



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE ABBES LAGHROUR –KHENCHELA**

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département : *Biologie Moléculaire et Cellulaire*

**MEMOIRE**

*Présenté Pour l'obtention du diplôme de*

**MASTER ACADEMIQUE**

Filière : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie appliquée

**Thème**

**Evaluation de la toxicité tissulaire et hématologique  
du Benzène chez le rat femelle de souche *Wistar***

**Présenté par :**

- Doukhan Fattoum
- Remili Nadjat

**Soutenu le 10/06/2015**

**Devant le jury :**

Président :	Rais Lynda	MAA	Université Abbas Laghrour –Khenchela-
Encadreur :	Bouakkaz Amel	MAA	Université Abbas Laghrour –Khenchela-
Examineur :	Messai Alima	MAB	Université Abbas Laghrour –Khenchela-

**Promotion : juin2015**

# REMERCIEMENTS :

*En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU , notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à remercier Mme BOUAKKAZ AMEL Pour avoir accepté de diriger notre travaux, pour son aide précieux, ses encouragements et pour ses conseils tout le long de ce travail.*

*Nous remercions également les membres du jury Mme : RAIS LYNDIA et Mme MASSAI ALIMA pour avoir accepté d'évaluer et de juger ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribués à notre formation surtout Ms HABIBATNI .*

*Nous remercions également notre amies Zohra et Khalida pour nous aider pour l'obtention des rats de l'institut pasteur d'Alger et aussi Sara et Sana pour nous aider au sacrifice des rats.*

*Nos derniers Rmerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

## DEDICACES :

*Aux deux êtres qui sont les plus chers, ceux qui ont fait que je sois ici aujourd'hui et grâce.....Ma mère et Mon père, vous qui m'avez élevé et éduqué.....vous qui avez toujours été là pour moi et n'avez jamais cessé de croire en moi, aucun mot ni aucun langage ne pourrait exprimer ma profonde gratitude à votre égard.*

*A mon très cher mari HASSANE ABOUDE Quand je t'ai connu, j'ai trouvé*

*L'homme de ma vie, la lumière de mon chemin. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises. Ton soutien, ta gentillesse sans égal, ton attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

*A mon cher frère Mourad.*

*A mes très chères sœurs ILHAM, SARA et BOUTHAINA*

*A tous les membres de mon deuxième famille MA mère, Fouzi, Souad, Dounia, Ayoub, rawya et Samia.*

*A tous mes amis : Fattoum, Sara, sana, radja, abd lmalak, ...*

*A toute la famille REMILI.*

*A toute la promotion de master Biochimie Appliquée Année 2014-2015*

*REMILI Nadjet*

## DEDICACES :

*Je dédie ce mémoire à mes parents : Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.*

*Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*A mes très chères (kharwala, Hadjer, Keoka, Djamila, Afafe, Nesma, Saida, Lwiza, Chayma, Hanane, Sara, Rima)*

*A mes frères (Aiyach, Abde Albaki, Ismail, Azzdine, Abde ALwahabe, Wanns)*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis et mes collègues : Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie (Nadjet, Bahiya, Sara, Sana, kharwala, Hada, khalida)*

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.*

*Doukhiane fattoum*

# Liste des figures

---

## Liste des figures

<b>Figure01 :</b>	origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).....	10
<b>Figure02 :</b>	Les trois types de la SOD (Frank <i>et al</i> , 2004).....	16
<b>Figure03 :</b>	Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C) (May <i>et al</i> .1997).....	18
<b>Figure04 :</b>	schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	22
<b>Figure05 :</b>	Variation de la concentration de l'urée, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	27
<b>Figure06 :</b>	Variation de la concentration de créatinine, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	28
<b>Figure07 :</b>	Variation des taux de globules rouges, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	29
<b>Figure08 :</b>	Variation du taux de lymphocytes, chez les rattes témoins et traitées au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	30
<b>Figure09 :</b>	Variation des taux globules blanc, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	31
<b>Figure10 :</b>	Le rapport hépato- somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel .....	32
<b>Figure11 :</b>	Le rapport reino- somatique , chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	33
<b>Figure12 :</b>	Le rapport spléno - somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	34

## Liste des tableaux

---

### Liste des tableaux

<b>Tableau01:</b>	présentation de benzène.....	03
<b>Tableau02:</b>	Principaux radicaux libre et leur structure chimique (Haton, 2005).....	12
<b>Tableau03:</b>	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associée...	19
<b>Tableau04:</b>	Variation de la contraction sérique de l'urée, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	27
<b>Tableau05:</b>	Variation de la contraction sérique de créatinine, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	28
<b>Tableau06:</b>	Variation des taux globules rouges, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	29
<b>Tableau07:</b>	Variation du taux des lymphocytes, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	30
<b>Tableau08:</b>	Variation du taux globule blanc chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	31
<b>Tableau09:</b>	Variation du rapport hépato- somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	32
<b>Tableau10:</b>	Variation du rapport reino- somatique, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	33
<b>Tableau11:</b>	Variation du rapport spléno - somatique, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.....	34

# Abréviations

---

## Abréviations

<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>DL</b>	: Décilitre
<b>EDTA</b>	: Ethylène diamine tétra-acétique acid
<b>ERO</b>	: Espèces Réactives De l'oxygène
<b>GB</b>	: Globule blanc
<b>GR</b>	: Globule rouge
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peroxyde d'hydrogène
<b>HOO<sup>o</sup></b>	: Radical hydroperoxyde
<b>Kg</b>	: Kilogramme
<b>L</b>	: Liter
<b>LDL</b>	: Lipoprotéines de densité légère
<b>MDA</b>	: Malon dialdéhyde
<b>Mg</b>	: Milligramme
<b>NADPH</b>	: Nicotine amide di nucléotide phosphate
<b>O<sub>2</sub><sup>1</sup></b>	: Oxygène singulet
<b>O<sub>2</sub><sup>o-</sup></b>	: Anion superoxyde
<b>•OH</b>	: Radical hydroxyle
<b>PPM</b>	: Particule par million
<b>ROO<sup>o</sup></b>	: Radical alkoxyde
<b>SOD</b>	: Superoxy dedimustase
<b>THB</b>	: Tri hydroxy benzène
<b>%</b>	: Pourcentage

# Table des matières

---

## Table des matières

<b>Remerciements</b>	
<b>Liste des figures</b> .....	I
<b>Liste des tableaux</b> .....	II
<b>Abréviations</b> .....	III
<b>Table des matières</b> .....	IV
<b>Introduction</b> :.....	01
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : la toxicité de benzène</b> .....	03
<b>I.1.La molécule du benzène</b> :.....	03
<b>I.1.1. La structure de benzène</b> :.....	03
<b>I.1.2. La source de benzène</b> :.....	03
<b>I.1.3. L'utilisation</b> :.....	04
<b>I.1.4. Devenir dans l'organisme</b> :.....	04
<b>I.1.5. Evaluation toxicologique</b> :.....	06
1. toxicité aiguë :.....	06
2. toxicité chronique et subchronique :.....	06
<b>I.1.6. les effets du benzène sur la reproduction et génotoxicité</b> :.....	06
<b>Chapitre II : Le stress oxydatif et les antioxydants</b> :.....	08
<b>II.1.Le stress oxydatif et les antioxydants</b> :.....	08
<b>II.1.1. Définition</b> :.....	08
<b>II.1.2. Les radicaux libres</b> :.....	08
<b>II.1.3. La source et l'origine</b> :.....	08
<b>II.2.La nature des radicaux libres</b> :.....	10
<b>II.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)</b> :.....	10
<b>II.2.2. Les espèces libres non oxygénées</b> :.....	11
<b>II.2.3. Le stress oxydatif</b> :.....	12
<b>II.2.4. Conséquences biologique de stress oxydatif</b> :.....	12
<b>II.2.5. Implications pathologiques du stress oxydatif</b> :.....	15
<b>II.2.6. Systèmes de défenses antioxydant</b> :.....	15
<b>II.2.7. Antioxydants enzymatiques</b> :.....	16
<b>II.2.8. Les Antioxydants non enzymatiques</b> :.....	17
1. Vitamine E:.....	18
2. Vitamine C:.....	18
3. les caroténoïdes:.....	19

# Table des matières

## Partie expérimentale

<b>I. Matériel et méthodes :</b> .....	20
<b>I.1. Matériel :</b> .....	20
<b>I.1.1. Matériel biologique :</b> .....	20
<b>I.2. Condition d'élevage:</b> .....	20
<b>I.3. Nutrition :</b> .....	20
<b>I.1.2. Méthodologie :</b> .....	20
<b>I.2.1. Traitement au benzène :</b> .....	20
<b>1. Présentation de la molécule :</b> .....	20
<b>2. Mode de traitement:</b> .....	21
<b>I.2.2. Prélèvements :</b> .....	21
<b>1. Prélèvement sanguin :</b> .....	21
<b>2. Prélèvement d'organes :</b> .....	21
<b>I.3. Dosage enzymo-colorimétrique :</b> .....	23
<b>I.1. Dosage enzymo-colorimétrique de la créatinine :</b> .....	23
<b>I.2. Dosage enzymo-colorimétrique d'urée :</b> .....	24
<b>I.4. Evaluation de la toxicité hématologique :</b> .....	26
<b>I.5. Analyses statistiques :</b> .....	26
<b>II. Résultats et discussion: .....</b>	<b>27</b>
<b>II.1. Résultats : .....</b>	<b>27</b>
<b>II.1.1. Effets du benzène sur les paramètres biochimique :</b> .....	<b>27</b>
<b>1. La concentration sérique de l'urée :</b> .....	<b>27</b>
<b>2. La concentration de créatinine:</b> .....	<b>28</b>
<b>II.1.2. Effets du benzène sur les paramètres hématologiques :</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Taux des globules rouges :</b> .....	<b>29</b>
<b>II.1.3. Évaluation de la riposte immunitaire :</b> .....	<b>30</b>
<b>1. Taux des lymphocytes:</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Taux de globules blanc:</b> .....	<b>31</b>
<b>II.1.4. Evaluation de l'atteinte tissulaire:</b> .....	<b>32</b>
<b>II.4.1. Etat pondéral des organes:</b> .....	<b>32</b>
<b>1. Au niveau du foie :</b> .....	<b>32</b>
<b>2. Au niveau des reins :</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Au niveau de la rate :</b> .....	<b>34</b>
<b>III.2. Discussion :</b> .....	<b>35</b>
<b>IV. Conclusion et Perspectives :</b> .....	<b>38</b>
<b>V. Références Bibliographiques :</b> .....	<b>39</b>
<b>Résumés</b>	

# Introduction Générale

### Introduction

L'être vivant subit durant sa vie plusieurs agressions physiques et organiques, entraînerait plusieurs modifications dans l'activité physiologique et aurait pour conséquence une perturbation de l'homéostasie qui dépend de l'étroite coordination entre les systèmes de communication intercellulaire.

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes anti oxydants et les systèmes pro oxydants. Ce déséquilibre implique la production d'espèces réactives de l'oxygène, source d'effets toxiques potentiels (Halliwell et Gttridge, 1992). La formation des espèces réactives de l'oxygène est liée à des phénomènes physiologiques comme la respiration cellulaire, la synthèse de prostaglandines et des leucotriènes ou encore l'activité phagocytaire (Ineris, 2003). Cependant, elles peuvent également provenir de composés exogènes à l'organisme parmi lesquels figurent de nombreux contaminants chimiques tels que les xénobiotiques organiques et certains métaux lourds (Stohs et Bagchi, 1995 ; Cossu *et al.*, 1997b).

L'étude du métabolisme des xénobiotiques constitue une étape fondamentale pour une compréhension rationnelle de la pharmacologie, de la toxicologie et de la toxicomanie (Worgram *et al.*, 2001; Schroder *et al.*, 2000). Parmi toute la série de xénobiotiques polluants, il se trouve que le benzène occupe une place privilégiée compte tenu de sa nocéité particulière sur l'environnement et la santé publique (Atsdr., 1999; Baars *et al.*, 2001; HSDR., 2000; 2003; OEHHA., 2003).

