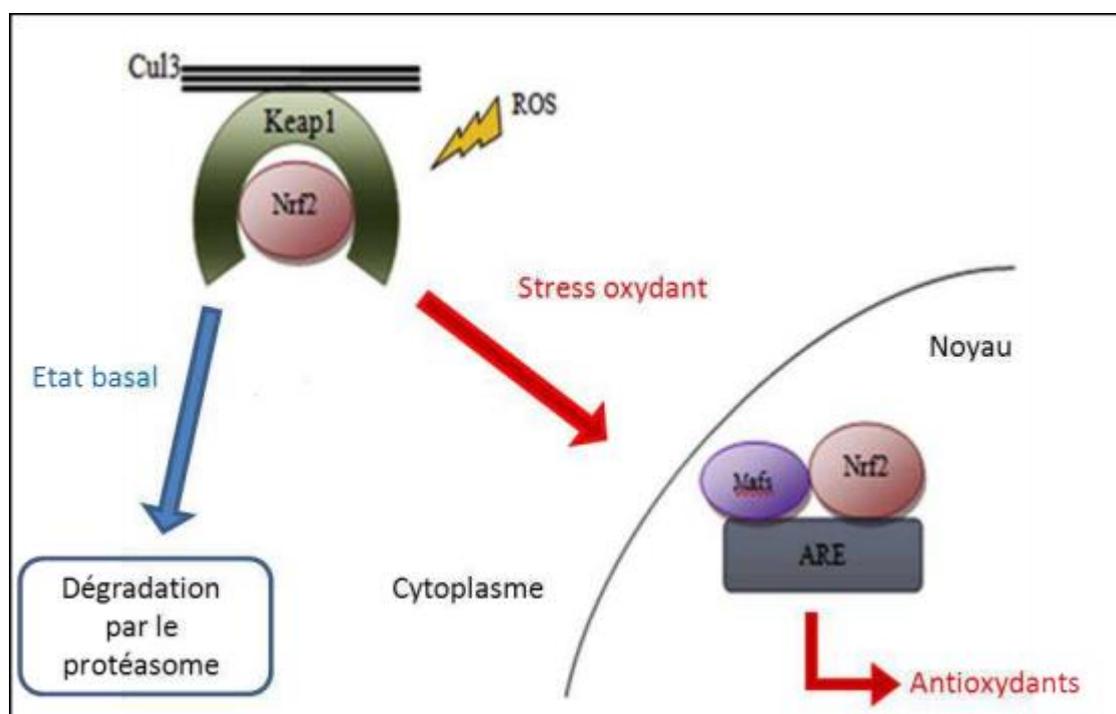


Figure 08 : L'activation de Nrf2, (modifier) (**Pedruzzi, 2012**).

II. 4. 2. Facteurs de transcription

II. 4. 2 .1. Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)

La famille NF- κ B comprend chez les vertébrés cinq facteurs de transcription : NF- κ B1, NF κ B2, c-Rel, RelA et RelB. Cet ensemble de facteurs de transcription étant activé notamment par des ROS, il est considéré comme un « sensor » du stress oxydant (**Storz *et al.*, 2003**). NF- κ B induit entre autres la translocation de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD, NQO1, HO-1 et agents de l'inflammation dont l'interleukine 6 (IL-6) et le Tumor necrosis Factor α (TNF α) (**Pahl, 1999**).

II. 4. 2. 2. P53

La P53 est un facteur de transcription qui est activé suite à des stimuli de stress cellulaire. Il peut se fixer dans la région promotrice de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence (**Levine *et al.*, 2009**). P₅₃ induit la transcription de Bax, enzyme pro-apoptotique, entraînant alors une augmentation de la perméabilité mitochondriale libérant le cytochrome c dans le cytoplasme. Le relargage du cytochrome c constitue le point départ de la voie intrinsèque de l'apoptose qui aboutira à l'activation des capsases. En cas de faible quantité des ROS, P₅₃ a une activité anti-oxydante en induisant notamment la GPX, alors qu'en cas d'excès des ROS, il aura un effet pro-oxydant (**Bensaad *et al.*, 2005**).

II. 5. Pathologies liées au stress oxydatif

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. Une production importante des ROS jouent un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies (**Favier, 2003**).

Le stress oxydant a été décrit comme impliqué dans le développement de maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique) et le vieillissement accéléré. Il est également admis que c'est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires (l'athérosclérose), le diabète, et la maladie d'Alzheimer (**Delattre *et al.*, 2005**).

II. 6. Le Thiabendazole et le stress oxydant

Comme nous avons cité avant, le thiabendazole est métabolisé surtout par le foie, mais aussi par la bile en métabolite actif qui est le 5-hydroxythiabendazole (5-OHTBZ), formé par l'hydroxylation de l'anneau aromatique catalysée par le CYP1A2.

Des études suggèrent que la 5-OHTBZ peut jouer un rôle dans la toxicité induite par la TBZ via sa bioactivation par le cytochrome P450 et la peroxydase, une voie de bioactivation qui impliquait une oxydation à deux électrons en une quinone imine. En fait, le 5-OHTBZ subirait d'abord une oxydation à un électron pour générer des espèces radicales, puis une disproportionnement ou une oxydation additionnelle pour donner une quinone-imine (**Dalvie *et al.*, 2006**). Celle-ci se lierait irréversiblement aux protéines cellulaires (dont celles des mitochondries) suite à une accumulation importante ayant causé la déplétion du GSH

hépatique, et ceci provoquerait un stress oxydatif et une toxicité hépatique (Dalvie *et al.*, 2006).

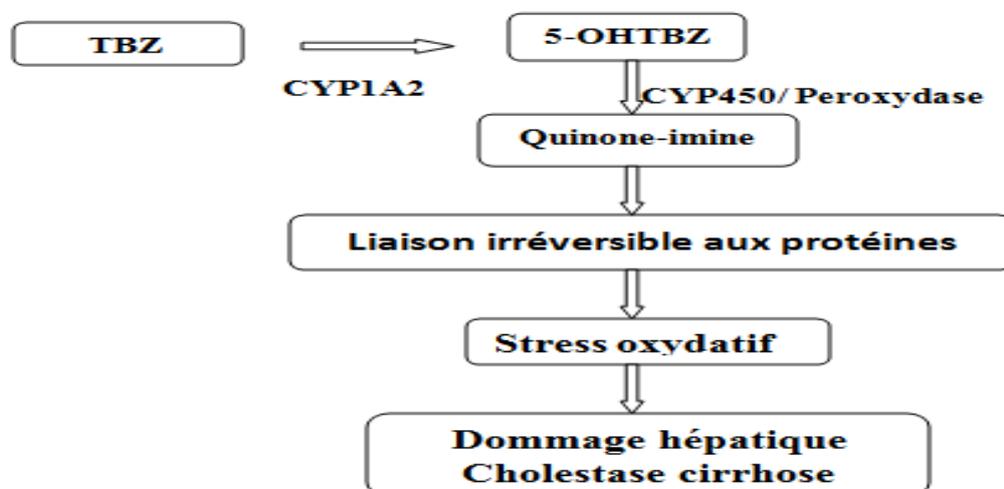


Figure09: Mécanisme d'hépatotoxicité du TBZ (modifier) (Marilyne, 2008)

II. La phosphatase alcaline (PAL), le fer et le calcium

III. 1. La PAL

La phosphatase alcaline (PAL) est une enzyme (EC 3.1.3.1), liée à la membrane présente dans une grande variété de tissus, 90 % des phosphatases alcalines sont d'origine hépatique et osseuse. Leur activité est dépendante d'ions métalliques bivalents (surtout Mg^{2+} et Zn^{2+}). Le dosage des phosphatases alcalines fait partie du bilan hépatique, il est prescrit en cas de suspicion de maladie du foie ou des os. Un taux de phosphatases alcalines élevé peut être le signe d'une cholestase (manifestations dues à la diminution ou à l'arrêt de sécrétion de la bile), L'activité de la phosphatase alcaline peut également augmenter dans les cas d'infarctus rénal ou d'insuffisance rénale. La forme hépatique, osseuse et rénale de PAL joue un rôle essentiel dans la minéralisation osseuse (phosphate inorganique (Pi) avec le calcium, les principales composantes de la matrice osseuse.) . Cette hypothèse a été renforcée quand il a été montré que l'hypophosphatasie, maladie génétique rare, dont les symptômes sont une déficience en minéralisation des os, était associée à une très faible activité de la phosphatase alcaline hépatique/osseuse/rénale résultant de mutations sur le gène codant pour cette enzyme (Weiss *et al.*, 1988).

La PAL catalyse l'hydrolyse du pyrophosphate, le principal inhibiteur de calcification. Des études chez des patients atteints d'insuffisance rénale montrent que les PAL reflètent principalement une augmentation du renouvellement osseux, déclenchée et entretenue par une

hyperparathyroïdie secondaire et modulée par plusieurs autres facteurs parmi lesquels le stress oxydatif qui joue un rôle important (**ROCHE, 1947**).

Le stress oxydatif est un puissant inducteur de la phosphatase alcaline et un événement clé favorisant la transition du phénotype des cellules vasculaires en cellules calcifiantes.

La PAL est considéré comme une molécule de défense de l'hôte qui fait partie de la réponse immunitaire innée aux agents bactériens. En effet, cette enzyme est fortement induite par l'IL6, le TNF- α et le lipo-polysaccharide bactérien, tous des facteurs généralement associés à l'inflammation et au stress oxydatif élevé.

