



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE de l'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Laboratoire de Pharmacognosie et Api-phytothérapie

Thèse de Doctorat 3^{ème} Cycle (Doctorat LMD)
Filière : Sciences Biologiques
Option : Plantes Médicinales et Phytothérapie

Présentée par :

M^{elle} GADOUCHE Leila

THÈME

**Effet de *Punica granatum* L sur la neurotoxicité
de quelques métaux lourds (le plomb et l'aluminium).**

Etude *in vivo* chez la souris

Soutenue publiquement le 19/11/2018

Devant le jury :

Président de jury	: Pr. Reguieg Yssaad Houcine Abdelhakim	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	: Pr. DJEBLI Nouredine	Université de Mostaganem
Examineur	: Pr. Aoues Abdelkader	Université d'Oran
Examineur	: Pr. Sahraoui Tewfik	Université d'Oran
Examineur	: Pr. LOTMANI Ibrahim	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2017- 2018

Remerciements

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir
donné la force et la patience.*

*Mes respectueux remerciements s'adressent à mon directeur de thèse, **Monsieur Djebli Noureddine**, professeur à l'université de Mostaganem qui m'a fait partager ses brillantes intuitions, son appui scientifique, pour son soutien, sa disponibilité, son intérêt pour ce travail et pour les nombreux conseils et aides avisés qu'il a pu me donner tout au long de la thèse*

*Mes sincères remerciements vont à **Monsieur Reguieg Yssaad Houcine Abdelhakim**, professeur à l'université de Mostaganem, de faire l'insigne honneur de présider le jury de soutenance.*

*Ma sincère gratitude s'adresse à **Monsieur Aoues Abdelkader**, professeur à l'université d'Oran de l'honneur d'être examinateur de ma thèse et de me faire ainsi bénéficier de ces compétences et de ces connaissances*

*Ma sincère gratitude s'adresse à **Monsieur Sahraoui Tewfik**, professeur à l'université d'Oran d'avoir accepté de faire part de mon jury qu'il soit rassurer de ma respectueuse considération*

*Ma sincère gratitude s'adresse à **Monsieur Lotmani Brahim**, professeur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ma thèse et de l'intérêt qu'il va apporter en participant à cette commission d'examen*

*Je tiens à remercier vivement **M^{me} Zerrouki Khayra**, docteur à l'université de Chlef et **M^{me} Riati Sabrina**, chef de laboratoire de microbiologie à l'université de Chlef qui m'ont aidé, soutenu dans les moments les plus difficiles. Sans cette aide précieuse, il aurait été difficile d'y arriver toute seule*

*Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe de la formation doctorale "**Phytothérapie et Plantes médicinales**" et tous les membres du laboratoire de **Pharmacognosie Api- Phytothérapie***

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à **Monsieur Saadi Abdelkader**, **Monsieur Saidi Djamel** et **Monsieur Mahmoudi Hacene**, professeurs à l'université de Chlef, qui m'ont beaucoup encouragé et orienté lors de mon parcours doctoral .*

*Mes vifs remerciements s'adressent à **Monsieur Medjameia** professeur à l'hôpital militaire d'Oran (HMRUO) de m'avoir reçu dans son service d'anatomo-pathologique et du temps qu'il m'a consacré lors de mon stage.*

*Je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude à **Monsieur Kouidri Mohamed** & **Monsieur Mokhtari Djamel eddine** et un remerciement particulier à **Mme Kassoul Fatima***

*Je tiens à remercier **Monsieur Benaboura** d'avoir mis à ma disposition son Verger de grenadier*

Dédicaces

A mes chers parents;

Yema & Papa; sources de mes joies, secrets de ma force et de ma réussite; vos prières m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Que ce modeste travail soit le fruit de toutes vos peines et tous vos efforts. Quoi que je fasse, je ne pourrais jamais vous récompensez pour les grands sacrifices que vous avez faits et continuez de faire pour moi.

Que dieu vous procure santé, bonheur et longue vie.

A mes sœurs Souad et Tati & A mes frères Samir, Maamar et SidAhmed

Que dieu nous garde unis toute la vie

A ma belle soeur Zaho & mon beau frère Noureddine

A mes adorés Sabrina, Iyad Abderahmane & Mohamed Mahdi

A mes tantes et mes oncles surtout à Malika

A mes chères amies Fadhila & Sabrina

A la mémoire de mon cousin Faycel

Résumé

Punica granatum est un arbre fruitier aux vertus médicinales et nutritionnelles a été utilisée pour l'évaluation de son effet neuroprotecteur à rétablir les perturbations et les dommages causés par le plomb et aluminium en utilisant des approches neurocomportementales, biochimiques et histologiques.