Le benzène est un hydrocarbure aromatique polycyclique qui a fait l'objet de nombreuses recherches (Asdr 1997 ; CE 2001). Ces recherches se sont avérées primordiales compte tenu de la généralisation dans l'utilisation de ce produit que l'on retrouve, non seulement, dans tous les milieux, mais également à différentes concentrations, et surtout sous différentes formes dérivées (chlorobenzène, hexaschlorobenzène, styrène... etc), ce qui explique l'ampleur de sa propagation. La voie d'exposition majoritaire pour le benzène est l'inhalation (Bisson *et al.*, 2000). 50% de la quantité inhalée est absorbée. Le benzène est facilement absorbé par voie orale (Sandmeyer ,1981).

Le benzène possède un tropisme préférentiel vers les graisses et les tissus riches en lipides (Winek et Collom, 1971). Il s'accumule également dans la moelle osseuse et dans le

tissu de l'axe cérébro- spinal ; on en trouve des quantités intermédiaires dans le foie et de faibles quantités dans la rate et le sang (Holliday *et al.*, 1984).

L'absorption de benzène constitue une agression chimique pouvant s'exprimer à court, moyen ou long terme par des lésions plus au moins importantes, des déficiences ou des maladies aiguës ou chroniques (Van Damme *et al.*, 1992 ; Van Damme, 1996).

Concernant la toxicité aiguë, des effets aigus réversibles sur le système nerveux central, se manifestent par une perte des réflexes, une perte de connaissance, des spasmes (Reich, 1934).

Concernant l'intoxication chronique au benzène, de nombreuses études ont mis en évidence des effets hémotoxiques (Askoy *et al.*, 1971 ; Smith, 1996 ; Collins *et al.*, 1997) . L'atteinte de la moelle osseuse constitue l'un des premiers signes, se manifestant par une leucopénie, anémie, thrombopénie voire une combinaison des trois (Snyder, 1984).

D'autre part, le benzène est considéré comme un polluant leucémogène et cancérigène. Cette incrimination est basée sur des études épidémiologiques supplémentaires. Des cas rapportés de travailleurs exposés ont élargi la cancérogénicité du benzène à toutes les principales formes de leucémies (Linnet *et al.*, 1996 ; Savitz et Andrews, 1997) et en particulier à la leucémie myéloïde aiguë et ses variantes (Hayes *et al.*, 1999), à la leucémie lymphoïde aiguë (De Coufle *et al.*, 1983 ; Bond *et al.*, 1986 ; Shuet *et al.*, 1988 ; Hayes *et al.*, 1997) et à la leucémie lymphoïde chronique (MacMichael *et al.*, 1975).

Dans ce contexte, notre problématique tend à mettre en évidence les retombées d'une agression chimique par le benzène chez le rat femelle de la souche *Wister*. L'étude qui en découle vise les objectifs suivants:

- Dosage de quelques paramètres biochimiques ;
- Etude de l'état pondéral des organes : immunitaire, métabolique et excréteur.
- Evaluation de la riposte immunitaire à travers la réalisation du dénombrement lymphocytaire.
- Evaluation de l'atteinte hématologique par le dénombrement de tous les éléments figurés du sang.

# Synthèse Bibliographique

# Chapitre I :

## la toxicité du benzène

## I. la toxicité du benzène

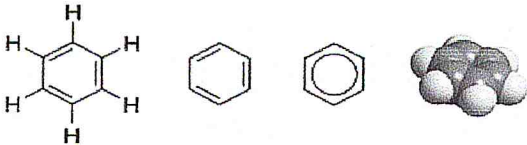
### I.1. La molécule du benzène

#### I.1.1. La structure de benzène :

Le benzène ( $C_6H_6$ ) est un hydrocarbure aromatique simple qui, à température ambiante, est sous forme de liquide incolore, volatil et très inflammable. Il a une odeur aromatique caractéristique ayant un seuil olfactif variant entre 4,7 à 100 ppm dans l'air et de 2 mg/l dans l'eau et un seuil de goût entre 0,5 et 4,5 mg/l (Atsdr, 2007).

Le benzène est relativement soluble dans l'eau et dans la majorité des solvants organiques. Il se concentre peu dans les organismes aquatiques (coefficient de bioconcentration de 1 à 20) (Hsdb, 2005). Sa demi-vie dans l'eau varie entre 1 heure et 720 jours selon qu'il s'agit d'eau de surface ou d'eau souterraine ou encore selon certaines conditions environnementales (ex. : saisons) (Hsdb, 2005; Santé Canada, 2009).

**Tableau 01** : présentation de benzène (Ineris,2006).

Substance chimique	Forme physique
	<p>Gaz</p> <p>Liquide</p>

#### I.1.2. La source de benzène :

La présence de benzène dans l'environnement est naturelle (feux de forêts, activité volcanique) ou anthropique. L'automobile est en grande partie responsable de la pollution atmosphérique par le benzène (gaz d'échappement, émanations lors de remplissage des réservoirs). Les rejets d'eaux et les décharges industrielles, les lixiviats de décharges ou de sols contaminés, les fuites de stockages enterrés d'essence peuvent être à l'origine de la pollution de l'eau et du sol par le benzène. L'eau de mer peut également être contaminée par des fuites se produisant lors de transport maritimes.

### I.1.3-L'utilisation :

Le benzène était utilisé en grandes quantités en tant que solvant et produit nettoyant dans les imprimeries et dans l'industrie chimique et de transformation des métaux, ainsi qu'en tant que diluant pour les colles liquides, en particulier dans la production de chaussures. Aussi aujourd'hui un grand nombre de synthèses organiques sont encore fabriquées à partir de cette substance. En tant que constituant naturel du pétrole brut, le benzène entre dans la composition des carburants automobiles en tant qu'agent antidétonant. Il faut donc s'attendre à ce que des travailleurs soient exposés au benzène notamment dans l'industrie du raffinage du pétrole, lors de la production et de la distribution des carburants et dans le cadre de l'utilisation, de l'entretien et de la réparation des moteurs à explosion (Wong O, 1995).

### I.1.4. Devenir dans l'organisme :

La voie d'exposition principale pour le benzène est l'inhalation, 50% de la quantité inhalée sont absorbés (Nomiyama., 1974a, Pekari *et al*, 1992). Ces données chez l'homme sont concordantes avec les observations chez l'animal (Sabourin *et al*, 1987).

Le benzène est facilement absorbé par voie digestive chez les espèces animales testées (rats, hamsters, souris, lapins). Il n'existe pas de données chez l'homme mais il est estimé que l'absorption du benzène chez l'homme serait complète. L'absorption cutanée est possible (0,4mg/cm<sup>2</sup>/h) mais demeure une source secondaire d'exposition (Maibach et Anjo, 1981). Le benzène est rapidement distribué via le sang à l'ensemble de l'organisme.

Du fait de sa grande lipophilie, les concentrations tissulaires seront plus élevées dans la moelle osseuse et dans les graisses. Le benzène est éliminé sous une forme inchangée dans les urines (1%) et dans l'air expiré (10 à 50%) selon l'activité physique et l'importance du tissu adipeux (Maibach et Anjo, 1981).

La fraction expirée augmente avec l'exposition du fait d'une saturation des voies métaboliques. La transformation métabolique du benzène est hépatique et médullaire, la quasi-totalité des métabolites à une structure cyclique (Maibach et Anjo, 1981). La première étape consiste en une hydroxylation catalysée par le cytochrome P450 2<sup>E1</sup> conduisant à la formation d'un benzène-époxyde (qui est en équilibre avec la forme oxépine).

Trois voies métaboliques peuvent être empruntées par cet intermédiaire très électrophile :

➤ **Réarrangement non enzymatique du benzène-époxyde en phénol :**

Le phénol peut être hydroxylé en hydroxyquinone qui conduit à la production de p benzoquinone ou de 1, 2,4-trihydroxybenzène. Le phénol peut aussi être hydroxylé en catéchol qui formera soit de l'O-benzoquinone soit du 1, 2,4- trihydroxybenzène (THB). Ce dernier composé apparaît chez l'homme principalement formé à partir de l'hydroquinone. Tous ces métabolites subiront des réactions de phase 2 conduisant à leur excrétion sous forme de glucuro-et sulfo-conjugués, d'acide mercapturique, voire d'adduits d'ADN (Maibach et Anjo, 1981).

➤ **Transformation du benzène-époxyde en benzène-dihydrodiol :**

Sous l'action d'une enzyme époxyde-hydrase. Ce diol suit deux voies métaboliques : soit la réduction sous l'action d'une déshydrogénase formant le catéchol, soit l'ouverture en transe du cycle formant un aldéhyde, La transmuconaldéhyde. Cet aldéhyde est alors oxydé en acide transmuconique éliminé dans les urines (demi-vie d'environ 6 heures) (Maibach et Anjo, 1981).

➤ **Conjugaison au glutathion catalysée par une glutathion-s-époxyde transférase** en 1glutathionyl 2-OH-3,5 cyclohexadiène puis en acide s-phénylmercapturique en milieu acide, qui s'élimine dans les urines. La toxicité du benzène sur la moelle osseuse (dépression de l'activité médullaire et effet leucémogène) est liée à l'action des métabolites (Lee *et al*, 1993) ; dans une expérience observant la relation dose-effet chez la souris de l'incorporation du fer dans les globules rouges (pris comme évaluation de l'érythropoïèse), ont pu déterminer les potentialités toxiques de chaque métabolite. Dans cette expérience, le THB n'apparaît pas toxique alors qu'il induit l'apoptose dans des cultures cellulaires humaines (Lee *et al*, 1993).

### **I .1.5. Evaluation toxicologique :**

#### **1.Toxicité aiguë :**

Chez l'homme, l'intoxication à de fortes concentrations de benzène dans l'air (> 50 ppm) affecte le système nerveux central et provoque notamment des étourdissements, des nausées, des vomissements. L'intoxication aiguë (> 1000 ppm) peut même causer la mort dans certains cas d'hémorragie sévère, d'inflammation pulmonaire, de congestion rénale ou d'œdème cérébral

(OMS, 2003; Santé Canada, 2009). La dose orale létale chez l'humain est estimée à environ 125 mg/kg pour un adulte de 70 kg (Atsdr, 2007). Missements, des céphalées et de la somnolence (Santé Canada, 2009).

### **2.Toxicité chronique:**

L'exposition prolongée au benzène provoque une immuno-toxicité et une hémato toxicité, quelle que soit la voie d'absorption. La toxicité du benzène cible particulièrement les organes hématopoïétiques, en particulier la moelle osseuse. Ainsi, l'exposition au benzène entraîne chez l'humain une diminution du nombre absolu de lymphocytes (affectation la plus sensible) et cause divers désordres hématologiques : anémie aplasique, pancytopénie, thrombopénie, granulopénie ou lymphopénie (Santé Canada, 2009; U.S.EPA, 2002).

Les effets hémato toxiques du benzène sur les granulocytes, les lymphocytes et les plaquettes sont détectables, même suivant des concentrations d'exposition aussi faibles que 1 ppm (Lan *et al*, 2004). Le benzène affecte aussi l'immunité humorale (niveaux d'anticorps) et cellulaire (leucopénie) (Atsdr, 2007). Chez les animaux de laboratoire, les effets sont similaires à ceux de l'humain, quoiqu'on observe principalement les effets suivants : lymphopénie, leucopénie, anémie, diminution des lymphocytes B dans les tissus hématopoïétiques, diminution de l'activation des lymphocytes B et T ainsi que modification de la morphologie et de la cellularité de la moelle osseuse (Cal EPA, 2001; Santé Canada, 2009).