III. 2. Le fer

Le fer est un co-facteur qui joue un rôle critique dans de nombreux processus biologiques, tels que le transport d'oxygène, le transport d'électrons ou la synthèse d'ADN (**chen *et al.*, 2012**). L'entrée du fer dans la cellule à partir du plasma est avant tout médiée par le récepteur de la transferrine 1 (TFR1) (**Andrews, 1999**). Cette protéine membranaire peut lier deux molécules de transferrine qu'elle internalise au cours du processus d'endocytose. Dans les conditions physiologiques, à l'état libre, ce Fe⁺² est un puissant donneur d'électrons, réagissant notamment avec l'eau oxygénée, pour générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs (réaction de Fenton). Le type de fer intervenant dans ces réactions est un fer qui n'est pas lié aux protéines de transport (transferrine), ou de stockage (ferritine), ni inclus dans la partie hémique des ferroprotéines. Il serait en fait associé à des petites molécules telles que le citrate, l'ATP, l'AMP, l'ADP, le pyrophosphate, les acides aminés, les sucres, etc.

C'est pourquoi il est souvent appelé « fer de bas poids moléculaire » (fer BPM). la transferrine possède une capacité importante de fixation du fer puisqu'elle est saturée à 30% environ (**David *et al.*, 2000**).

En situation pathologique, le Fer est sous forme libre, il est susceptible d'être engagé dans des réactions d'oxydoréduction conduisant à la formation des radicaux libres, pouvant générer un stress oxydatif lorsque les défenses anti-oxydantes de la cellule sont dépassées (**chen *et al.*, 2012**). Le dosage du fer, de la transferrine et de sa saturation donnera une indication sur l'état de stress oxydant du patient. Le foie régule le métabolisme du fer (transport stockage et régulation.). ainsi, si le foie qui produit la transferrine, protéine qui sert à transporter le fer dans le plasma sanguin et le conduire avant tous dans la moelle pour contribuer à fabriquer de nouveaux globules rouges (dans en sait qu'ils ont très riche en fer),c'est également le foie qui constitué le site de dépôt préférentiel du fer, dépôt qui de fait à l'intérieur de la protéine de stockage du fer qui est la ferritine (ferritine qui peut passer dans le sang où son taux reflète la

charge en fer globale de l'organisme) ; enfin, c'est le foie qui produit l'hépcidine, hormone qui régule la quantité de fer dans le corps en fonction des besoins : ainsi, si le taux de fer sanguin diminue, par exemple au décours d'un jeûne, il se produit une diminution passagère de production d'hépcidine par le foie qui va conduire à une augmentation de l'absorption digestive du fer, ce qui a pour effet de contrecarrer la baisse initiale du fer et de rétablir une situation normale ; le phénomène inverse se produit en cas d'augmentation du taux de fer sanguin (par exemple au décours d'un repas riche en viande rouge) : augmentation transitoire du taux d'hépcidine et baisse de l'absorption digestive de fer à visée « correctrice ». (**David et al., 2000**).

III. 3. Le calcium

Le réticulum endoplasmique (RE) est le principal réservoir de calcium intracellulaire, avec des concentrations estimées de 1000 à 10000 fois supérieures aux niveaux cytosoliques. Le calcium est un élément minéral, le plus abondant dans le corps, qui contribue à renforcer les os. Mais il n'est pas fabriqué par notre organisme. Un apport régulier de calcium alimentaire et de vitamine D est nécessaire. (**Nadeem Aslam et al., 2016**).

En cas d'insuffisance rénale, l'absorption digestive du calcium est réduite en raison d'un trouble de synthèse de la vitamine D (Le calcium nécessite de la vitamine D pour être absorbé), et l'organisme va puiser le calcium dans les os, ce qui les affaiblit. La surveillance de la calcémie aide à gérer l'équilibre en calcium, La régulation de ce gradient est importante pour le bon fonctionnement de nombreux chaperons et enzymes résidant aux RE (**Nadeem Aslam et al., 2016**).

Le métabolisme des glucides dans le foie et dans les muscles est contrôlé par des hormones circulantes et par des neuromédiateurs. Le signal reconnu au niveau de la membrane plasmique par des récepteurs spécifiques est transmis à l'intérieur de la cellule cible par des messagers intracellulaires. L'AMP cyclique est le messager intracellulaire actuellement le mieux connu. Il active une protéine kinase qui entraîne la phosphorylation de certaines protéines dans la cellule. Cependant, l'AMP cyclique n'est pas le seul messager intracellulaire impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire. Un certain nombre d'hormones ou de neuromédiateurs produisent leurs effets sur les cellules cibles sans modifier le contenu cellulaire en AMP cyclique. Ainsi, les catécholamines, en stimulant les récepteurs α adrénergiques, ou des hormones vaso-actives comme l'angiotensine ou la vasopressine, augmentent la concentration de Ca^{+2} ionisé dans les hépatocytes (**Claret et Mauger, 1987**).

Le stress oxydatif va perturber les voies physiologiques et provoque la mort cellulaire. Ces perturbations sont médiées largement par le signal calcique (**Ermak et coll, 2002**). L'élévation du calcium dans le cytoplasme entraîne l'afflux de calcium dans les mitochondries et les noyaux. Dans les mitochondries, l'élévation de la concentration en calcium accélère et perturbe le métabolisme normal menant à la mort cellulaire. Dans les noyaux, une élévation de la concentration de calcium module la transcription des gènes aboutissant à l'apoptose. Dans le noyau, comme dans le cytoplasme des cellules, la concentration en ion calcium peut réguler la phosphorylation/déphosphorylation des protéines, modulant les voies de transduction du signal en conséquence (**Corinne, 2010**). De la même façon, dans certains modèles de maladies neurodégénératives induites artificiellement (par l'acide 3-nitropropionique), l'augmentation brutale de calcium par l'ouverture des canaux calciques entraîne un dysfonctionnement mitochondrial aboutissant à une autodestruction cellulaire. (**Rosenstock et al., 2004**).

IV. Le thé vert

Le thé est une ancienne boisson la plus consommée dans le monde après l'eau (**Diaz et al., 2010**). Le thé, principalement cultivé et consommé en Asie (Chine, Japon) utilisé dans les systèmes de médecine traditionnelle mais aussi prisé au Moyen Orient et en Afrique du nord, a conquis plus récemment le marché Européen (**Yashin et al., 2011**). De plus, L'espèce *Camellia sinensis* , que ce soit le thé vert (feuilles non fermentées), fait partie de ces plantes de plus en plus consommées pour leur effet bénéfique et préventif pour la santé (**Yarnell,2005**). Ses propriétés supposées amincissantes, antioxydantes (polyphénols), stimulantes (caféine) et diurétiques en font une espèce appréciée (**Sharangi ,2009**). Ont conduit à l'intérêt pour les bienfaits potentiels pour la santé de la consommation de thé.

IV. 1. Description botanique

Le théier, *Camellia sinensis*, est un petit arbre rameux, aux feuilles persistantes. A l'état sauvage et selon les variétés, il peut atteindre 5 à 15 m d'hauteur. Il porte des fleurs blanche à sépales légèrement soudés à la base, à 5 pétales et à nombreuses étamines jaune clair. Le fruit est une petite capsule pluriloculaire arrondie: une coque dure qui renferme des graines rondes et brunes de 4 à 15 mm de diamètre (**Bernaud, 2004**). Les graines peuvent être pressées pour donner une huile. Le théier le plus vieux du monde (1800 ans) se situe à Pu' er dans la province du Yunnan en Chine (**Kabouche ,2010**).



Figure 10: *Camellia sinensis* (Eddouks, 2007)

IV. 2. CLASSIFICATION (D'après Otto Ernst Carl Kuntze 1843-1907)

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Theales*

Famille : *Theaceae*

Genre : *Camellia*

Espèce : *Sinensis*

IV. 3. Composition chimique du thé vert

La feuille de thé ne contient pas moins de 350 constituants (Kabouche, 2010). Leur composition qualitative et quantitative est dépendante du mode de fabrication, du type de culture et du type de cueillette (Benaraba, 2007).

IV. 3. 1. Les composés phénoliques

Le thé est particulièrement riche en composés phénoliques, puisque ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille (Namita *et al.*, 2012). Les polyphénols représentent 44% de l'extrait sec (en poids) de la feuille de thé et sont constitués par des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavanols communément appelés catéchines sont les polyphénols

quantitativement prédominants dans le thé vert (environ 27 %) (**Clauzure, 2007**). on distingue l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épicatéchine-3-gallate, l'(-)-épigallocatechine et l'(-)-épigallocatechine-3-gallate (ou EGCG) (**Nkhili et al., 2009**). Ce dernier est le polyphénol majeur du thé vert (**Clauzure, 2007 ; Nkhili et al., 2009**).

IV. 3. 2. Source de vitamines

Le thé est riche en vitamines du groupe B telles que thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3). La vitamine C se trouve aussi en quantité significative dans le thé vert. Enfin l'infusion de thé contient la vitamine P qui favorise la perméabilité capillaire et l'élasticité de la paroi des vaisseaux sanguins (**Kabouche, 2010 ; Nkhili, 2009 ; Nacer et al., 2014**).