Dans cette optique, une analyse qualitative du jus et de l'extrait méthanolique issu d'écorce de grenade; un screening phytochimique, une chromatographie sur couche mince et une HPLC-détecteur à barrette de diodes et un dosage quantitatif des polyphénols, flavonoïdes et tanins ont été effectués.

La neurotoxicité a été induite par le plomb (1000ppm) et l'aluminium (500mg/kg) et traitée par des extraits de grenade; jus (v/v) et extrait méthanolique issu d'écorce (500mg/kg).

Après 90 jours, nous avons réalisé des tests neurologiques (comportementaux et de mémoire), un dosage du plomb et de l'aluminium dans le cerveau par une spectrométrie d'absorption atomique et une étude histologique par une coloration à l'hématoxyline et éosine.

La phytochimie a révélé une gamme et une quantité importante de métabolites secondaires à savoir polyphénols, flavonoïdes et tanins.

L'administration de l'acétate de plomb et du chlorure d'aluminium par la voie orale à des souris pendant une durée de 90 jours a causé des perturbations neurologiques; une hyperactivité locomotrice avec installation d'un état d'anxiété, une dépression et une réduction de la curiosité et de l'apprentissage avec accumulation de ces deux métaux dans le cerveau. D'une autre part une augmentation de l'activité des marqueurs de la fonction hépatique et un déséquilibre calcique a été également trouvés. Ces paramètres biochimiques ont confirmés les altérations histologiques constatés au niveau du cortex cérébral, hippocampe, foie et rein.

Ces altérations neurologiques, biochimiques et histologiques (cerveau, foie et reins) ont été restaurées par une prise quotidienne du jus et de l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum*. Ces extraits ont montré des activités anxiolytiques et antidépressives ainsi qu'une amélioration des capacités d'apprentissage, de mémoire et de locomotion qui sont attribuées à la teneur importante en molécules bioactives diversifiées mises en évidence dans ces deux extraits. Ces effets bénéfiques montrent que la grenade pourrait avoir un effet neuroprotecteur.

Mots clés:

Punica granatum L, Neurotoxicité, Plomb , Aluminium, *in vivo*, Souris.

Abstract

Punica granatum is a fruit tree with medicinal and nutritional properties. It has been used to evaluate its neuroprotective effect to restore the disturbances and damages caused by lead and aluminum using neurobehavioral, biochemical and histological approaches.

In this context, a qualitative analysis of the juice and methanolic extract from pomegranate bark; a phytochemical screening, thin layer chromatography and High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and a quantitative analysis of polyphenols, flavonoids and tannins were performed

The neurotoxicity was induced by lead (1000ppm) and aluminum (500mg/kg) and treated with pomegranate extracts; arils juice (v/v) and methanolic extract from bark (500mg/kg).

After 90 days, we performed neurological tests (behavioral and memory), a lead and aluminum assay in the brain by atomic absorption spectrometry and a histological study by hematoxylin staining and eosin.

Phytochemistry has revealed an important range and quantities of secondary metabolites; polyphenols, flavonoids and tannins.

Administration of lead acetate and aluminum chloride orally to mice for 90 days caused neurological disturbances; locomotor hyperactivity with anxiety, depression and reduced curiosity and learning with accumulation of both metals in the brain. On the other hand an increase in the activity of markers of liver function and calcium imbalance were also found. These biochemical parameters confirmed the histological changes observed in the cerebral cortex, hippocampus, liver and kidneys.

These neurological, biochemical and histological alterations (brain, liver and kidneys) were restored by daily intake of the juice and methanolic extract of *Punica granatum* bark. These extracts showed anxiolytic and antidepressant activities as well as an improvement in the learning, memory and locomotion abilities attributed to the high content of diversified bioactive molecules identified in these two extracts. These beneficial effects show that the pomegranate could have a neuroprotective effect.

Keywords

Punica granatum L, Neurotoxicity, Lead, Aluminum, in vivo, Mice.

المخلص

الرمان او PUNICA GRANATUM هي شجرة فاكهة ذات خصائص طبية وغذائية استخدمت لتقييم تأثير حمايتها العصبية لاصلاح الاضطرابات والضرر الناجم عن الرصاص والألمنيوم باستخدام تقييم السلوكيات العصبية وكذا التغيرات البيوكيميائية والنسجية. في هذا المنظور ، تحليل نوعي للعصير ومستخلص الميثانول من لحاء الرمان. تم إجراء فحص كيميائي للمستخلصات النباتية ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وكاشف الصمام الثنائي HPLC وكذا تحديد كمي للبوليفينول ، الفلافونويد والتانينات. نتجت السمية العصبية عن الرصاص (1000 جزء في المليون) والألمنيوم (500 مغ / كغ) وعولجت بمستخلصات الرمان (عصير ح / ح) ومستخلص الميثانول من اللحاء (500 مغ / كغ) بعد 90 يوماً من الاختبار ، أجرينا بعدها اختبارات عصبية (اختبارات سلوكية واختبارات الذاكرة) ، تحليل للرصاص والألمنيوم في الدماغ عن طريق مطياف الامتصاص الذري ودراسة نسيجية عن طريق صبغة الهيماتوكسيلين واليوزين (H&E)