#### **I.1.6.les effets du benzène sur la reproduction et génotoxicité :**

L'impact nociceptif du benzène sur la fonction de reproduction et de développement embryonnaire a fait l'objet de travaux qui restent, cependant, très insuffisants. Des milliers de substances chimiques dangereuses contenant cet agent actif sont produites et employées sur un large éventail de lieux de travail partout dans le monde. Certaines de ces substances peuvent endommager la fonction de reproduction des travailleurs qui y sont exposés (Ungvary, 1980). Bien qu'on ait signalé des effets sur le développement néonatal chez des ouvrières exposées professionnellement au benzène, les études existantes ne permettent pas d'évaluer adéquatement les risques potentiels associés à l'exposition de benzène à cause de faiblesses méthodologiques telles que le manque de documentation sur la nature ou l'importance de l'exposition, une exposition concurrente à d'autres composés et dans certains cas, l'absence de groupes témoins ( Atsdr, 1997 ; Bisson *et al.*, 2005).

De plus, le benzène traverse la barrière placentaire et est retrouvé dans la moelle osseuse du fœtus à des niveaux supérieurs ou égaux à ceux mesurés chez la mère exposée par inhalation (Dowty *et al*, 1976).

Chapitre II :  
Le stress  
oxydatif et les antioxydants

## II.1. le stress oxydatif et les antioxydants

### II.1.1. Définition :

Lors d'une contamination par un xénobiotique, l'organisme développe une stratégie adaptative qui s'illustre par la production de radicaux libres dont les effets sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production (Fiorani *et al.*, 1995 ; Aourousseau, 2002). Ainsi, une production transitoire et modérée des radicaux libres correspond à un mécanisme de défense de la cellule (Fiorani *et al.*, 1995 ; Aourousseau, 2002) . Lorsque cette production est récurrente ou chronique (tout en restant modérée dans son intensité), la balance entre production des radicaux libres et systèmes de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue, et on parle alors de stress oxydatif. Si la production de radicaux libres est suffisamment importante pour altérer de manière irréversible des processus cellulaires vitaux, elle déclenche l'apoptose et la mort cellulaire. Lorsque les radicaux libres sont générés en quantités massives, ils entraînent la nécrose cellulaire.

La surproduction des EOR au de-là des capacités antioxydants des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement (Koechlin.Ramonatxo, 2006).

### II.1.2. Les radicaux libres :

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron ou plus non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres (May *et al.*, 1997).

### II.1.3. La source et l'origine :

Ces espèces radicalaires, caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires dans une orbitale externe, sont produites *in vivo* (Fridovich, 1975 ; Kehrer, 1993). La principale source d'ERO est la chaîne de transfert d'électron (Sohal *et al.*, 1990). Les ERO peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi l'O<sup>2</sup> peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), et produit le peroxy-nitrite ONOO qui peut inhiber la chaîne respiratoire (Shiva, 2004) et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN) (Bohr, 2002 ; Stevnsnr, 2002 ; Echtay, 2003).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase ; enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions super oxydes aux niveaux de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers (Favier, 2003). D'autres sources dépendent d'enzymes comme les xanthines oxydases, les oxydases membranaires, les synthétases de l'oxyde nitrique, qui produisent physiologiquement des oxydants (Lamprecht *et al* 2004, Bloomer *et al* 2004, Radaket *al* 2008). Les métaux toxiques (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peut réactive  $H_2O_2$ , par une réaction appelée réaction de fenton. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau de cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines (Favier, 2003).

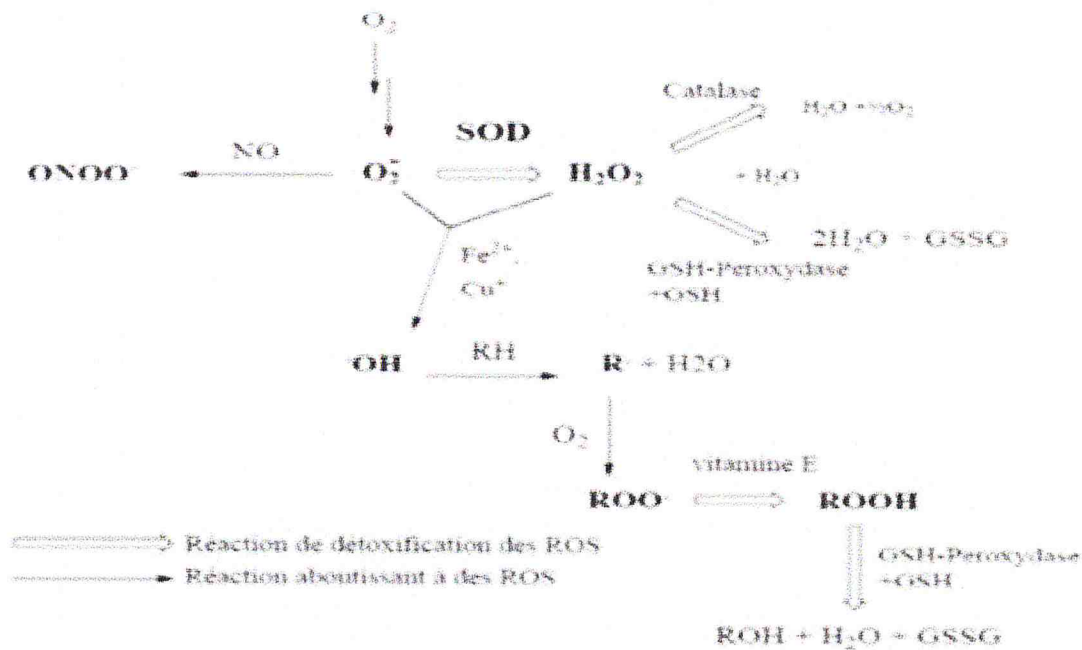


Figure01 : origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie ( Favier ,2003).

## II.2.La nature des radicaux libres :

### II.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) :

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière, En effet il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe, cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (Delattre *et al.*, 2005).

#### a. Ion super oxyde ( $\text{O}_2^\ominus$ ) : $\text{O}_2 + 1\text{e}^-$ :

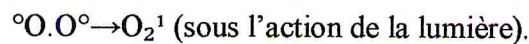
L'ion super oxyde ( $\text{O}_2^\ominus$ ) est une dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascade de réaction conduisant à la production des molécules très nocives (Delattre *et al.*, 2005).

#### b. Radical libre hydroxyle $\text{OH}^\ominus$ :

Le radical libre hydroxyle  $\text{OH}^\ominus$  est très réactif il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose, c'est un dérivé de l'ion su peroxyde.

Il peut être produit à la suite de diverse réaction, Nous en citerons une réaction à titre d'exemple :

- La réaction de Fenton : elle est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition de peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux (**Comhair** oxyder de nombreuses molécules, Il est formé à partir de l'ion super oxyde selon la réaction suivante (**Delattre *et al.*, 2005**) :



### **II.2.2.Les espèces libres non oxygénées :**

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions des certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'activation des espèces oxygénées sur la membrane biologique, les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives nocives. (**Haton, 2005**).

Tableau 02: Principaux radicaux libre et leur structure chimique (Haton, 2005).

Radicaux libre (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\circ$
Radical hydroperoxyde	$\text{HOO}^\circ$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\circ$
Radical alkoxyde	$\text{RO}^\circ$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Peroxynitrite	$\text{ONOO}^\circ$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\circ-}$

### II.2.3. Le stress oxydatif :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydants. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acide nucléiques (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (Angelos *et al.* 2005) (Wolin *et al.* 1996) (Wolin *et al.* 2005).

### II.2.4. Conséquences biologique de stress oxydatif :

#### a. Peroxydation lipidique :

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés

entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée **peroxydation lipidique** forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al, 1992**). La présence d'oxygène dans le milieu est nécessaire pour initier la réaction.

Les hydro peroxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal (**Favier, 2003**).

La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (**Favier, 2003**). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires.

Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**).

Il existe une très grande variété de produits et sous-produits de la peroxydation lipidique, souvent utilisés comme des biomarqueurs, et dont les rôles et les interactions seront tant physiologiques que pathologiques (**Porter et al.1995, Clarkson et al. 2000, Finaud et al. 2006**).

#### **b.Oxydation des protéines :**

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation, aboutissant à la formation de produits carbonylés et hydroxylés. Les acides aminés soufrés dont la cystéine et la méthionine, les acides aminés basiques (Arg, Leu) et les acides aminés aromatiques tels que tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine sont plus particulièrement sensibles à ces phénomènes. En effet, les protéines peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. Lors d'un stress oxydatif important, (**Hamadi, 2010**). Les deux principaux marqueurs biologiques

de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupe nitrotyrosines. Sont tous deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisaient d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables (Levine, 2002), dont les carbonyles sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés (Hamadi, 2010).

Les protéines peuvent alors subir réticulations par formation notamment de pont bi.tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agression modérées.

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzymes, anti.enzyme, récepteur....) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment de protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules.

Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés.

### **c.Dommages de l'ADN :**

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène.

Il Ya, cinq classes principales de dommages oxydatifs médités par OH peuvent être générées.

Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra. Caténares, des cassures de brins et des pontages ADN. Protéines (Von Sonntag, 1987. Favier, 2003. Kebieche, 2009).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation et l'attaque radicalaire peut êtres :

**-Des dommages directe** et entrainer l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine... Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la bases et le désoxyribose, créant un site basique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaine simple brin.

-Des dommages indirects peuvent résulter également de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA .guanine ou éthénodérivés (Favier 2003).

Qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres.

Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et de vieillissement (Lehucher.Michel *et al*, 2001. Favier, 2003. Valko *et al*. 2006).

### **II.2.5.Implications pathologiques du stress oxydatif :**

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Roberts et Sindhu, 2009).

En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de Pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neuro.dégénératives et le diabète (phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine), cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires, maladie de Parkinson, les inflammations gastro. Intestinale, ulcères, les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Roberts et Sindhu, 2009).

### **II.2.6.Systèmes de défenses antioxydant :**

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelés antioxydants (Wassmann *et al.*, 2004).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Comhair et Erzurum, 2002) (Droge, 2002) (Mates, 1999).

### II.2.7. Antioxydants enzymatiques :

#### a. Superoxyde de dismutase :

Est l'enzyme antioxydante la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif (Anderson *et al.*, 1997); est une metalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (Fridovich, b.l. 1995) (Akihiko *et al.*, 1991) (Frank *et al.*, 2004). Jusqu'à récemment, trois espèces d'enzymes ont été distinguées ; la SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu, ZnSOD), avec le cuivre comme catalyseur actif, manganèse (MnSOD), (SOD contenant de fer (FeSOD)). Récemment, un nouveau superoxyde dismutase contenant du nickel, NiSOD, a été purifié à partir de plusieurs espèces de Streptomyce (Wuerges *et al.* 2004) (Schafer et Kardinah, 2003). Cu / Zn.SOD sont très répandues dans le cytosol et périplasm des procaryotes (Steinman, h. m. 1985) (Steinman, h. m. 1992) ainsi que chez les eucaryotes (Getzoff *et al.* 1989). Les types Fe et Mn se trouvent principalement dans les procaryotes et les mitochondries, ils sont étroitement liés en ce qui concerne la structure en trois dimensions et la séquence des acides aminés.