IV. 3. 3. La théine

1 à 5 % de théine, la théine et la caféine sont une seule et même substance appelée triméthylxanthine. Dans le thé, l'action stimulante de la théine est significativement modifiée par la présence des polyphénols qui génèrent un effet prolongé et modéré (**Kabouche, 2010 ; Nkhili, 2009**). L'analyse pharmaceutique met en évidence le phénomène d'effet retard et confirme la tradition populaire qui rapporte que le thé est moins excitant que le café (**Kabouche, 2010**).

IV. 3. 4. Autres composants

A l'état frais, le thé renferme 27% de matières sèches dont, en moyenne : 40% de glucides, 15 à 23 % de protides et 2 à 3% de lipide, de faible quantité de chlorophylles et de caroténoïdes. Ces substances sont faiblement extraites lors de l'infusion (**Nkhili, 2009**). Les principaux minéraux du thé sont le potassium, le calcium, le phosphore, le manganèse, le cuivre, le sodium, le silicium, le zinc, le bore, le plomb, le chrome, le fer, le nickel, et le baryum. Le thé est, de plus, une source importante de fluor (**Benarba, 2007**).

IV. 4. Thé vert et santé

De nombreux bénéfices du thé vert ont été constatés sur la santé de l'organisme notamment sur la santé de la peau, du cœur, la purification et le contrôle du poids. D'autres bénéfices du thé vert sont en train d'émerger à travers des recherches scientifiques et retiennent l'attention des médias, comme dans le domaine du cancer ou des maladies cardiovasculaire.

IV. 4.1. Maladies cardio-vasculaires

Le thé vert, consommé régulièrement, peut aider à prévenir des affections cardiovasculaires. Il agit positivement sur le taux de cholestérol total en faisant baisser le taux de cholestérol LDL (le mauvais) et augmenter le taux de cholestérol HDL (celui qui protège les artères) (**Schwarz et al., 2006**).

IV. 4.2. Maladies chroniques

L'épigallocatechine gallate (EGCG) est la principale catéchine, un polyphénol que l'on trouve dans le thé vert (**Mienne et Scalbert , 2007**). C'est un puissant antioxydant capable de neutraliser les espèces réactives oxygénées et les radicaux libres lourdement impliqués dans le vieillissement et les maladies chroniques dégénératives. La recherche a montré que l'EGCG pourrait avoir des effets bénéfiques dans le cas de nombreuses maladies, incluant le diabète, les maladies neurodégénératives (**SCALBERT et al., 2005**).

IV. 4.3. Troubles gastro-intestinaux

Contrairement au café, le thé vert n'irrite ni l'estomac ni l'intestin. Celui-ci peut s'avérer particulièrement utile en cas de diarrhées, de troubles gastriques, d'aigreurs et de manque d'appétit. L'action anti-inflammatoire et antibiotique des saponines et des flavonoïdes qu'il contient permet la résolution des inflammations dans la région gastro-intestinale (**Schwarz et al., 2006**). De fait de sa teneur élevée en minéraux, le thé vert est très efficace pour compenser les pertes dues à la déshydratation. Son action alcalinisant permet en outre de réduire l'acidité gastrique. Enfin, les tanins stimulent l'appétit et favorisent la digestion (**Schwarz et al., 2006**).

MATERIEL ET METHODES

Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet du Thiabendazole et/ou du thé vert sur le foie du rat blanc *Rattus norvegicus* pendant un mois. Dans notre étude, nous avons dosé le taux plasmatique de PAL, de fer et de calcium.

I. Matériel biologique

I. 1. Matériel végétale

20g de feuilles sèches de thé vert *camellia senensis* sont infusées dans un litre d'eau bouillante pendant 10 minutes. Le filtrat obtenu représente l'extrait de thé vert à 2% qui est donné comme boisson aux rats.

I. 2. Matériel Animal

Dans cet étude, ils ont utilisé 30 rats blancs *Rattus norvegicus* de la souche *Wistar*. Cette expérimentation est réalisée au sein de l'animalerie de la faculté des sciences de l'Université M' Hamed Bougara de Boumerdes pendant un mois.

I. 3. Classification systématique du rat *Wistar*

Règne : animal
Classe : mammifère
Sous classe : placentaire
Ordre : rongeur
Genre : *Rattus*
Espèce : *Rattus norvegicus*



Figure 11: *Rattus norvegicus*

I. 4. Origine et caractères de rat *Wistar*

Le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) est un rongeur de la famille des muridés. Il s'est propagé en Europe à partir du Moyen-âge. Ces animaux vivent en général en colonies dans des terriers, ils sont omnivores, dociles et facile à manipuler (**Harkess et Wagner, 1994**). Le rat *wistar* a un caractère prudent et curieux ce qui lui permet de s'adapter à des environnements différents, il est en général peu agressif et sociable (**Harpkiewick, 1998**). Le poids d'un adulte est de 450 à 520 g pour les mâles et de 250 à 300 g pour les femelles, le poids d'un petit à la naissance est de 5 à 6 g. Il a une tête large, des petites oreilles, des yeux rouges globuleux et une petite queue écaillée. La facilité d'élevage, la durée de vie (2 à 3 ans) et de gestation (21 jours) font de lui un modèle intéressant pour la recherche (**Roosen et Giesel, 1950**).

I. 5. Condition d'élevage

A leur arrivée dans l'animalerie de la faculté des sciences de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdès où l'élevage a été réalisé. Les rats sont gardés dans des cages en plastique de dimensions (43*28*18 cm) munies d'un couvercle métallique grillagé. Avant leur utilisation les rats subissent une période d'adaptation d'une semaine.

Le couvercle contient deux espaces dont un, réservé au dépôt de l'aliment qui provient d'une SARL de production locale (Bouzaréah Alger) et qui est composé de: protides (23,03%), lipides (9%), glucides (48%) et complexe minéral vitaminé (3%) et l'autre pour introduire le biberon d'eau ou de thé. Le fond de la cage est rempli par une couche de sciure de bois qui doit être renouvelée deux ou trois fois par semaine.

Après une période d'adaptation d'une semaine, les animaux sont repartis en quatre lots dont deux lots témoins (témoin et témoin-thé) et deux lots qui reçoivent la nourriture supplémentée en (thé plus thiabendazole et en thiabendazole).

I. 6. Le protocole d'expérimentation

Notre expérimentation a duré un mois, appliquée sur 30 rats wistar qui sont devisés en quatre lots :

➤ **Lot témoin (T)**

Le nombre de rats dans ce lot est : cinq (n =5) reçoivent de l'eau et de l'aliment *ad libitum*

➤ **Lot témoin-thé vert (TT)**

Le nombre des rats dans ce lot est : cinq (n =5) chaque jour ces animaux reçoivent une dose de 2% de thé vert (soit 25ml/rat/jour) et de l'aliment standard par voie orale.

➤ **Lot traité par le Thiabendazole (D)**

Les animaux de ce lot sont au nombre de dix (n=10) ils reçoivent chaque jour pendant un mois par voie orale de l'eau et de l'aliment qui est préparée à base d'un mélange d'aliment standard avec une dose (500 mg/kg p.c) de thiabendazole.

➤ **Lot traité par le thiabendazole et le thé vert (TD)**

Le nombre des rats dans ce lot est dix (n=10) pendant un mois ils reçoivent chaque jour une dose du thé vert (2%) et un aliment préparée à partir de l'aliment standard plus une dose de 500mg/kg de p.c du thiabendazole.

II. Matériel non biologique

La verrerie, l'appareillage ainsi que les réactifs utilisés pour la réalisation de cette étude sont regroupés dans l'annexe (Annexe06).