كشفت الكيمياء النباتية عن مجموعة من المستقلبات الثانوية بكميات كبيرة ، وهي البوليفينول والفلافونويد والتانينات. أدت إستهلاك أسيتات الرصاص وكلوريد الألومنيوم لمدة 90 يوماً عند الفئران إلى اضطرابات عصبية ؛ فرط النشاط الحركي مع بداية القلق والاكتئاب وانخفاض الفضول والتعلم مع تراكم كل من المعدنين في الدماغ. من ناحية أخرى ، تم العثور على زيادة في نشاط دلائل وظيفية في الكبد وعدم التوازن الكالسيوم. أكدت هذه المعايير البيوكيميائية التغيرات النسيجية الملاحظة في القشرة الدماغية ، الحصين ، الكبد والكلى. تمت استعادة هذه التغيرات العصبية والكيميائية الحيوية والنسجية (الدماغ والكبد والكليتين) عن طريق الاستهلاك اليومي من العصير ومستخلص الميثانول من لحاء الرمان PUNICA GRANATUM كما أظهرت هذه المستخلصات أنشطة مزيلة للقلق ومضادة للاكتئاب بالإضافة إلى تحسن في قدرات التعلم والذاكرة والحركة وهذا منسوب إلى المحتوى المرتفع من الجزيئات المتنوعة النشطة بيولوجياً الموضحة في هذين المستخلصين. تظهر هذه التأثيرات المفيدة أن الرمان يمكن أن يكون له تأثير في الحماية العصبية.

المفتاحية الكلمات

الفئران ، الحي الجسم في، الرصاص، الألومنيوم، العصبية السمية، الرمان

Liste des abréviations

%: Pourcentage
°C: Degré Celsius
µg: Microgramme
µl: microlitre
µm: micromètre
5-HIAA: 5-hydroxy-indole-acétique
5-HT: Sérotonine
Å: Angström
AchE: Acétylcholinestérase
ADN: Acide désoxyribonucléique
Al: Aluminium
ALAD: Acide δ-aminolévulinique déshydratase
ALAS: Acide δ-aminolevulinique synthétase
AlCl₃: Trichlorure d'aluminium
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ARN: Acide ribonucléique
B: Ballonisation
B-cl2: B-cell lymphoma 2
Ca²⁺: Ion calcium
CCM: Chromatographie sur couches minces
CHE: Cholestérol estérase
CHOD: Cholestérol oxydase
POD: Peroxydase
4-AP: 4-Aminophénazone
cm: Centimètre
CN: Cellule normale
CV: Congestion des vaisseaux sanguins
CYP: Cytochrome P
DA: Dépôts amyloïdes.
DA: Dopamine
DFO: déferoxamine
DL50: dose létale médiane
DMSA: Acide dimercaptosuccinique
EAG: Equivalent d'acide gallique
EC: Extrait chloroformique
ECat: Equivalent catéchine
EDTACaNa₂: Acide éthylènediamine tétraacétique de calcium disodique
EM: Extrait méthanolique
EP: Extrait éther pétrolinique
EPM: Elevated plus-maze
EQ: Equivalent en quercétine
ET: Equivalent en acide tannique
g: Gramme
GABA: Acide gamma aminobutyrique.
GFAA: Graphite furnace atomic absorption
GSH: Glutathione
H&E: Hématoxyline et éosine
H: Hépatocyte

h: Heure
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HCL: Acide chlorhydrique
HDL: High density lipoprotein
HNO₃: Acide nitrique
HPLC-DAD: High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection
HTN: Hypertension tension nerveuse
HVA: Acide homo-vanilique
IF: Infiltrat inflammatoire
IgE: Immunoglobuline E
J: Jus
kg: kilogramme
LDH: Lactate déshydrogénase
LDL: Low density lipoprotein
LPO: Lipid peroxidation
LTP: Long-term potentiation
MA: Maladie d'Alzheimer
MDA: Malondialdéhyde
mg: Milligramme
min: Minute
ml: Millilitre
mM: Millimole
MN: Micronoyaux
MPOC: Maladie pulmonaire obstructive chronique
MWM: Morris water maze
N: Nécrose
N: Normalité
Na₂CO₃: Carbonate de sodium
NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide
ND: Dégénérescence neuronale
NE: Adrénaline
NF- κ B : *nuclear factor-kappa B*
NF κ B: Nuclear factor kappa B
nm: nanomètre
NMDA: Acide N-méthyl-D-aspartique
NO: Nitric oxide
NOAEL: No Observable Adverse Effect Level
P. Punica
Pb: Plomb
PC3: prostate cancer cell
PGE₂ : La prostaglandine E₂
PKC: Protein kinase C
ppm: partie par million
PTH: Hormone parathyroïdienne
RNS: Reactive nitrogen species
ROS: Reactive oxygen species
rpm: Rotation per minute
S: Sinusoides
SD: Sinusoides dilatés
SOD: Superoxyde dismutase