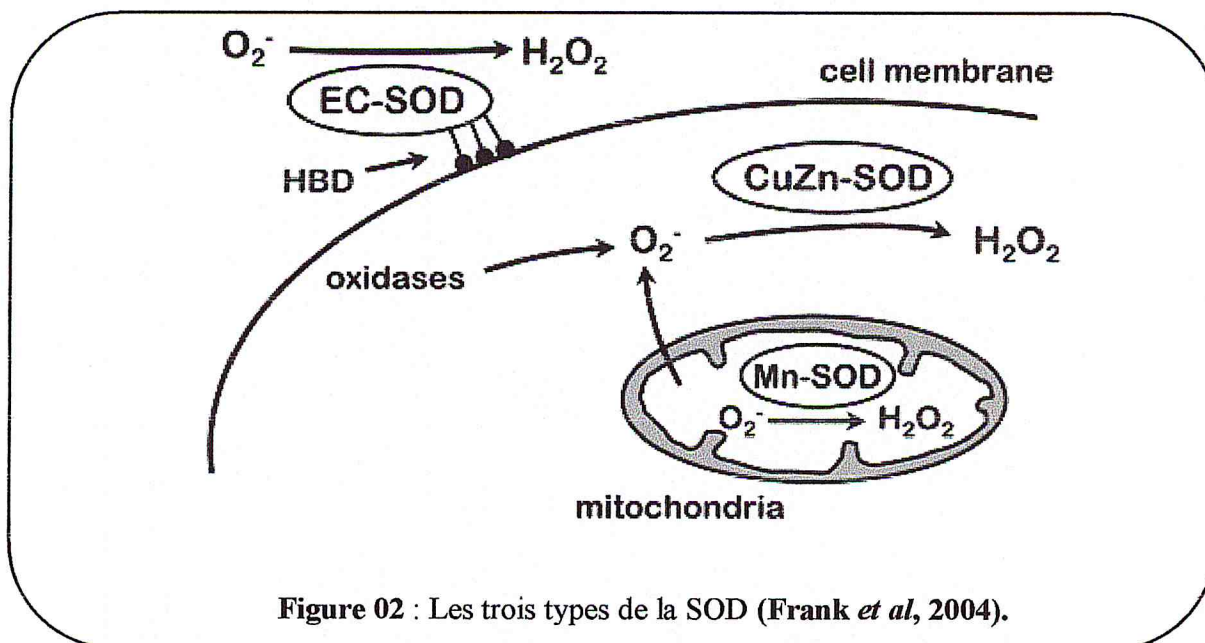


Figure 02 : Les trois types de la SOD (Frank *et al.*, 2004).

**b. Catalase :**

Est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (Niki *et al*, 2007) (Nancy *et al*, 2006). L'activité catalytique de la catalase est très élevée et estimée comme 200000/sec par site catalyseur. catalase (Ye. Shih *et al*, 2004) :



La catalase est omniprésente dans tous les procaryotes et les eucaryotes. À l'exception des érythrocytes, c'est un tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et le protège contre l'inactivation (Kirkman *et al*, 1999). Elle est principalement située dans les peroxisomes de tous les types cellulaires de mammifères où  $\text{H}_2\text{O}_2$  est généré par les différentes oxydases (Purdue and Lazarow, 1996). Toutefois, une certaine quantité de catalase a également été trouvée dans les mitochondries du cœur de rat (Radi *et al*, 1991).

Cette enzyme est présente dans les cellules de presque tous les organismes vivants, c'est-à-dire les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. (Vainshtein *et al*, 1985).

**c. Glutathionne.S.transférase :**

Est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka *et al*, 2003). La glutathion.S.transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Zhihua *et al*, 2004) (Gattás *et al*, 2004).

En plus de l'activité de conjugaison du GSH et la réduction des peroxydes, GST est associée avec d'autres processus biologiques. Quelques GST sont impliquées dans la modulation des canaux ioniques (Dulhunty *et al*, 2001), d'autres dans la synthèse des eicosanoïdes, leucotriènes et les prostaglandines, (Bartling *n*, 1993) (Fernandez.Canon *et Penalva*, 1998). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:

**II.2.8. Les Antioxydants non enzymatiques :**

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme

(glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (alpha.tocophérol, caroténoïdes) (May *et al.*1997).

### 1. Vitamine E :

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls  $\alpha$  et  $\delta$  tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (Vertuani *et al.*, 2004). La vitamine E contribue entre autre à préserver du stress oxydatif causé par le soleil. De plus, elle présente la particularité de pouvoir être régénérée après son oxydation (Cillard, 1980). Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis *et al.*2003, Lynpatrick 2006), Régénérer ( $\text{ROO}^\bullet$ ) pour fournir un radical tocophéryl capable de piéger chimiquement l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) en s'oxydant en quinone et de réagir avec le radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ).

### 2. Vitamine C : (acide ascorbique)

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra. et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme  $\text{HO}^\bullet$  ou  $\text{O}_2$ . Elle peut recycler l' $\alpha$ . tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides. (Vertuani *et al.* 2004).

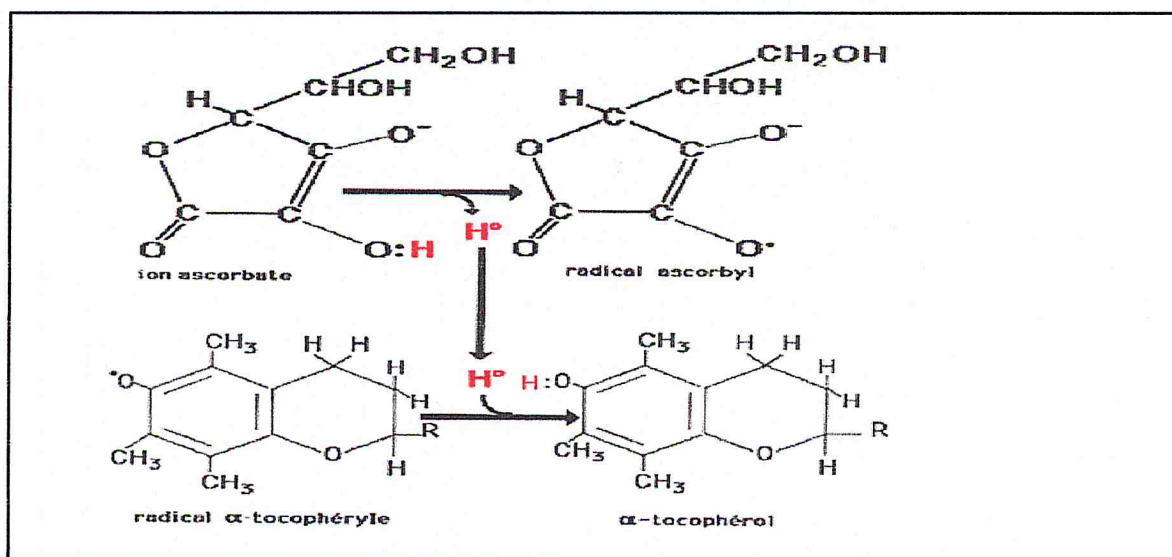


Figure 03 : Régénération du tocophérol (vit.E) par l'acide ascorbique (vit.C) (May *et al.*1997).

### 3. les caroténoïdes :

Les caroténoïdes tels que le  $\beta$ .carotène constituent une vaste famille de composés qui sont généralement des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (Gardès .Albert *et al.*, 2003). En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capter l'oxygène singlet,  $^1O_2$ , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydants permet d'expliquer, en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et d'autre produits végétaux (Gardès .Albert *et al.*, 2003).

**Tableau 03** : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin.Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments Antioxydants	Source Alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise , kiwi ,chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œuf, noix
$\beta$ .carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes vert ...

# Partie Expérimentale

# Matériel et Méthodes

## **I. Matériel et Méthodes**

### **I.1. Matériel**

#### **I.1.1. Matériel biologique :**

Nous avons utilisé, dans le cadre de cette étude, des rats blancs femelles (*Rattusrattus*) de la souche *Wistar* qui proviennent de l'Institut Pasteur –Alger.

Ce sont des mammifères de l'ordre des Rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherches (Toxicologie, Immunologie, Immunogénétique). Au début de l'expérimentation, ces rattes étaient âgées de 4 mois et pesaient entre 130 et 180 gr. Ces rattes ont été soumises à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de notre laboratoire.

#### **1.2. Condition d'élevage :**

Les rattes sont élevées dans des cages en polyéthylène (30cm à 45cm) qui sont nettoyées régulièrement et recouvertes d'une litière constituée de copeaux de bois et changée tous les 2 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les rattes sont toujours manipulées par les mêmes expérimentateurs afin d'éviter tout stress (Ader et Friedman 1964).

#### **1.3. Nutrition :**

Les rattes sont nourries quotidiennement avec des aliments secs, constitué de maïs, d'orge et de complément vitaminique.

Les rattes boivent en moyenne 2 ml d'eau pour un gramme de nourriture sèche, l'eau est présentée dans des biberons ad libitum.

## **I.2. Méthodologie**

### **I.2.1. Traitement au benzène :**

#### **1. Présentation de la molécule :**

Le benzène, le composé homologue le plus simple de la série des hydrocarbures aromatiques, est une molécule cyclique plane, comprenant six atomes de carbone disposés selon un hexagone régulier. Il s'agit d'un produit volatil, incolore et dégageant une odeur caractéristique. Il est soluble dans l'eau à raison de 1000mg/L et miscible dans de nombreux solvants organiques. Sa pression de vapeur atteint 13Kpa à 25°.

**2. Mode de traitement :**

L'expérimentation consiste à administrer à des rattes femelles trois doses croissantes de benzène à raison de 50, 100 et 150 mg/kg de poids corporel. De ce fait, nous avons réparties les 24 rattes en quatre lots (04) à raison de 6 rattes par lot, il s'agit du :

- . Lot témoin qui reçoit l'huile d'olive à un volume équivalent à la dose intermédiaire.
- . Lot traité au benzène à raison de 50mg/Kg
- . Lot traité au benzène à raison de 100mg/Kg
- . Lot traité au benzène à raison de 150mg/Kg

Le xénobiotique à administrer est préparé sous forme d'un mélange d'huile d'olive et de benzène à raison d'un volume de benzène pour un volume d'huile (3V Huile d'olive /V de benzène). Le mélange est administré par voie de gavage aux femelles une fois par jour tous les jours du 6<sup>ème</sup> jour jusqu'au 15<sup>ème</sup>.

**I.2.2. Prélèvements :****1. Prélèvement sanguin :**

Les prélèvements sanguins ont été effectués par décapitation au 20<sup>ème</sup> jour. Pour chaque lot décapité, le sang est recueilli dans des tubes héparines, puis centrifugé. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé pour le dosage des paramètres biochimique. Une autre fraction de sang est récoltée sur des tubes EDTA pour le comptage des globules rouges et des leucocytes à l'aide du Coulter S plus.

**2.2. Prélèvement d'organes :**

Après décapitation, nous avons procédé à la dissection des rattes afin de prélever les organes : métabolique (foie) ; immunitaire (rate) et excréteur (rein). Les organes prélevés, sont pesés à l'aide d'une balance de précision (KORN).