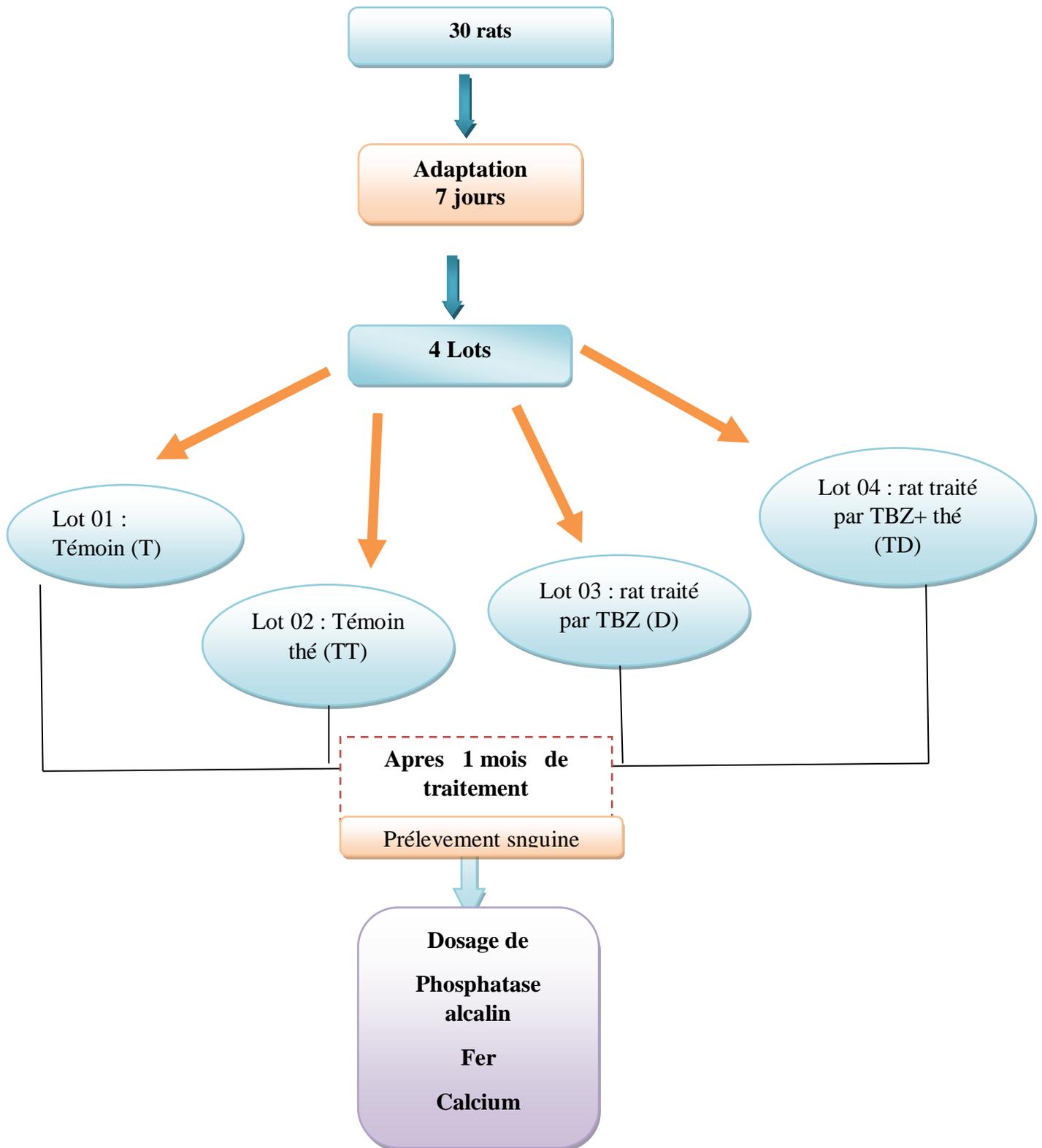


Figure 12 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

III. Technique analytique

III. 1. Dosage des paramètres enzymatiques (au niveau de laboratoire CHU Ain Naadja)

Le dosage de PAL, Fer et calcium a été faite par l'automate VITROS 4600.

III. 1. 1. Dosage de phosphatase alcaline

III. 1. 1. 1. Principe

Pour usage *in vitro* uniquement. Les plaques ALKP VITROS mesurent la concentration des phosphatases alcalines (ALKP) contenues dans le sérum et le plasma sur les systèmes de chimie clinique VITROS 4600.

Les plaques ALKP VITROS mesurent la concentration des phosphatases alcalines (ALKP) contenues dans le sérum et le plasma sur les systèmes de chimie clinique VITROS 4600.

La plaque ALKP VITROS est constituée d'un support en polyester recouvert d'un film analytique multicouche. Une goutte d'échantillon patient est déposée sur la plaque, puis répartie uniformément par la couche d'étalement dans les couches sous-jacentes. La couche d'étalement contient également un substrat de phosphate de p-nitrophényle et d'autres composés nécessaires à la réaction (Tietz et saunders, 1987).

À pH alcalin, l'ALKP présente dans l'échantillon catalyse l'hydrolyse du phosphate de p-nitrophényle en p-nitrophénol. Le p-nitrophénol diffuse dans la couche sous-jacente où il est mesuré par spectrophotométrie de réflectance. La vitesse de modification de la densité de réflexion est convertie en activité enzymatique (CLSI, 2005).

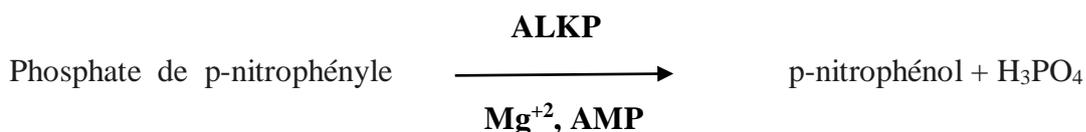


Figure 13 : Automate VITROS 4600

III. 1. 1. 2. Les réactifs

Plaques ALKP VITROS Chemistry Products, Plasma, Tub Héparine. (Les annexes 1, 2, 3, 4 et 5).

III. 1. 1. 3. Calcul de l'activité d'ALKP

Une vitesse de variation de la réflectance est calculée d'après les mesures séquentielles de réflectance de la plaque à 400 nm sur la période d'incubation qu'est 5min. Cette vitesse est utilisée par le modèle de calibrage de dosage enzymatique cinétique en points multiples intégré au logiciel pour calculer l'activité enzymatique. Une fois qu'un calibrage a été effectué sur chaque lot de plaques, l'activité de la phosphatase alcaline dans les échantillons à tester peut être calculée à partir de la vitesse de variation de la réflectance mesurée pour chaque plaque à tester.

III.1.2. Dosage de fer

La concentration en fer sérique est caractéristique du fer (Fe^{+3}) lié à la transferrine du sérum et n'inclut pas le fer de l'hémoglobiline libre. (Tietz *et al.*, 1999).

Après rupture de la liaison fer-transferrine en présence d'acide citrique, le fer Fe^{+3} est réduit par l'acide ascorbique en ion Fe^{+2} . Les ions Fe^{+2} forment, avec le 3-(2-pyridyl)-5, -2, -4-triazine-disulfonate, (férène) un complexe coloré. (Douglas *et al.*, 1984).

La concentration est mesurée par l'automate VITROS 4600.

III. 1. 3. Dosage de calcium

Le calcium total est constitué de 3 formes chimique dans le plasma, dont environ 50% est du calcium libre ou ionisé, 40% est lié à la protéine du plasma, et 10% est complexé avec des petits anions. La concentration du calcium est mesurée par l'automate VITROS 4600.

IV. Analyse statistiques

Pour chaque série d'analyse, nous avons calculé la moyenne \bar{X} et l'écart type δ .

- **La moyenne**

On appelle la moyenne d'une variable X la moyenne arithmétique des valeurs prises par X

$$\bar{X} = \frac{\sum n_i x_i}{N}$$

- **L'écart type**

C'est la racine carrée de la variance : c'est un écart moyen entre la variable et sa moyenne.

$$\delta^2 = \frac{\sum n_i (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

Les résultats sont présentés par les moyennes affectées de l'écart type. L'analyse de variance d'ANOVA affecté *au test de Scheffe* est effectué pour la comparaison des moyennes .

La différence est :

- Non significative si $P > 0.05$
- Peu significative si $P \leq 0.05$ (*)
- Significative si $P \leq 0.01$ (**)
- Très significative si $P < 0.01$ (***)
- Hautement significative si $P < 0.0001$ (#)

RESULTATS

I. Les résultats des dosages du paramètre enzymatique

I.1. Le dosage de PAL

Tableau II : Valeurs moyennes du taux de PAL plasmatique chez les *Rattus norvegicus* témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD).

PARAMETRE	T	TT	D	TD
PAL [U/L]	1,85±0,07	18,67±1,15	34,69±0,25	20,67 ± 0,58

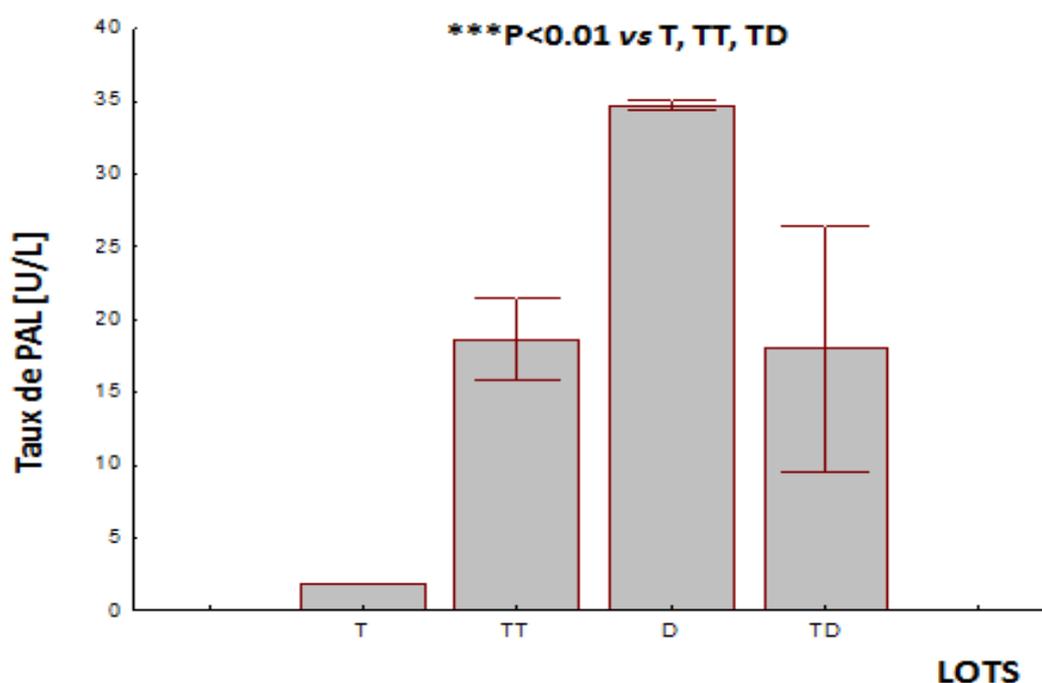


Figure 14: Evaluation du taux de PAL plasmatique chez les *Rattus norvegicus* témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD).