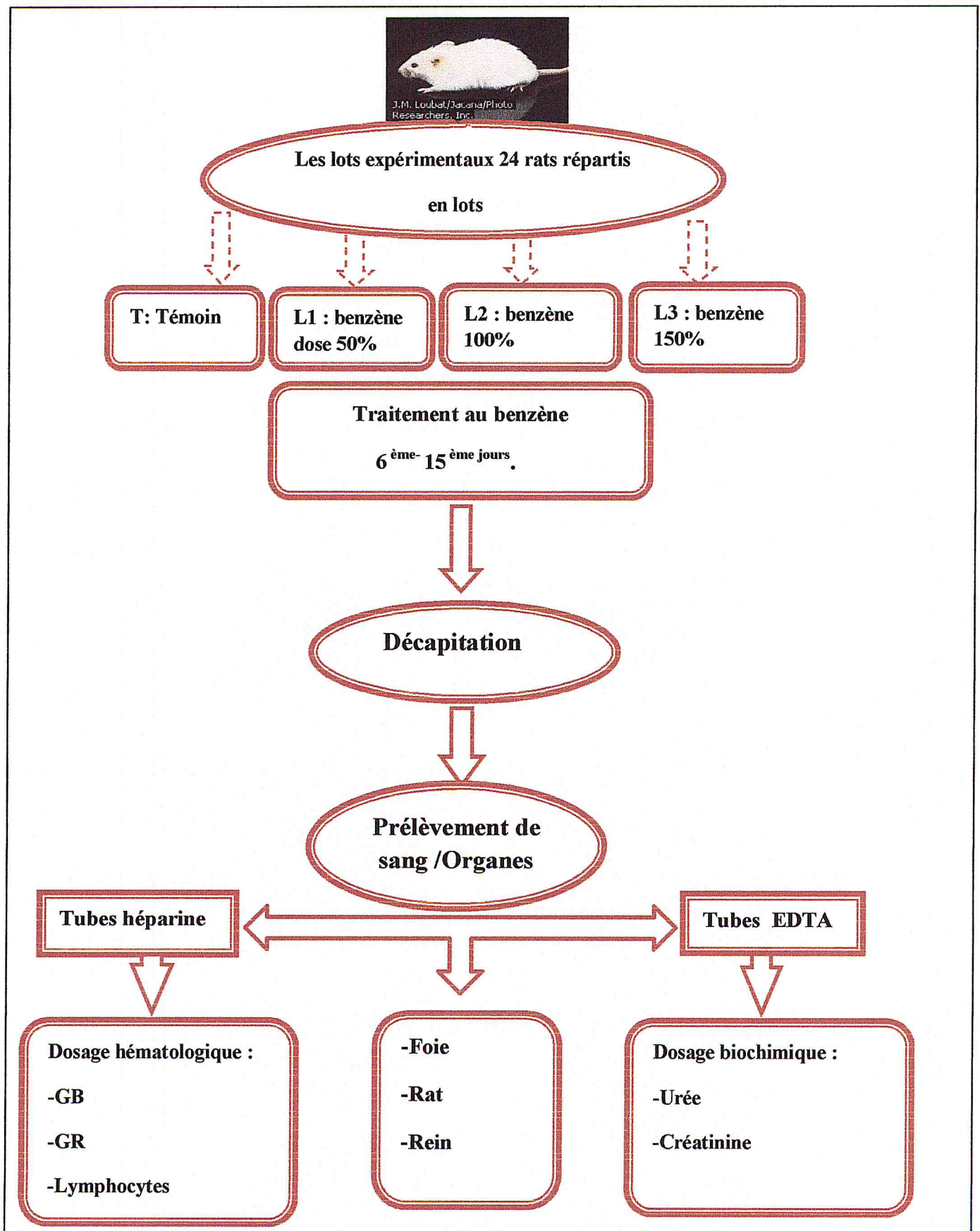


Figure 04: schéma récapitulatif du protocole expérimental

**I.3. Dosage enzymo-colorimétrique :**

**I.1. Dosage enzymo-colorimétrique de la créatinine : (Murry *et al.* ;1984) .** Selon la fiche technique spinreact

- **Principe :**

Créatinine présente dans le sérum forme un milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine

- **Echantillon :** Sérum ou plasma
- **Réactifs utilisés :**

Les réactifs	composition	concentration
R1	Acide picrique	17.5 mol/l
R2	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
R3 Etalon	Etalon de la créatinine aqueux primaire	2 mg/dl

- **Préparation et stabilité :**

Les réactifs sont prêts à l'emploi, stable à température ambiante.

Réactif du travail (RT) : mélanger à parts égales R1 et R2

Stabilité : 10 jours à 15.25°C

- **Mode opératoire :** Dans des tubes à essai, pipeter :

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (ul)	-	100	-
Echantillon (ul)	-	-	100

- Mélanger et lire la densité optique DO1 après 30 sec, 492 nm.
- Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après.

▪ **Calcul de la concentration**

La concentration plasmatique est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration de la créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta D. \text{Echantillon}}{\Delta D. \text{O. Standard}} \times n \quad (n = 20)$$

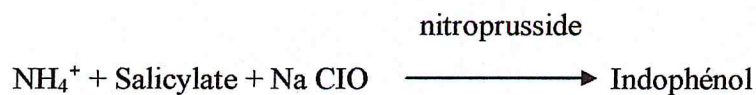
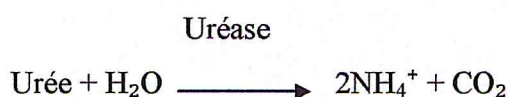
Calcul  $\Delta DO = DO2 - DO1$  pour le standard et les échantillons.

La concentration de l'étalon = 2 mg/dl

## I.2. Dosage enzymo-colorimétrique d'urée :(selon la fiche technique Biosystème)

➤ **principe :**

L'urée présente dans l'échantillon donne, selon les réactions décrites ci. Dessous, un indophénol coloré quantifiable par spectrophotométrie.



## ❖ Réactifs utilisés

Les réactifs	composition	concentration
R1 tampon	Phosphate	20 m mol /l
	Salicylate de sodium	62 m mol/l
	Nitroprusside de sodium	3,4 m mol/l
R2 NaClO	Hypochlorite de sodium	150 m mol/l
	Hydroxyde de sodium	
R3 Enzymes	Uréase	500U/l
R4 Etalon	Etalon de l'urée aqueux primaire	50 g/dl

## ❖ Echantillon : Sérum

## ❖ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
<b>Etalon urée (S)</b>	-	10 ul	-
<b>Echantillon</b>	-	-	10ul

- Bien agir et incuber les tubes pendant 10 minutes à température ambiante (16.25°C) ou pendant 5 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'Echantillon face au blanc à 600 nm.

La couleur est stable au moins 2 heures.

**❖ calculs :**

La concentration en urée de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{A \text{ échantillon}}{A \text{ étalon}} \times C \text{ étalon} \times \text{Facteur de dilution échantillon} = C \text{ échantillon}$$

La concentration de l'étalon=50g/dl

**I.4. Evaluation de la toxicité hématologique :**

La toxicité hématologique a été mise en évidence à travers la détermination de la formule numérique FNS à l'aide d'un automate (couler, counter T540) : est un analyseur sanguin automatisé pour échantillons de sang entier.

Les paramètres mesurés selon le principe de Coulter sont : les globules rouges et blancs la teneur moyen d'hémoglobine, la teneur moyen en hématocrite, le volume globulaire moyen en hémoglobine (CCMH), la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH) .

**I.5. Analyses statistiques :**

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  erreur standard. L'analyse statistique des données a été effectuée grâce au logiciel « Minitab13 ». Nous avons réalisés une comparaison des moyennes par le « test t de student ». Quant à la représentation graphique des données, elle s'est appuyée sur l'élaboration d'histogrammes.

# Résultats et Discussion

## I. Résultats

### I.1. Effets du benzène sur les paramètres biochimiques

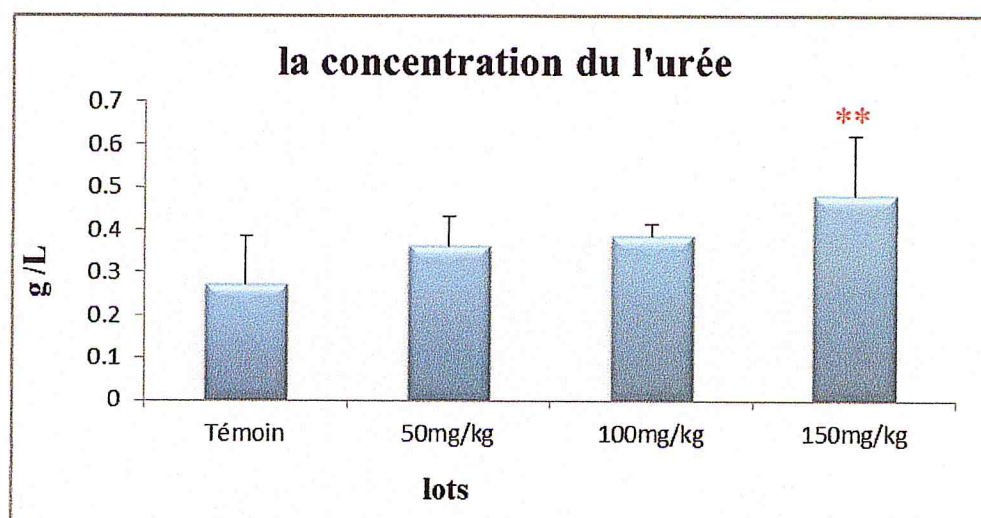
#### 1. La concentration sérique de l'urée :

Les résultats illustrent une augmentation de la concentration de l'urée chez les lots traités au benzène par rapport au lot témoin. Cette dernière est plus importante chez les rattes traitées par la dose 150 mg/kg.

**Tableau 04** : Variation de la contraction sérique de l'urée, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*\* :  $p < 0.001$  ; ;ns : non significatif

Lots	Témoin	50mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
l'urée (g /L)	0.273± 0.113	0.363± 0.137 <sup>ns</sup>	0.386±0.027 <sup>ns</sup>	0.483±0.068 <sup>**</sup>



**Figure 05**: Variation de la concentration du l'urée, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

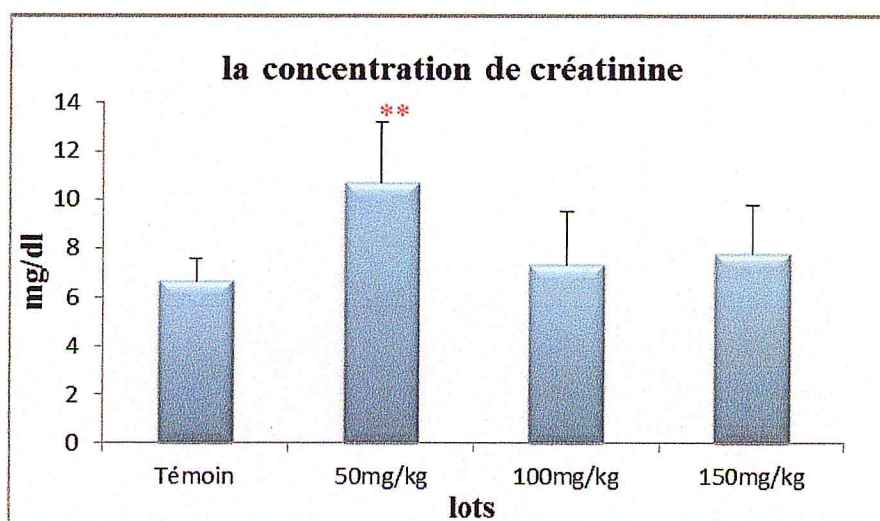
## 2. La concentration de créatinine :

Les résultats montrent une augmentation du taux de créatinine chez les lots traités au benzène comparativement au lot témoin et particulièrement chez le lot traité à la dose la plus faible.

**Tableau 05 :** Variation de la contraction de créatinine, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*\* :  $p < 0.001$  ; ;ns : non significatif

Lots	Témoin	50mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Créatinine (mg/dl)	6.670±0.912	10.68±2.493**	7.337±2.159 <sup>ns</sup>	7.758±2.033 <sup>ns</sup>



**Figure 06:** Variation de la concentration de créatinine ,chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

### I.1.2. Effets du benzène sur les paramètres hématologiques

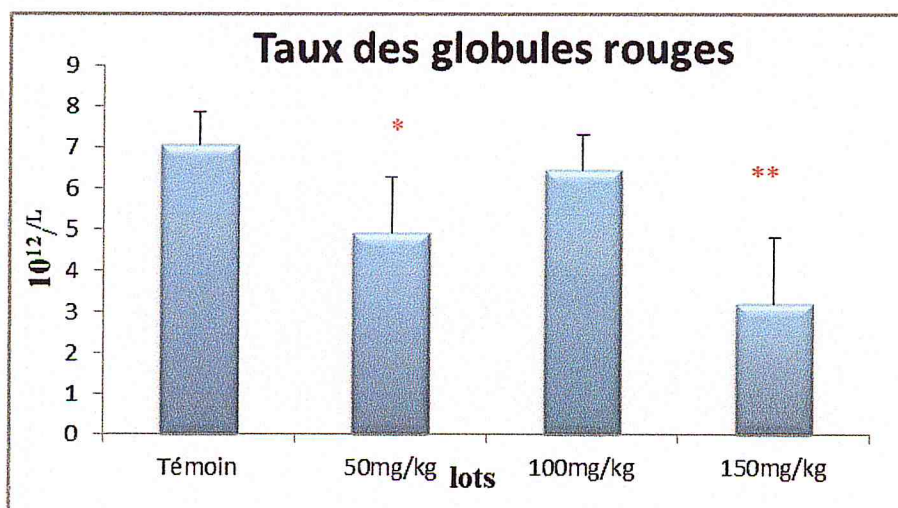
#### 1 .Taux des globules rouges :

L'analyse du taux de globules rouges révèle, l'existence d'une diminution significative chez les lots traités au benzène à dose 50 mg/kg de poids corporel. Cette diminution s'accroît au niveau du lot traité au benzène à raison de 150 mg/kg de poids corporel, où l'on distingue une différence hautement significative par rapport aux valeurs témoins.

**Tableau 06** : Variation du taux moyen de globules rouges, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.001$  ;ns :non significatif

Lots	Témoin	50mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
GR ( $10^{12}/L$ )	7.047±0.814	4.905±1.373 *	6.463± 0.842ns	3.218±1.608**



**Figure 07**: Variation du taux moyen de globules rouges, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

### I.1.3. Évaluation de la riposte immunitaire

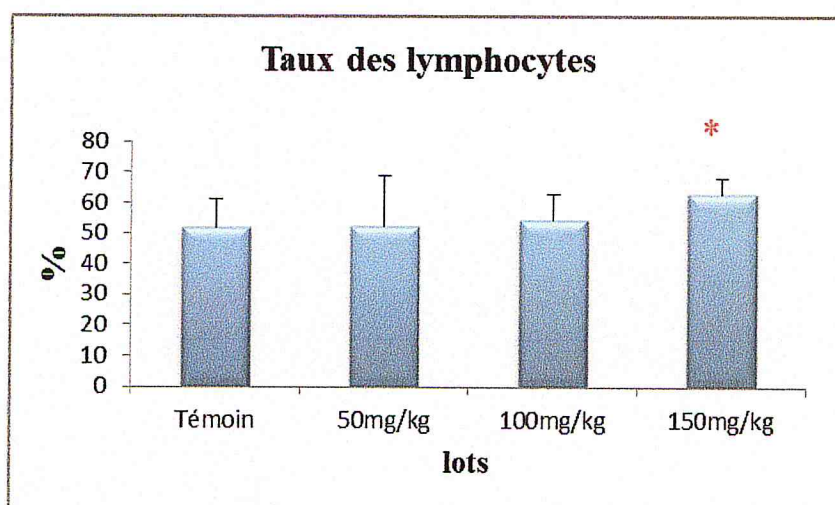
#### 1. Taux de lymphocytes:

Les résultats relatent une augmentation du taux de lymphocytes chez les lots traités au benzène comparativement au lot témoin. Cette augmentation est plus importante chez les rattes traitées par la dose 150 mg/kg, où l'on distingue une différence significative par rapport aux valeurs témoins.

**Tableau 07 :** Variation du taux de lymphocytes, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*:  $p < 0.05$ ; ;ns : non significatif .

Lots	Témoin	50mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Lymphocyte (%)	51.6±9.6	52.22±16.55 <sup>ns</sup>	54.3±8.37 <sup>ns</sup>	62.95±5.14*



**Figure 08:** Variation du taux de lymphocytes, chez les rattes témoins et traitées au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

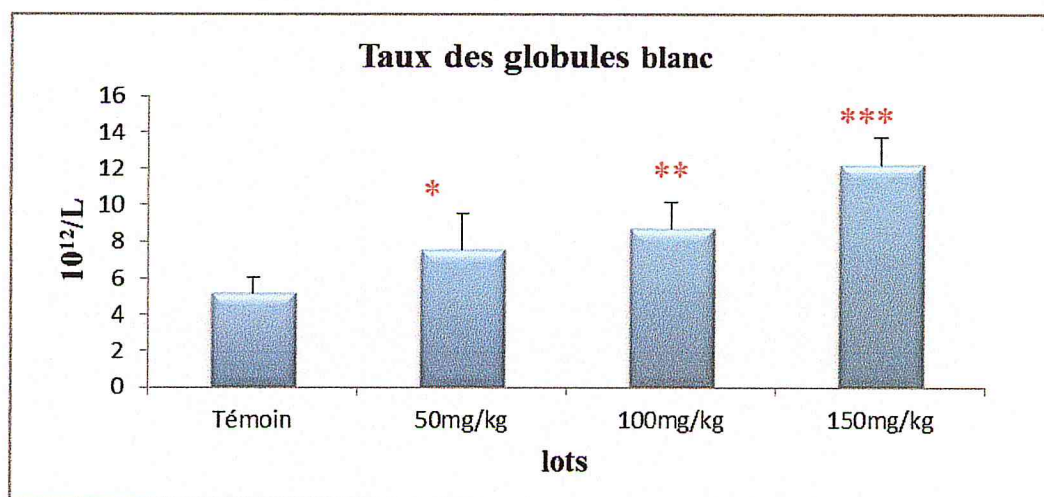
## 2. Taux de globules blanc:

Les résultats obtenus montrent une augmentation du taux de globules blanc, au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de benzène comparativement au lot témoin.

**Tableau 08:** Variation du taux de globules blanc, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*:  $p < 0.0001$

Lots	Témoin	50mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
GB ( $10^{12}/L$ )	5.2±0.89	7.55±1.99*	8.75±1.44**	12.2± 1.51***



**Figure 09:** Variation du taux moyen de globules blanc, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

### I.1.4. Evaluation de l'atteinte tissulaire

#### 4.1. Etat pondéral des organes

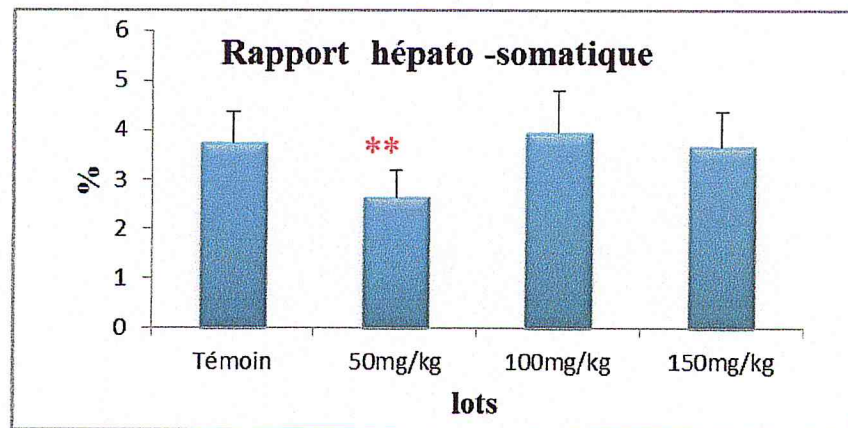
##### 1 .Au niveau du foie :

Les résultats illustrent une augmentation du rapport hépato- somatique chez les lots traités au benzène à 100 et 150 mg/kg de poids corporel. En revanche, on constate une diminution hautement significative chez le lot traité au benzène à 50 mg/kg de poids corporel.

**Tableau 09:** Variation du rapport hépato- somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

Vs: \*\*:  $p < 0.001$  ; ns : non significative

Lots	Témoin	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
Rapport hépato somatique (%)	3.7483± 0.616	2.636±0.553**	3.951±0.8294 <sup>ns</sup>	3.6817±0.6802 <sup>ns</sup>



**Figure 10:** Le rapport hépato- somatique, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

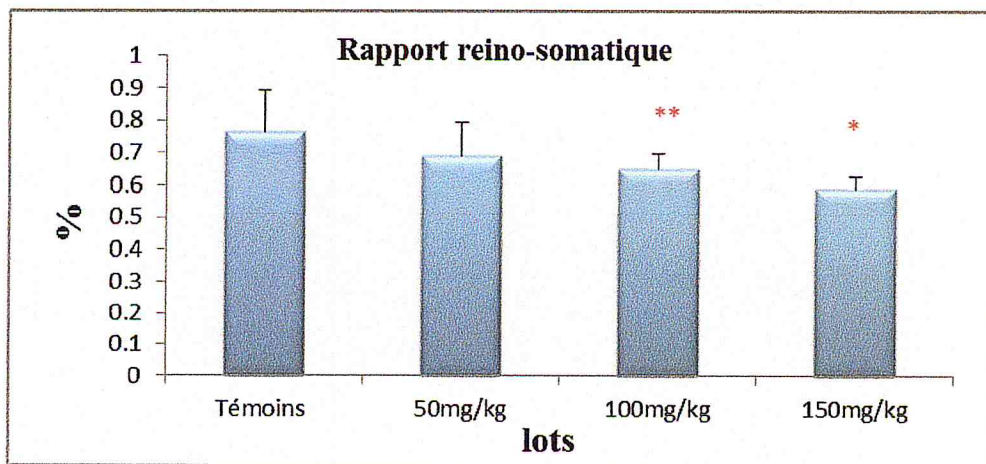
## 2 .Au niveau des reins

Les résultats révèlent une diminution du rapport reino- somatique chez les rattes traitées au benzène par rapport aux rattes témoins. Cette diminution est hautement significative chez le lot traité à la dose 100mg/kg et significative chez les lots traités au benzène à 150mg/kg de poids corporel.

**Tableau 10:** Variation du rapport reino- somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*\* :  $p < 0.001$ ; \*\*\* :  $p < 0.0001$

Lots	Témoin	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
rapport reino-somatique (%)	0.7650±0.126	0.691±0.103 <sup>ns</sup>	0.650± 0.046 <sup>**</sup>	0.590± 0.038 <sup>*</sup>



**Figure 11 :** Le rapport reino- somatique, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

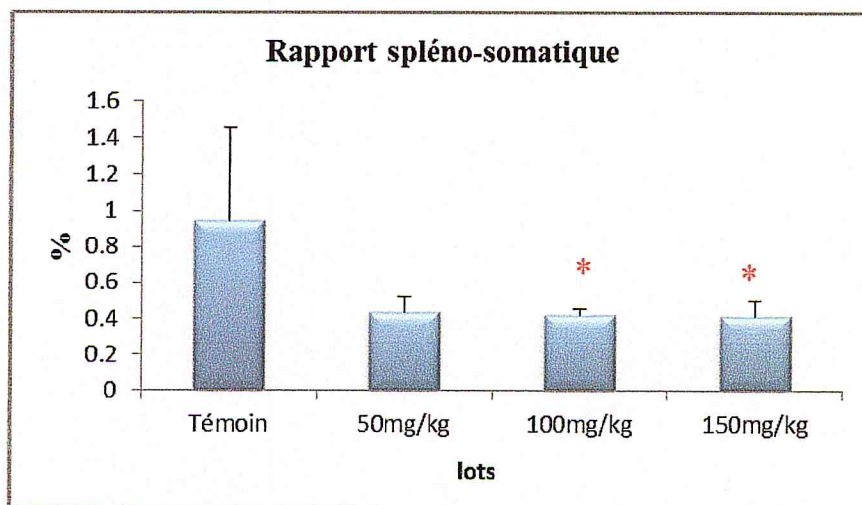
### 3 .Au niveau de la rate

Les résultats montrent une diminution du rapport spléno- somatique, au fur et à mesure de l'augmentation de la dose de benzène comparativement au lot témoin.

**Tableau 11:** Variation du rapport spléno - somatique chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

\*:  $p < 0.05$  ; ns : non significatif .

Lots	Témoin	50 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg
rapport spléno - somatique (%)	0.945±0.5129	0.435± 0.0855 <sup>ns</sup>	0.4217 ± 0.0306 *	0.4117± 0.0913*



**Figure12:** Le rapport spléno - somatique, chez le lot témoin et les lots traités au benzène à raison de 50,100 et 150 mg/kg de poids corporel.