Les résultats montrent l'effet de l'administration du thiabendazole et du thé vert sur le taux de PAL plasmatique représentés dans la figure 14. Chez les rats recevant du thiabendazole (D), nous avons noté une augmentation très significative ($p < 0.01$) du taux de PAL par rapport aux rats témoins (T), et aussi par rapport aux lots témoins thé (TT) et celle traitée par le thiabendazole et le thé vert TD. Cependant, il n'y a aucun changement significatif entre les lots traités par le thiabendazole plus thé (TD) et les lots témoins thé (TT).

I. 2. Le dosage de fer

Tableau III : Valeurs moyennes du taux de Fer plasmatique chez les *Rattus norvegicus* témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert(DT)

PARAMETRE	T	TT	D	TD
Fer [$\mu\text{mol/L}$]	20,50 \pm 0,71	40,00 \pm 10,00	168,65 \pm 21,54	81,60 \pm 2,77

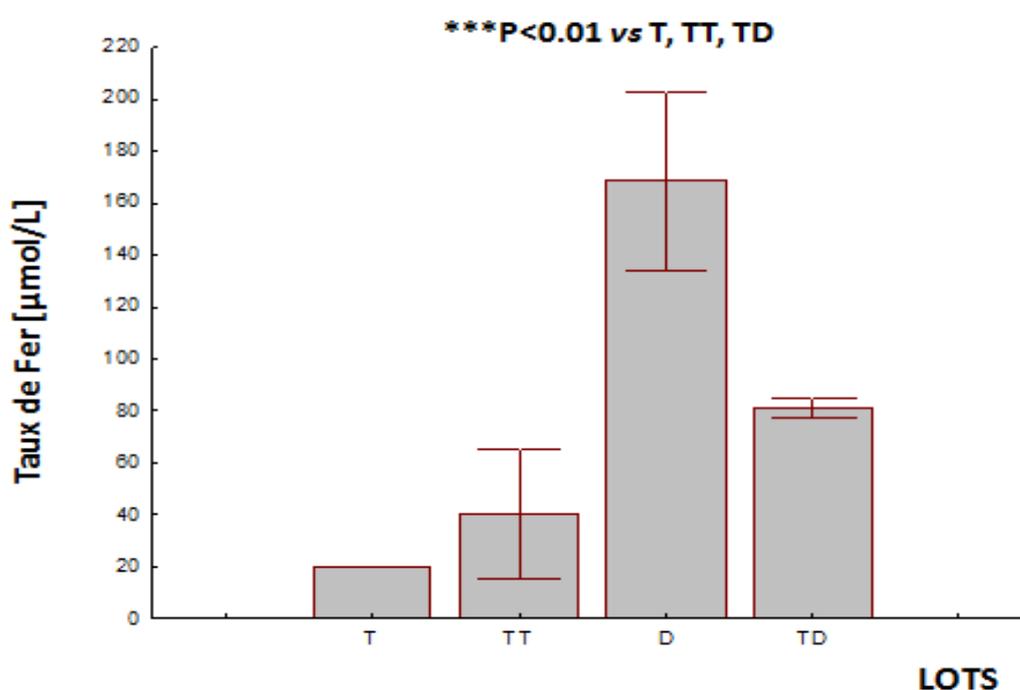


Figure 15: Evaluation du taux de fer plasmatique chez les témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD).

Les résultats indiquent une augmentation très significative ($p < 0.01$) du taux de fer des rats traités par le thiabendazole (D) par rapport aux témoins (T), témoins thé (TT) et ceux traités au thiabendazole + thé vert (TD).

3. Le dosage de calcium

Tableau IV : Valeurs moyennes du taux de calcium plasmatique chez les *Rattus norvegicus* témoins (T), Témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD)

PARAMETRE	T	TT	D	TD
Calcium [mmol/L]	0,26±0,01	0,27±0,01	2,45±0,01	2,57±0,06

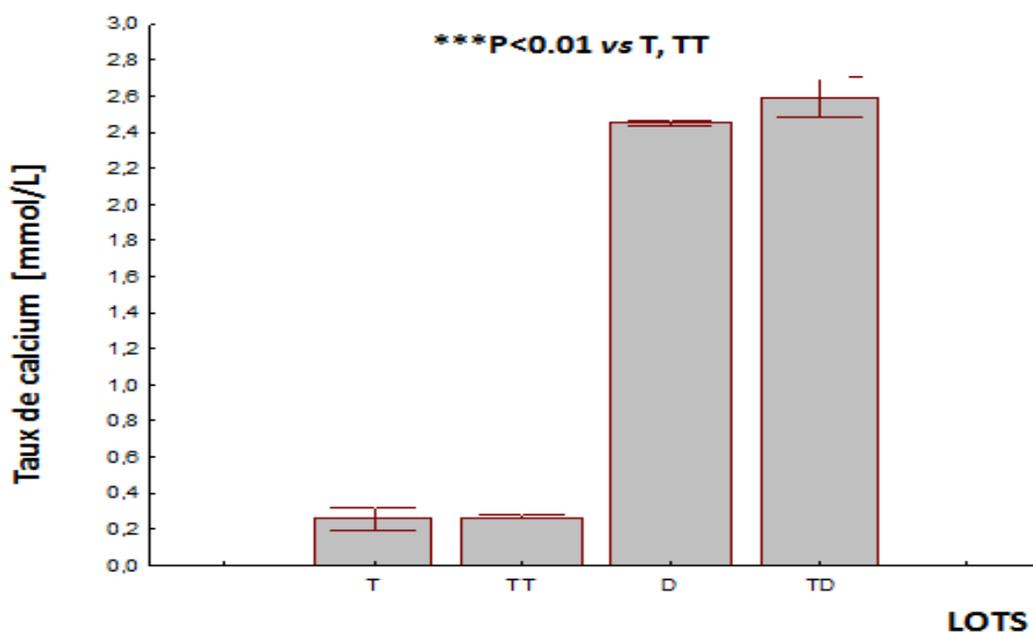


Figure 16: Evaluation du taux de calcium chez les témoins (T), témoins thé vert (TT), Thiabendazole (D), Thiabendazole + thé vert (TD.)

Les résultats montrent une augmentation très significative ($P<0.01$) du taux de calcium plasmatique chez les rats traité par le Thiabendazole (D) par rapport aux témoins (T) et aux témoins Thé vert (TT).

Une augmentation peu significative ($P\leq 0.05$) du taux de calcium chez les rats traité par Thiabendazole + thé vert (TD) par rapport aux rats traité par Thiabendazole (D) uniquement.

DISCUSSION

I. 1. Dosage de la phosphatase alcaline PAL

La phosphatase alcaline est un marqueur hépatique indiquant les perturbations de l'organisme, responsable du métabolisme, de la détoxification, et de la biosynthèse des macromolécules énergiques pour les différentes fonctions physiologiques. L'interférence avec cette enzyme mène aux perturbations biochimiques, aux lésions tissulaires et à la perte de la fonction cellulaire. (**Arock et al., 2007**).

Le foie est le principal organe de détoxifications il est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. De ce fait, il présente un grand risque de dommage (**Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011**). Nos résultats montrent une augmentation très significative de l'activité enzymatique de phosphatase alcaline (PAL) chez les rats traités par le thiabendazole par rapport aux témoins, qui peuvent être expliqués par un dommage hépatique (cirrhose, cholestase hépatique). Nos résultats sont en accord avec les études de l'équipe de **Roy (1989)** et celle de **Davidson (1988)**, qui montrent qu'une Cholestase intrahépatique a été rapportées chez l'homme après une cure de thiabendazole (30-60 mg / kg de poids corporel / jour) comme traitement pour une infection parasitaire indiqué par l'élévation des aminotransférases sériques et le taux plasmatique de PAL. En outre, l'étude de **Kubab (2007)**, montre que l'augmentation du taux de la phosphatase alcaline est en faveur d'une obstruction des voies biliaires et des autres atteintes hépatiques (cirrhose hépatique), ainsi que des problèmes osseux

Nos résultats ont montré aussi que le co-traitement par le thiabendazole qui prouvoque le stress oxydatif (**Iullmann-rauch, 2008**) et le thé vert a induit une diminution significative de l'activité enzymatique de PAL, cela s'explique par l'activité anti-oxydantes des composés phénoliques présents dans le thé vert permettant de piéger les radicaux libres. Cela est confirmé par l'étude de **Sang Shengmin (2005)**.

I. 2. Dosage de fer

Les résultats obtenue montrent que l'administration du thiabendazole a engendré une augmentation du taux plasmatique de fer, ceci peut être expliquer par une atteinte hépatique due au l'effet du Tbz sur le foie, ces résultats sont en accord avec ceux de **Loréal O (2012)** et ceux de **Manivel (1987)** qui montrent qu'un taux élevé de fer plasmatique peut-être le signe

d'une hémochromatose, une anémie hémolytique, une cirrhose, et une Cholestase intrahépatique.

L'équipe de **Loréal O (2012)** aussi explique que l'excès de fer est toxique, notamment par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène qu'il peut générer, Il peut aussi développer des complications graves, notamment hépatiques.

L'augmentation de taux de fer peut être aussi dûe à l'effet de Tbz qui induit le stress oxydant comme il est montré dans l'étude de l'équipe de **chen (2012)**. En situation pathologique, le Fer est sous forme libre, il est susceptible d'être engagé dans des réactions d'oxydoréduction conduisant à la formation des radicaux libres, pouvant générer un stress oxydatif lorsque les défenses antioxydantes de la cellule sont dépassées. En outre peut être un signe d'un état hémolytique comme il est montré dans l'étude de l'équipe de **Tada (1996)** qui confirme qu'il y a une diminution significative dans les paramètre des globules rouges et une hémosidérose marquée dans la rate des souris ICR mâles traitées par le Tbz (0,8 et 1,6%) pendant 13 semaines.