### III.2. Discussion :

Nous avons tenté dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact nociceptif d'un polluant sur des rats femelles de souche *wistar*. Les résultats obtenus sont analysés et discutés en fonction de travaux relatés dans plusieurs monographies

Nous nous sommes intéressés aux effets du benzène que nous avons administré par voie de gavage. Lors de l'administration orale de ce xénobiotique, au moins 18% et 22% de la dose administrée sont absorbées respectivement chez le rat (**Ogata et Shimada, 1983**) et chez le lapin (**Lindsay – Smith *et al.*, 1972**). Une fois absorbé, les travaux de **Sullivan *et al.*(1983)** ont montré que chez le rat, le benzène possède une distribution préférentielle vers les tissus adipeux notamment les graisses péri – rénales du fait de sa nature lipophile.

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les lots traités par rapport au lot témoin. Ceci s'explique la dégradation de plusieurs composés protéiques du corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes qui jouent un rôle important dans ce processus. Ou les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Plusieurs études ont mis en évidence le pouvoir cancérogène du benzène chez l'animal pour l'expositions réalisées par voie orale ou par inhalation (**Kasprzak *et al.*,1985 ;Ayala-Fierro *et al.*,1999 ;Bucher *et al.*,1999 ;Wozniak.,2002 ;Cavallo *et al.*,2003**), selon **courèges *et al.*,1998** des examens clinique effectués chez des sujets souffrants d'insuffisance rénal montre une augmentation de taux de la créatinine et de l'urée plasmatiques. Cette néphrotoxicité peut aussi accompagné par des lésions au niveau des glomérules.

De plus, la toxicité du benzène s'est manifestée par des atteintes tissulaires, au niveau du foie, de la rate et des reins. De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (**Chan et Decker, 1994 ; Yu, 1994**). En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (**Boveris *et al.*, 1972**). L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) permet la transmission du caractère radicalaire soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu, d'une molécule à une autre. Cette transmission est extrêmement rapide et peut assurer le transfert de l'état radicalaire sur plusieurs centimètres en une fraction de seconde (**Neuzil *et al.*, 1993**), et

déclenche ainsi des pathologies sévères allant jusqu'à la mort des animaux (**Halliwell et Chrigo, 1993 ; Chan et Decker, 1994**).

Nos résultats ont également mis en évidence une perturbation de l'état pondéral de ces organes par rapport au lot témoin. Différentes études réalisées aussi bien par inhalation que par ingestion chez le rat, la souris, le lapin ou le chien ont montré une diminution de l'accroissement du poids corporel et de la survie pour les doses les plus élevées, une toxicité hépatique et rénale se manifestant par une augmentation des enzymes hépatiques sériques, des modifications histo-pathologiques et une nécrose (**Irish, 1963 ; Knapp et al., 1971 ; Dilley, 1977 ; NTP, 1983 ; CE, 1996 ; Atsdr, 1997**). Ainsi, l'observation des coupes histologiques révèlent l'apparition de congestions vasculaires, de lésions cellulaires et d'états inflammatoires. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides ; Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (**Di Mauro et al., 1995 ; Muller et al., 1996**). Des effets hépatiques ont été décrits lors d'exposition par voie orale. Il s'agit d'une augmentation des enzymes hépatiques sériques, une modification du poids du foie, des dégénérescences, des nécroses et des troubles du métabolisme des porphyrines (**Bisson et al., 2005**).

Concernant le système hématopoïétiques, les effets du benzène observés varie en fonction de l'espèce, de la durée de l'exposition et du mode de l'exposition, cependant, toutes les études réalisées confirment les observations faites chez l'homme (**Bisson et al., 2000**).

Les études pratiquées chez le rat sont en nombre limité. Des leucopénies et des lymphocytopénies ainsi que des hypoplasies myéloïdes sont rapportés (**Ward et al., 1985**). **Robinson et al., (1997)** ont mis en évidence l'absence de modification du nombre de cellules de la moelle osseuse mais montre une diminution pondéral de la rate et du thymus et une diminution du nombre de lymphocytes T et B chez le rat exposé au benzène.

Nos résultats confirment ces travaux dans la mesure où nous avons constaté une diminution significative du rapport spléno- somatique chez les trois lots traités au benzène par rapport au témoin. De ce fait, plusieurs travaux ont montré que le benzène est un dépresseur de l'immunité cellulaire et humorale (**Rozen et al., 1984, Hsieh et al., 1988**). Dans les études d'exposition réitérées chez la souris et le rat, le benzène induit de manière dose- dépendant des lymphocytopénies (**Farris et al., 1997**). Cependant, nos résultats ont révélé, une augmentation progressive du taux de lymphocytes et une leucocytose en fonction

de la dose administrée. Ceci pourrait aisément s'expliquer par une hyperactivité du système immunitaire qui est impliqué essentiellement dans la défense de l'organisme contre des agressions externes ou des modifications internes qui perturberaient son homéostasie. De ce fait, il apparaît que les doses administrées ne sont pas suffisantes pour provoquer une immunodépression.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont relaté les effets hématologiques induits par l'intoxication au benzène. Ces effets correspondent à une augmentation du nombre de réticulocytes chez le rat lors d'une exposition par inhalation à des concentrations supérieures ou égales à 75 ppm pendant 24 semaines. Cependant, ces troubles ne sont pas retrouvés chez le lapin (**Dilley, 1977**). Une leucopénie discrète et une lymphocytose ont été observées chez la souris lors de l'exposition par inhalation à 21,4 ppm de chlorobenzène pendant 3 mois (**Zub, 1978**).

# Conclusion et Perspectives

### IV. Conclusion et perspectives :

Les connaissances actuelles soulignent l'omniprésence des phénomènes radicalaires dans l'organisme. Ces attaques oxydatives peuvent être dues à un déséquilibre alimentaire ou à une grande variété de stress dont les polluants chimiques font partie.

L'homéostasie dépend de l'équilibre et de l'étroite coordination entre les deux grands systèmes de communication intercellulaire, les systèmes neuroendocrinien et immunitaire. Une agression spontanée ou provoquée constitue un état de perturbation physique ou métabolique et ralentit l'activité du système neuroendocrinien qui exerce une influence stimulatrice ou inhibitrice sur le système immunitaire.

Dans ce contexte, le présent travail a mis en évidence quelques effets d'une agression par l'administration du benzène. Ces effets se traduisent par une perturbation des paramètres biochimiques (l'urée et la créatinine), hématologiques (diminution du taux de globules rouges) et immunitaires (lymphocytose et leucocytose). Les résultats relatent également une diminution pondérale des organes immunitaire (rate) et excréteur (rein) et métabolique (foie seulement chez les rattes traitées au benzène à 50 mg/kg du poids corporel).

A partir de ces résultats, il serait intéressant de dégager les perspectives suivantes :

- Dosage de la met- hémoglobine et en parallèle l'un des mécanismes détoxifiants, par la mesure de la teneur du glutathion hépatique.
- Réalisation de coupes histologiques au niveau des organes métaboliques et immunitaires afin de mettre en évidence l'atteinte tissulaire.
- Une meilleure caractérisation de la néphrotoxicité à travers le dosage du GSH et de la GST au niveau du rein.
- Une meilleure caractérisation de la réponse immunitaire à travers la réalisation de tests immunologiques complémentaires (immunohistochimie, précipitation et culture lymphocytaires

# Références Bibliographiques

**V. References bibliographies:**

**Akihiko,H.Yuichiro,K.Teruko,I.Masaki,O.Hiroshi,M.(1993)**-Conjugation of copper-zinc superoxide dismutase with succinylated gelatin: Pharmacological activity and cell-lubricating function. *Bioconjugate Chem.* vol 4:49-498.

**Angelos,M.G,Kutala,V.KTorres,C.A.He,G.Stoner,J.DMohammed,M ,Oerann.(2005)**-Hypoxic reperfusion of the ixhemic heart and oxygen radiacal generation *Am J physiol Heart Circ physiol.* Vol29-:341-347.

**Askoy,M.,Dincol,K.,Akgun,T.,Erdem,S.et Dincol,G.(1971)**-Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. *Br J Ind Med* 28, 3,296-3-2.

**ATSDR(1997)**-Toxicological profile for chlorobenzène. Agency for toxic Substances and Diseases Registry. Atlanta. Georgia. USA.

**ATSDR (2007)**-Toxicological profile for Benzene, U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, (PB2008010004), 382.

**Baars,A.J.,TheelenR.M.C.,Janssen,P.J.C.M.,Hesse,J.M.,vanApeldoorn,M.E.,Meijerink,M.C.M.,Verdam,L.and Zeilmaker,M.J.(2001)**-Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels RIVM, Rijs In stituutvoor volksgezondheid en melieu. Report 711 7-1-25.

**Bartling,D.R.Radzio,U.Steiner,E.W.(1993)**-AglutathioneS-transferasewith glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur.J.Biochem.* vol 216: 579-586.

**BissonM.,BureauJ.HulotC.,LefèvreJ.P.,L'évêqueS.,MaguadH.,PichardA.,DujardiR., etVilleyC.(2000)**-Benzène.Fiches des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques Document INERIS.

**Bloomer RJ and Goldfarb AH (2004a)**-Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Can J Applphysiol.*29 (3):245-263.

**Bond,G.G.,Melaren,E.A.,Baldwin,C.L.,and Cook,R.R.(1986)**-A update of mortality among chemical workers exposed to benzene. *Br J Ind Med.*43.685-691.

**Boveris,A.,Oshino,N.,Chance,B.,(1972)**-The cellular production ofhydrogen peroxide.*Biochem. J.*, 128, 617-63-.

**CanonJ.M.Penalva,M.A.(1998)**-Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J BiolChem.* Vol 273: 329-337  
L'actualité chimique novembre ,pp :1-8-115.

- C.E.(2001)** -Benzène.Evaluation des risques dans le cadre du règlement.CE/ Commission européenne 793/93, sur les substances existantes (projet 8mais 2001).
- Chan,K.M.,Decker,E.A.,(1994)**-Endogenous skeletal muscle antioxidants.*Crit.Rev. Food Sci.Nutr.*, **34**, 4-3-426.
- Comhair SAA, Erzurum SC (2002)**-Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **283**: 246 - 255.
- CollinJ.J.,IrelandB.K.,EsterdayP.A.,NairR.S.et BraunJ.(1997)**-Evaluation of lymphopeniaamong workers with low-level benzene exposure.
- Cossu,C.,Doyotte,A.,Jacquin,M.C.et Vasseur,P.(1997b)**-Mécanismes de formation des espèces réactives de l'oxygène. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspect fondamentaux*.L.Lagadic,T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade (Eds).Paris, Masson.
- DelattreJ,BeaudeauJ-L,Bonnefont-RousselotD.(2005)**-*Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.
- Decouflé,P.,Blattner,W.A.,etBlaire,A.(1983)**-Mortality among chemical workers exposed to benzene and other agents. *Environ Res.* 3-.16-25.
- Dilley,J.V.(1977)**-Toxic evaluation of inhaled chlorobenzène (mono chlorobenzène). National institute of Occupational Safety and health.*Cincinnati*. PB-276623.
- DiMauro,C.,Cavalli,G.,Curzio,Ferretti,C.,Mengozzi,G.,Paradisi,L.,andDianzanM.(1995)**-Evidence of 4-hydroxynonenal involvement in modulation of phagocyte activities.*Int.J. Tissue React.* 17 (2), 61-72.
- Dulhunty,A.Gage,P.Curtis,S.bChelvanayagam,G.Board,P.(2001)**-Theglutathione structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J BiolChem*.vol 276:3319-3323.
- FarrisG.M.,EverittJ.I.,IronsR.D.et PoppJ.A.(1993)**-Carcinogenicity of inhaled benzene in CBA mice. *Fund. Appl. Toxicol.*,2-: 5-3-5-7.
- Favier A.,(2003)**-Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique,Review.
- FrankM.Faraci;SeanP.Didion.(2004)**-Vascular Protection Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall,*Thrombosis and Vascular Biology* vol24:1367.
- Fridovich,B.L(1995)**-A superoxide dimustase mimic protects soda,sodB Escherichia coli against aerobic heating and stationary phase death –Arch,Biochem,Biophys.vol 322:291-294.

- Gattas,G.J.Kato,M.SoaesVieira,J.A.Siraque,M.S.Kohler,P.Gomes,L.Rego,M.A.Bydlowski,S.P.(2004)**-Ethnicity et glutathione S-transferase(GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med BiolRes*. Vol 337:451-458.
- Getzoff,E.D.Tainer,I.A.Stempien,M.M.Bell,G.in Hallewell, R.A.(1989)**-Evolution of Cu,Zn superoxide dismutaseand the Greek key beta-barrel Structural motif. *Proteins*. Vol5: 33-36.
- Goldstein S,Meyerstein D,Czapski G (1993)**-The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med*, 15: 435 - 445.
- Halliwell,B.,Gutteridge,J.M.C,Cross,C.E.,(1912)**-Freeradicals in biology and medicine. Third edition. New- York, Oxford university press Inc.
- Halliwell,B.,Chirico,S.(1993)**-Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin.Nutr.*, 57(suppl), 715S-725S.
- HatonC.,(2005)**-Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp43.
- Hayes,R.B.,Yin,S.N.,Dosemeci,M.etLinnet,M.(1999)**-Commenentry :Benzeneand lymphohematopoitic malignancies in china. *Am. J. Industrl. Med.* (in press).
- Hayes,J.D.,(1984)**-Purification and characterization of glutathione S-Transferase P,S, and N. isolation from rat liver of YbiYn the existence of predicted by subunit hybridization in vitro. *Biochem.J.*, 224,839-852.
- HollidayM.G.etEnglehardtF.R.(1984)**-Benzène,Acriteriareview.Rapport mandate par la division de la surveillance et des critères, ministère de la santé national et du Bien-être social, Ottawa, 3- mars(1984).
- INRIS,(2003)**-Fiche toxicologique n° 23 – chlorobenzène, Institut National de Recherche et de Sécurité.
- INERIS,(2006)**-Fiche de donnes toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- Irish,D.D.(1963)**-Halogenated hydrocarbons :Iicyclic,Industrial Hygiene and Toxicology. New York, Inter-Science Publishers. 2<sup>nd</sup> Ed,pp. 1333-1340.
- Kirkman,H.N.Rolfo,M.Ferraris,A.M.Gaetani,G.F.(1999)**-Mechanisms of protection of catalase by NADPH .Kinetics and stoichiometry. *JBiolChem*. vol 274:139-8-13914.
- Knapp,W.K.,Busey,W.M.andKundzins,W.(1971)**-Subacute oral toxicity of mono chlorobenzene in dogs and rats. *ToxicolApplPharmacol*, 19, 393.

- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006)**-Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2-: 165–177.
- Lamprech M, Greilberger J, Oettl K. (2004)**-Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition*. 2-(708): 728-730.
- Lindsay-Smith, J.R., Shaw, B.A.J et Foulkes, D.M. (1972)**-Mechanisms of mammalian hydroxylation: some novel metabolites of chlorobenzene. *Xenobiotica*, 2,; 215-226.
- Lin, M.S., Yin, S.N., Travis, L.B., Zhang, Z.n., Li, D.G., Rothman, N., Chow, W.H., Donaldson, J., Dosemeci, M. Et al. (1996)**-Chemical features of hematopoietic malignancies and related disorders among benzene –exposed workers in china-benzene study group. *Environ. Health. Perspect.* 1-4 suppl6: 1354-64.
- May, J.M. Mendiratta, S. Hill, K.E. Burk, R.F. (1997)**-Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzymethioredoxin reductase. *J Bio Chem.* vol 272: 226-7 2261.
- Nancy, J. Linford, S.I. chriner, E. Peter, S. Rabinovitch 1. (2006)**-Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria. *Cancer Res*; 66: 2497-2499.
- Neuzil, J., Gebicki, J.M., Stocker, R. (1993)**-Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain breaking antioxidants. *Biochem. J.*, 293: 601-606.
- Niki, L. Reynaert, S.W. Aesif, T. McGovern, Amy Brown, Emiel, F.M. Wouters, Charles, G. Irvin Yvonne, M.W. Janssen-Heininger. (2007)**-Catalase Overexpression Fails to Attenuate Allergic Airways Disease in the Mouse. *The Journal of Immunology.* Vol 178: 3814-3821.
- OEHHA, (2003)**–REL chlorobenzène. Office of Environmental Health Hazard Assessment.
- OMS, (2003)**-Benzene in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water quality, Organisation mondiale de la santé (OMS) / World Health Organization (WHO), Genève, WHO/SDE/WSH/-3.-4/24, 5.
- Ogata M. and Shimada Y. (1983)**-Differences in urinary mono chlorobenzene metabolites between rats and humans. *Int Arch Occup Environ Health*, 53,1, 51-57.
- Purdue, P.E. Lazarow, P.B. (1996)**-Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *The Journal of Cell Biology.* Vol 134: 849-862.
- Radi, R. Turrens, J.F. Chang, L.Y. Bush, K.M. Crapo, J.D. Freeman, B.A. (1991)**-Detection of catalase in rat heart mitochondria. *JBiolChem.* Vol. 266: 22-28-22-34.

- Radak Z, Chung HY, Goto S. (2008a)**-Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free radical Biology Medicine*. 44:153-159.
- Renuka B. Rajurkar, Z. H. Govind, T. G. (2003)**-Studies on levels of glutathione S transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science*. vol.85: 1355-136.
- Reich, H. (1934)**-Puran(monochlorobenzene)poisoning in a 2-year-old child. *Sammlvon Vergiftungsfallen*, 5, 193-194.
- Rock, E.** stress oxidant, micronutriments et santé; INRA-CRNH, unite des maladies métaboliques et micronutriments ; 63122 st genès champan elle .
- Sandmeyer E. E. (1981)**-Aromatic hydrocarbons. vol 2B, In: *Patt'ys industrial hygiene and toxicology*, G.D. Clayton FE Eds, 3253-3283.
- Santé Canada, (2009)**-Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Document technique. Benzène, Préparé par le Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable, Ottawa, Ontario, 47.
- Savitz, D. A., and Andrews .k.w. (1997)**-Review of epidemiologic on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am. J. Med.* VOL. 31. PP:287-295.
- Schäfer, S. Kardinahl. (2003)**-Iron superoxide dismutases: structure and function of an archaic enzyme. *Biochemical Society Transactions*. Vol31:133001334.
- Schroder, H. C., Batel, R., Hassanein, H. M. A., Lauenroth, S., Stjenk, H., Simat, T., Steinhart , H. and Muller, W. E. G. (2000)**-Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limandalimanda*: a field study in the North Sea and the English Channel. *Mar. Environ. Res.* 49:2-1-215.
- Smith, M. T. (1996)**-Overview of Benzene induced aplasicaemia. *Eur J Heamatol Suppl* 6-.1-7-11-..
- Snyder, C. A., B. D. Godstein, A. R. Sellakumaret R. E. Albert. (1984)**-Evidence for Hematotoxicity and Tumorigensis in Rats Exposed to 100ppm benzene, *Am. J. Ind Med.*, 5:429-434.
- Steinman, H. M. (1985)**-Bactériocuprein superoxide dismutase in Pseudomonds. *JBacteriol*. Vol 162, 1255-1260.
- Steinman, H. M. (1992)**-Construction of an *Escherichia coli* K-12 strain deleted for manganese and iron superoxide dismutase genes and its use in cloning the iron superoxide dismutase gene of *Legionella pneumophila*. *Mol&Gen Genet.* .vol :232, 427 430.

- Stohs, S.J. and bagchi, D. (1995)**-Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18:321-336.
- Sullivan, T.M., Born G.S., Carlson G.P. and Kessler W.V. (1983)**-The pharmacokinetics of inhaled chlorobenzene in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 71, 2, 1942-3.
- Vainshtein, et al. (1986)**-Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol.* vol 18: 49-61.
- Van Damme, (1996)**- Benzene Analysis of the use of leucocytes counts to detect Effects in Exposed Workers. *Int J Occup Environ Health*, Vol 2/N°3, S6-S9.
- Van Damme, K., Casteletyn, I., Vanderauwera, J.C., Chellini, E., Huici, A. (1992)**-The influence of low exposure to benzene on white cell blood cell counts. Extended abstract- Proceeding of the 9 international symposium on epidemiology in occupational health, September 23-25, Cincinnati, Ohio, DHHS (NIOSH) Publication N° 91-112.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004)**-The antioxidants and pro oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 1-: 1677-1694.
- Winek C.L. and collom W.D. (1971)**-Benzène and toluene fatalities. *J Occup Med*, 13: 259-261.
- Wolin, M.S. (1996)**-Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms *Microcirculation.* Vol 3: 1-17.
- Wong O. (1995)**-Risk of acute myeloid leukemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. *Occup Environ Med*; 52: 3800384.
- Worgam, J., Sturm, A., Segner, H. and Liess, M. (2001)**-Effects of parathion on acetyl cholinesterase and carboxyl esterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 2:1528-1531.
- Wuerges, J., Lee, J.W., Yim, Y., Yim, H.S., Kang, S., Djinovic, K.C. (2004)**-Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Biochemistry.* vol 1-1: 8569-8574.
- Ye-Shih, Ho, Ye, Xiong, Wanchao, Ma, Abraham, Spector, Dorothy, S. Ho. (2004)**-Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J of biological chemistry.* Vol 279: 328-4 –32812.
- Ye, B.P. (1994)**-Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74, 139.
- Zhihua, J., Elias, S.J.A., Ying, M., Linda, J., Jinming, S., Siqi, Z., Shujun, L., Ruiying, W., Tianzhu, Z., Ganglin, Y., Junqiu, L., Jiacong, S., Guimin, L. (2004)**-Expression of selenocysteine-

containing glutathione S-transferases in *Escherichia coli*. *Biochem and Biophys Res Commun*. Vol 321:94-1-1.

**Zub, M.(1978)**-Reactivity of the white blood cell system to toxic action of benzene and its derivatives. *Acta Biol Cracov*, **21**,163-174.

# Résumés

**Résumé :**

L'originalité de notre travail réside dans la mise en évidence de l'impact nociceptif du benzène sur l'organisme de rats femelles *wistar*. L'administration par gavage (per os) de benzène aux doses 50, 100 et 150 mg/Kg de poids corporel chez le rat femelle, provoque une perturbation des paramètres biochimiques, hématologiques et immunitaires.

Les résultats obtenus révèlent également, une diminution considérable du gain de poids des organes métabolique (foie), immunitaire (rate) et excréteur (rein) durant le traitement au benzène.

**Mots clés :** Benzène, rats femelles *wistar*, métabolique, gavage, per os, immunitaire.

**Abstract:**

The originality of our work lies in the discovery of benzene harmful impact on Wistar rats female body.

The administration by gavage (po) at doses of benzene, 50, 100 and 150 mg / kg body weight in female rats, causes a disturbance of biochemical, hematological and immunological parameters. The results also show a considerable decrease in the weight of the metabolic organs (liver), immunity (spleen) and excretion (kidney) during treatment with benzene.

**Key words:** Benzene, female Wistar rats, metabolic, feeding, oral, immune.

## ملخص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير خطورة وسمية البنزان على عضوية اناث لفئران من عائلة الو يستار  
التغذية الأنبوبية للبنزان بجرعات مختلفة 50-100-150 مغ/كغ حسب وزن الجسم للإناث الفئران يسبب اختلال  
المكونات الحيوية وامراض الدم والمناعة .  
النتائج المحصل عليها تؤكد انخفاض في وزن الاعضاء الكبد -الطحال-الكاليتين بالنسبة للفئران المعالجة بالبنزان .

كلمات مفتاحية : البنزان, فئران اناث الو يستار, الأيض التغذية الأنبوبية, عن طريق الفم, المناعة.