Cependant la diminution significative du taux de fer chez les rats TD peut être due à l'effet anti oxydant du thé qui est opposé à l'effet du thiabendazole.

I. 3.Dosage de calcium

Les ions calcium ont un rôle central dans la physiologie de la cellule et sa présence dans le cytosol à des concentrations très faibles par rapport au milieu extracellulaire est la résultante d'échanges permanents. Il est régulé entre le milieu extracellulaire et différents organites dont les mitochondries.

Les résultats obtenu montrent une augmentation très significative du taux de calcium chez les rats traités par le Thiabendazole (D) par rapport aux témoins (T) ceci peut être due aux effets de Tbz qui induit le stress oxydant, ces résultats sont en accord avec les études des plusieurs chercheurs **Ermak (2002)** et **Rosenstock (2004)** qui ont approuvé que le taux de calcium augmente au cours du stress oxydant ce qui confirme notre suggestion, ce dernier induit plusieurs maladies tel que l'Alzheimer, maladie neurodégénérative où le calcium joue un rôle important.

Selon l'équipe **Ermak (2002)** le stress oxydatif va perturber les voies physiologiques et provoquer la mort cellulaire. Ces perturbations sont largement médiées par le signal calcique.

Discussion

Lors de l'administration du thé vert seul le même taux de calcium est observé chez le témoin thé (TT) et le témoin (T), nos résultats montrent que le thé vert n'a pas d'influence sur le taux de calcium, ces résultats sont en accord avec l'étude de **Hyang (2005)** qui a étudié l'effet des extraits soluble dans l'eau chaude de thé vert sur le métabolisme de calcium chez des rats, il a trouvé qu'il n'y a pas de différence entre les groupes traités concernant l'apport, l'absorption, l'excrétion et la rétention de calcium.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspective

En fin d'expérimentation les résultats obtenus ont montré que l'administration du thiabendazole (500 mg/kg de p.c) pendant un mois a provoqué une augmentation significative du taux plasmatique de PAL, de fer et de calcium.

On peut constater que l'augmentation des taux plasmatique de ces derniers indique un état de stress oxydatif et/ou dommage hépatique. Cela par rapport aux nombreuses études qui montrent que :

Le stress oxydatif est un puissant inducteur de la phosphatase alcalin, et un taux élevé de PAL peut être le signe d'une atteinte hépatique et une cholestase.

En situation pathologique, le fer est sous forme libre, il est susceptible d'être engagé dans des réactions d'oxydoréduction conduisant à la formation de radicaux libres et le dosage du fer, de la transferrine et de sa saturation donnera une indication sur l'état de stress oxydant du patient.

Le stress oxydatif va perturber les voies physiologiques et provoquer la mort cellulaire. Ces perturbations sont médiées largement par le signal calcique.

L'effet du traitement par le thé vert qui a un effet opposé au thiabendazole est médié par la diminution du taux de PAL et fer qui augmentent par l'administration de Tbz. Cependant notre étude a montré que le thé n'a pas d'effet sur le taux de calcium.

Ce travail mérite d'être complété par d'autres travaux qui vont permettre de mieux cerner le pouvoir oxydatif et l'hépatotoxicité du thiabendazole et anti-oxydant de l'extrait du thé vert par le dosage d'autres enzymes anti-oxydantes, comme la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

—A—

- Andrew, S. N. C., Engl, N., Med, J.** (1999). Disorders of iron metabolism, 341: 86- 95.
- Anon.**(1997). The pesticide manual. Eighth edition. British crop protection council (Ed.worthing.C.R).
- Arock, M., Chevet ,K., Del corso, A.**(2007). Le guide des examens biologiques. Edition Mylan Française : 5-52.
- Séide, M., Marion, M., Mateescu, M. A., &Averill-Bates, D. A.** (2016). The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 32: 232–239.
- Ali, M. B., Hahn, E. J., &Paek, K. Y.** (2007). Methyljasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in Panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(3): 607–621.

—B—

- Baillie, J.K., Bates, M.G.D., Thompson, A.A.R., Waring, W.S., Partridge, R.W., Schnopp, M.F., Simpson, A., Gulliver-Sloan, F., Maxwell, S.R.J., Webb, D.J.** (2007). Low and Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous Urate Production Augments. *Chest*,131: 1473-1478.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., &Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4): 483–495.
- Baskaran, A., Chua, K. H., Sabaratnam, V., Ravishankar Ram, M., &Kuppusamy, U. R.** (2017). Pleurotus giganteus (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H₂O₂ stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1): 40.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N.** (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2) : 547–581.
- Benaraba, R.** (2007). Insulinorésistance et stress oxydant dans le syndrome métabolique : étude expérimentale des effets protecteurs de micro constituants nutritionnels (Polyphénols du thé, de la cannelle et chrome III).Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble1.

Références bibliographiques

Bensaad, K., & Vousden, K. H. (2005). Savior and slayer: the two faces of p53. *Nature medicine*, 11(12) : 1278–1279.

Berger, M., Chioléro, R. (2001). Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs ? *Suisse* ,10 : 527-34.

Bernaud, C. (2004). Consommation de thé et de médicaments: que doit savoir le pharmacien à l'officine .Thèse De Doctorat .Université de Nantes.

Bion, E., Pariente, E. A., & Maitre, F. (1995). Severe cholestasis and sicca syndrome after thiabendazole. *Journal of hepatology*, 23(6): 762–763.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1): 9–19.

Bohand, X., Edouard, B., Maslin, J. (2005). Médicaments antihelminthiques. *EMC - Maladies Infectieuses*, 2(1) : 1–9.

Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. En : Delattre J., Durand G., Jardillier J-C. *Biochimie pathologique*. Flammarion, Paris, 317 : 83-95.

—C—

Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem*, 383(6): 933-943.

Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10): 840–844.

Cardozo, L. F., Pedruzzi, L. M., Stenvinkel, P., Stockler-Pinto, M. B., Daleprane, J. B., Leite, M., Jr., & Mafra, D. (2013). Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie*, 95(8) : 1525–1533.

Charlotte, F. (2012). Sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion et stratégie de cardioprotection par l'exercice : rôle spécifique de la NOS myocardique. Pour obtenir le grade de M. Sc. Université d'Avignon et du Pays Vaucluse école doctorale agro-sciences et sciences : 34.

Références bibliographiques

Chen, L., Hu, J. Y., & Wang, S. Q. (2012). The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67(5): 1013–1024.

Claret, M., Mauger, J. P. (1987). Flux de calcium et contrôle de la glycogénolyse hépatique. *médecine/sciences*, 3 : 574-81.

Clauzure, C. (2007). Méta-analyses des effets chimio protecteurs de la curcumine et du thé vert sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Clémentine, P.M.L. (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Sciences agricoles. Université Paris Sud – Paris XI. Français.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, 19087-1898 USA.

Corinne, A. (2010). stress oxydatif, calcium et thermalisme. *presstherm climate*, 147(2) : 121-138.

Craine, E. M. (1990). A metabolism study in rats with ¹⁴C-thiabendazole, 242: 570 -847.

—D—

Dalvie, D., Smith, E., Deese, A., & Bowlin, S. (2006). In vitro metabolic activation of thiabendazole via 5-hydroxythiabendazole: identification of a glutathione conjugate of 5-hydroxythiabendazole. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 34(4): 709–717.

Dalvie, D., Smith, E., Deese, A., Bowlin, S. (2006). In vitro metabolic activation of thiabendazole via 5-hydroxythiabendazole: identification of a glutathione econjuate of 5hydroxythiabendazole. *DrugMetabDispos*, 34: 709-717.

Davidson, R. N., Weir, W. R., Kaye, G. L., & McIntyre, N. (1988). Intrahepatic cholestasis after thiabendazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4): 620.

Références bibliographiques

Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Espèces réactives l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Radicaux libres et stress oxydants. Aspects biologiques et pathologiques, 10 : 281-309.

DeLeo, F. R., Allen, L. A., Apicella, M., & Nauseef, W. M. (1999). NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(12): 6732–6740.

Diaz, J., DO, T. K. T., Feuillâtre, M., Loffredo, L. (2010). Authentification phytochimique de l'espèce *Camellia sinensis* (L.) Kuntze par analyse HPLC. Francis Hadji-minaglou BotaniCert, Espace Jacques-Louis Lions, 4 Trav. Dupont, 06130 Grasse, 01

Douglas, J., Hennesy, G. R., Reid, F.E., Smith, S.L., Thomson, C. J. C. (1984). Fermentation a new spectrophotometric reagent for iron, 62: 721-724.

Duarte, T. L., Cooke, M. S., & Jones, G. D. (2009). Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free radical biology & medicine*, 46(1): 78–87.

Duarte, T. L., & Jones, G. D. (2007). Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free radical biology & medicine*, 43(8): 1165–1175.

Dubey, A. K., Sanyal, P. K. (2010). Benzimidazoles in a Wormy World. *Online Vet. J*, 5 : 63- 67.

—E—

Eddouks, M., Ouahidi, M. L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., Lemhardi, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytotherapie*, 5 : 264-270.

Ermak, G et coll. (2002). Le calcium et le stress oxydatif. À partir de la signalisation cellulaire à la mort cellulaire. *Mol Immunol*, 38(10): 713-21.

European Medicines Agency (EMA). (2004). Veterinary Medicines and Inspections. Committee for medicinal products for veterinary use. Thiabendazole (extrapolation to goats). Summary report, 3,086803.

Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J. Clin Nutr*, 72: 64-65.

Références bibliographiques

—F—

Favier ,A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 5: 108-115.

Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 36(4): 327–358.

Food and drug administration. (2003). Chewable tablets and suspension. Mintezol (thiabendazole).

Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J., & Pasquier, C. (1993). Oxidative damage to lysozyme by the hydroxyl radical: comparative effects of scavengers. *Biochimica et biophysica acta*, 1203(1): 11–17.

Fujitani, T., Yoneyama, M., Ogata, A., Ueta, T., Mori, K., & Ichikawa, H. (1991). New metabolites of thiabendazole and the metabolism of thiabendazole by mouse embryo in vivo and in vitro. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 29(4): 265–274.

—G—

Gardès-Albert ,M., Bonne font-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore,D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique., *L'actualité chimique* : 91-95.

Gauche, E., Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Movement & Sport Sciences*, 2 (58) : 43-66.

Ghosh, D., & Scheepens, A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular nutrition & food research*, 53(3): 322–331.

Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., & Kanazawa, K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free radical biology & medicine*, 45(9) : 1318–1325.

Grandjean, D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv. Prat. Vét.*, 22 : 11-15.

Références bibliographiques

Groh ,M., Blanche, P., Calmus, Y., Guillevin,L. (2012). insuffisance hépatique aiguë induite par le thiabendazole nécessitant une transplantation et le diagnostic ultérieur de la polyartérite noueuse. *Clin. Exp. Rheumatol*,30: 7-9.

Groten, J. P., Butler, W., Feron, V. J., Kozianowski, G., Renwick, A. G., & Walker, R. (2000). An analysis of the possibility for health implications of joint actions and interactions between food additives. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 31(1): 77–91.

—H—

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant [Oxidative stress]. *Revue médicale de Liege*, 62(10): 628–638.

Halliwel,B., Chirico, S .(1993). Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *American Journal Clinic Nutrition*,57: 715S-724S-725S.

Halliwel,B., Gutteridge,J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine, 2^eed.Oxford, UK : Clarendon.

Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4thedition. Oxford UniversityPress, USA : 704.

Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., & Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *The Journal of biological chemistry*, 278(8): 5557–5563.

Harkness ,J. E.,Wagner, J. E. (1994). The biology and medicine of Rabbits and Rodents, 4 Edition, Philadelphie. *Lea and Febiger*,96: 130-136.

Harpkiewick,K., Medina, L., Holmes, D. D. (1998). Clinical medicine of small Imammals and primates, 2nd Edition ; Chap 2, Rats : 31-39.

Henriksen,T.,Mahoney, E.,Steinber, D. (1983), Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, andVascularBiology*, 3(2): 149-159.

Hrycay, E. G., &Bandiera, S. M. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 74: 35–84.

Références bibliographiques

Hyang,R.(2005). The Korean journal of community living science, 16(1): 59-64.

—K—

KABOUCHE, S. (2010). Etude de la relation du thé vert. Maladies cardiovasculaires et Stress oxydant. Mémoire de magister .Université Mentouri – Constantine.

Karami-Mohajeri,S., Abdollahi, M.(2011).Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology* , 30(9): 1119-1140.

Kubab,N.(2007).Guide des analyses biologiques. Editonkarar : 36-84.

Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M., &Kensler, T. W. (2003). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 23(23): 8786–8794.

—L—

Lee, J. S., &Surh, Y. J. (2005). Nrf2 as a novel molecular target for, chemoprevention. *Cancer letters*, 224(2): 171–184.

Leeuwenburgh, C., &Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, 8(7): 829–838.

Levine, A. J., &Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*, 9(10): 749–758.

Li ,C., Miao ,X., Li, F., Wang ,S., Liu ,Q., Wang, Y., Sun ,J.(2017). Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 1–15.

Liu,Y.(2006). Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology and Medicine*,40(6): 960-967

Lochiot et Grima,M. (2004) introduction à la pharmacocinétique-passage transmembranaire, strasbourg : 30-40.

Loréal, O., Bardou-Jacquet, É., Island,M.L., Fatih, N., Doyard, M., Detivaud, L., Brissot,P. (2012). Métabolisme du fer. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(3) : 117–124.

Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." *Biochim Biophys Acta*, 1830(5): 3143-3153.

Lullmann-rauch. (2008). histologie, édition allemande : 449-46.

—M—

Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53: 401–426.

Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53: 401–426.

Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., Shyr, C., Wakabayashi, N., Kensler, T. W., Wasserman, W. W., & Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic acids research*, 38(17): 5718–5734.

Manivel, J. C., Bloomer, J. R., & Snover, D. C. (1987). Progressive bile duct injury after thiabendazole administration. *Gastroenterology*, 93(2) : 245–249.

Marilyne, S. (2008). Etude de la toxicité des médicament sponcor et mentézol en culture primaire d'hépatocytes. Université de Québec à Montreal , 44.

Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium [Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 51(6) : 304–315.

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8) : 595–603

Mette, M. (2001). Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, et avec quel objectif : 529.

Mienne, L., Scalbert, A. (2007). A new food composition table for dietary polyphenols. 10th European.

Migdal, C., Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Medecine sciences : M/S*, 27(4): 405–412.

Références bibliographiques

MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogentransfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144–148.

Mizutani, T., Ito, K., Nomura, H., &Nakanishi, K. (1990). Nephrotoxicity of thiabendazole in micedepleted of glutathione by treatment with DL-buthioninesulphoximine. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 28(3): 169–177.

Mohammed, M. T., Kadhim, S.M., Jassim, A. M. N. ,Abbas, S.I. (2015). Free radicals and humanhealth/ *International Journal of Innovation Sciences and research*,4(6): 218-223.

Moorehead, W. R., &Biggs, H. G. (1974). 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clinical chemistry*, 20(11) : 1458–1460.

—N—

Nacer, A., Bouras, S. (2014). Thé vert, catéchines et santé. Projet de fin d'étude .Université Kasdi Merbah de Ouerguela.

Namita, P., Mukesh, R., Vijay, K. J. (2012). *Camellia Sinensis (Green Tea): A Review* .*Global Journal of Pharmacology*, 6 (2): 52-59.

Neuzil, J., & Stocker, R. (1993). Bilirubinattenuates radical-mediated damage to serumalbumin. *FEBS letters*, 331(3) : 281–284.

Nicolas, X., Chevalie,r B., Klotz, F., Simon, F. (2006). Traitement des parasitoses intestinales (amibiase et mycoses exclues). *EMC - Gastro-Entérologie*,1(1) : 1–14

Nkhilie, Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse De Doctorat.

Université Cadi Ayyad – Marrakech, Université D'Avignon Et Des Pays De Vaucluse-Montpellier.

Nkhilie,Z., Tomao, V., EL haji H, EL Boustani, E. S., Chemat, F., Dangles,O.(2009). Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochemical Analysis*. Université Cadi Ayyad,Morocco.

Références bibliographiques

—O—

Ogata, M., Fujisawa, K., Ogino, Y., & Mano, E. (1984). Partition coefficients as a measure of bioconcentration potential of crudeoil compounds in fish and shellfish. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 33(5): 561–567.

Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 276(42): 38388–38393.

—P—

Pahl, H. L. (1999). Activators and targetgenes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49) : 6853–6866.

Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*,(276) : 89.

Pedruzzi, L. M., Stockler-Pinto, M. B., Leite, M., Jr, & Mafra, D. (2012). Nrf2-keap1 system versus NF-κB: the good and the evil in chronic kidney disease?. *Biochimie*, 94(12): 2461–2466.

Powers, S. K., & Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4): 1025–1033.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4) : 1243–1276.

—R—

ROCHE, J. (1947).Lerôle des phosphatase dans le métabolisme du calcium. *Annales De La Nutrition Et De L'alimentation*, 1(1) : 3-30.

ROOSEN-RUNGE, E. C., & GIESEL, L. O., Jr (1950). Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *The American journal of anatomy*, 87(1): 1–30.

Rosenstock, T. R., Carvalho, A. C., Jurkiewicz, A., Frussa-Filho, R., & Smaili, S. S. (2004). Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *Journal of neurochemistry*, 88(5): 1220–1228.

Références bibliographiques

Roy, M. A., Nugent, F. W., & Aretz, H. T. (1989). Micronodular cirrhosis after thiabendazole. *Digestive diseases and sciences*, 34(6): 938–941.

—S—

Sang, S. ., Hou, Z. ., You, H. ., Lee, M. J., Hong, J., Chin, K.V., Yang, C.Y. (2005). Mechanism of action of (–)-epigallocatechin-3-gallate: Auto-oxidation– dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition. *Cancer research*, 65 (17): 8049-8056.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4): 287–306.

SCHWARZ, A., SCHWEPPE, R. (2006) .Thé vert Elixir de vie pour le corps et l'esprit. Edition Vigot, Paris. France, 25(68): 73-74.

Sen, C. K. (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 79(3): 675–686.

Seo, J. C., Jeon, W. J., Park, S. S., Kim, S. H., Lee, K. M., Chae, H. B., Park, S. M., & Youn, S. J. (2006). *The Korean journal of hepatology*, 12(1):74–81.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., & Cillard, J. (2001). Alcool et stress oxydatif [Alcohol and oxidative stress]. *Pathologie-biologie*, 49(9): 689–695.

Sharangi, A. B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (camellia asinensis l.). *Food Research International*: 529–535.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3C): 31S–38S.

Stierum, R., Conesa, A., Heijne, W., Ommen, B. v., Junker, K., Scott, M. P., Price, R. J., Meredith, C., Lake, B. G., & Groten, J. (2008). Transcriptome analysis provides new insights into liver changes induced in the rat upon dietary administration of the food additives butylated hydroxytoluene, curcumin, propyl gallate and thiabendazole. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(8): 2616–2628.

Storz, P., & Toker, A. (2003). NF-kappaB signaling--an alternate pathway for oxidative stress responses. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(1): 9–10.

Références bibliographiques

Sugihara, N., Shimomichi, K., & Furuno, K. (1997). Cytotoxicity of food preservatives in cultured rat hepatocytes loaded with linolenic acid. *Toxicology*, 120(1): 29–36.

—T—

Tada, Y., Yoneyama, M., Kabashima, J., Fujitani, T., & Nakano, M. (1989). Effects of thiabendazole on the kidneys of ICR mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 27(5): 307–315.

Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 16(2): 123–140

Tietz, N. W., Saunders, W. B. (1987). *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Philadelphia: 385-386.

Tietz, N. W., Saunders, W. B., Burtis, C. A., Shwood, E. R. (1999). *Text book of clinical chemistry* 3rd Edition, 1935(1406): 1435-1439.

Tocco, D. J., Rosenblum, C., Martin, C. M., & Robinson, H. J. (1966). Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Toxicology and applied pharmacology*, 9(1): 31–39.

Tsuchiya, M., Matsusue, T., & Sakaki, H. (1987). Tunneling escape rate of electrons from quantum well in double-barrier hetero structures. *Physical review letters*, 59(20): 2356–2359.

—U—

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2002). Thiabendazole and salts.

—W—

Weiss, M. J., Cole, D. E., Ray, K., Whyte, M. P., Lafferty, M. A., Mulivor, R. A., & Harris, H. (1988). A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20): 7666–7669.

Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., & Halliwell, B. (2002). A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962: 242–259.

Références bibliographiques

—Y—

Yarnell, W. (2005). Tea, Black/Green *Camellia sinensis*(L.) Kuntze .Clinical over view. The ABC Clinical Guide to Herbs: 335-345.

Yashin, A., Yashin, Y., Nemzer,B.(2011). Determination of antioxidant activity in teaextracts, and their total antioxidant content. *Am. J. Biomed. Sci*, 3(4) : 322-335.

Yzydorkzyk, C. (2011). Rôle du stress oxydant en période néonatale dans l'hypertension artérielle et la dysfonction vasculaire et métabolique de l'adulte.

—Z—

Zhu, H., Zhang, L., Amin, A. R., & Li, Y. (2008). Coordinated up regulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 233(6): 753–765.

Annexe 01 : composition de la plaque

Composition de la plaque

Composants actifs par cm²

55 µg phosphatent de p-nitrophényle.

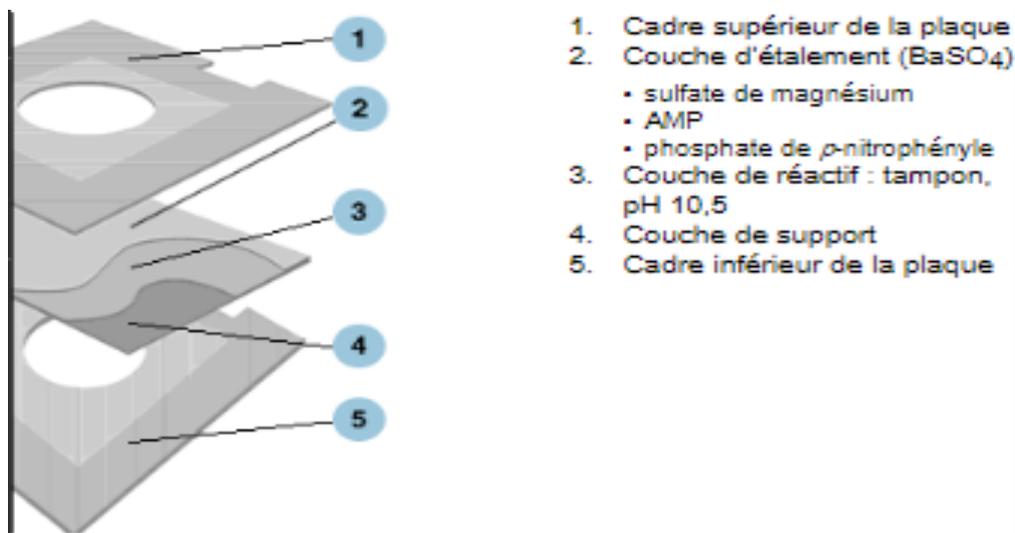
0,1 mg de 2-amino-2-méthyl-1-propanol (AMP).

1,6 µg sulfate de magnésium.

Autres composants

Pigment, liants, tampons, tensioactifs, agent de réticulation et stabilisant

Annexe 02: Structure de la plaque



Annexe 03 : Manipulation des réactifs

-aspecter soigneusement l'emballage pour s'assurer qu'il n'est pas endommagé.

-Si un instrument pointu est utilisé pour ouvrir l'emballage externe, veillé à ne pas endommager l'emballage des cartouches individuelles.

Annexe 04 : Préparation des réactifs

1. Retirer les cartouches de plaques de leur lieu de conservation.
2. Laisser la cartouche, dans son emballage, revenir à température ambiante pendant 30 minutes après retrait du réfrigérateur ou 60 minutes après retrait du congélateur.
3. Retirer la cartouche de son emballage et la charger dans la réserve de plaques.

Annexe 05 : Calibrage

Étalons requis Jeu d'échantillons de calibrage VITROS Chemistry Products Calibrator Kit 3

Préparation, manipulation et conservation des étalons

Se reporter au feuillet technique du jeu d'échantillons de calibrage VITROS Calibrator Kit 3

Annexe 06 : La liste du matériel non biologique utilisé dans expérimentation.

Matériel utilisé	Appareillage utilisé
Micropipettes.	Balance de précision.
Tubes à essais.	Centrifugeuse.
Tubes secs.	Etuve.
Entonnoirs.	Plaque chauffante.
Embouts.	Spectrophotomètre
Béchers.	Automate VITROS 4600
Surreingues.	
Les plaques ALKP VITROS.	
Les plaques fer VITROS.	
Les plaques calcium VITROS.	

Résumé

Le thiabendazole (TBZ) est un médicament antifongique et antihelminthique à large spectre capable de produire des dommages notamment hépatique, ces effets toxiques sont due au métabolisme de 5-OHTBZ qui induit le stress oxydant. Le thé vert considéré comme un antioxydant riche en polyphénols nécessaire pour neutraliser l'effet du TBZ. Le but de ce travail est d'étudier l'effet de l'administration du thiabendazole et du thé vert pendant un mois sur le foie du rat blanc *Rattus norvegicus*, Par le dosage de taux plasmatique de PAL, de fer et de calcium.

Nos résultats montrent que l'administration du thiabendazole a engendré une augmentation significative du taux plasmatique de PAL, de Fer et de calcium. L'administration du thé vert a corrigé les perturbations des taux de fer et de PAL induit par TBZ, cependant aucun effet n'a été observé sur le taux de calcium. La prise des extraits du thé vert semble avoir des effets bénéfiques contre des différents phénomènes oxydatifs.

Abstract

Thiabendazole (TBZ) is a broad spectrum antifungal and anthelmintic drug capable of producing damage, in particular hepatic damage, these toxic effects are due to the metabolism of 5-OHTBZ which induces oxidative stress. Green tea considered to be an antioxidant rich in polyphenols necessary to neutralize the effect of TBZ. The aim of this work is to study the effect of the administration of thiabendazole and green tea for one month on the liver of the white rat *Rattus norvegicus*, by assaying plasma levels of PAL, iron and calcium.

Our results show that the administration of thiabendazole produced a significant increase in plasma levels of PAL, iron and calcium. Administration of green tea corrected the disturbances in iron and PAL levels induced by TBZ, however no effect on calcium levels was observed. Taking green tea extracts seems to have beneficial effects against various oxidative phenomena.

الملخص

الثيابندازول هو دواء واسع الطيف مضاد للفطريات وطارد للديدان قادر على إحداث أضرار خاصة على الكبد . وهذه التأثيرات السامة ناتجة عن استقلاب 5-OHTBZ الذي يحفز الإجهاد التأكسدي . يعتبر الشاي الأخضر من مضادات الأكسدة الغنية بالبوليفينول الضروري لتحديد تأثير TBZ. الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير تناول الثيابندازول والشاي الأخضر لمدة شهر على كبد الجرذ الأبيض *Rattus norvegicus* وذلك بمعايرة مستويات الكالسيوم والحديد والفوسفاتاز القلوي في البلازما .

أظهرت نتائجنا أن تناول الثيابندازول أدى إلى زيادة مستويات الحديد و الكالسيوم والفوسفاتاز القلوي في البلازما ، وأن تناول الشاي الأخضر صحح هذه الاضطرابات في مستويات الحديد و الفوسفاتاز القلوي التي يسببها TBZ، ولكن لم يلاحظ أي تأثير على مستويات الكالسيوم. يبدو أن تناول مستخلصات الشاي الأخضر له آثار مفيدة ضد ظواهر الأكسدة المختلفة.