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TfR: Transferrine

TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1

TGF- β 1: *Transforming growth factor beta 1*

TGO : Transaminase glutamo oxaloacétique⁴

TGP : Transaminase glutamo pyruvique

TMT: Triméthylétain

TNF α : *tumor necrosis factor*

U: Unité

V : Vacuolisation

VC: Veine centrolobulaires

VCD: Veine centrolobulaires dilatés

Zn⁺²: Ion zinc

Liste des figures

Figure 1: Sources d'exposition et les effets sur la santé humaine.....	5
Figure 2: Synthèse de l'hème.....	7
Figure 3: Absorption quotidienne et distribution de l'aluminium dans l'organisme humain..	14
Figure 4: <i>Punica granatum</i>	20
Figure 5: Carte géographique où l'échantillonnage a été effectuée.....	27
Figure 6: Aspect morphologique de la variété Sefri du fruit de <i>Punica granatum</i>	27
Figure 7: Schéma d'extraction à partir d'écorce de <i>Punica granatum</i>	29
Figure 8: Test de l'activité locomotrice.....	36
Figure 9: Test de porsolt.....	37
Figure 10: Test d'anxiété (Test de la chambre Obscure/Illuminée).....	38
Figure 11: Test d'anxiété (Test de labyrinthe en croix surélevé).....	39
Figure 12: Test de curiosité (Test de trou).....	39
Figure 13: Test de la piscine de Morris (MST, MSR).....	40
Figure 14: Test de mémoire spatiale de travail (Test du labyrinthe à 8 bras).....	41
Figure 15: Chromatogrammes des extraits apolaires " éther de pétrole EP et chloroforme EC " chloroforme (1) et chloroforme : méthanol (8:2).....	50
Figure 16: Chromatogramme des extraits polaires jus et extrait méthanolique de la grenade chloroforme : méthanol : eau distillée (8 : 1,8 : 0.2).....	51
Figure 17: Chromatogramme des extraits polaires méthanol EMeoh et le jus J grenade butanol : acide acétique ; eau distillée (6 : 2,5 : 1,5) et après révélation.....	52
Figure 18: Chromatogramme des extraits polaires jus et extrait méthanolique d'écorce de grenade. butanol : acide acétique ; eau distillée (4 : 3 : 3).....	53
Figure 19: Chromatogramme des extraits polaires jus (80:1.8:0.2) et extrait méthanolique d'écorce (4:3:3) de la grenade.....	53
Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	54
Figure 21: Courbe d'étalonnage de quercétine.....	54
Figure 22: Courbe d'étalonnage acide tannique.....	55
Figure 23: Courbe d'étalonnage cathéchine.....	55
Figure 24: Chromatogramme d ' HPLC-UV/DAD du jus de <i>Punica granatum</i> à 300 nm..	56
Figure 25: Résultats de l'activité locomotrice " toxicité au plomb"	64
Figure 26: Résultats du test compartiment noir/clair " toxicité au plomb"	65
Figure 27: Résultats du test de la nage forcée " toxicité au plomb"	66
Figure 28: Taux de plomb dans le cerveau	67
Figure 29A: Etude microscopique du cortex cérébral et de l 'hippocampe des souris témoins (G x 400).	69
Figure 29B: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe du groupe intoxiqué par l'acétate de plomb (1000 ppm).....	70
Figure 29C: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v).....	71
Figure 29D: Etude microscopique de l'hippocampe des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg).....	72
Figure 30A: Etude microscopique du foie des les souris témoins.....	73

Figure 30B: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm)..	74
Figure 30C: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v).....	74
Figure 30D: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg).....	75
Figure 31A: Etude microscopique du rein des souris témoins.....	76
Figure 31B: Etude microscopique du rein des souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm)..	77
Figure 31C: Etude microscopique du rein des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v).....	77
Figure 31D: Etude microscopique du rein des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg).....	78
Figure 32: Résultats de l'activité locomotrice "toxicité à l'aluminium".....	89
Figure 33: Résultats de du test de Porsolt "toxicité à l'aluminium".....	90
Figure 34: Résultats du test chambre noire/claire "toxicité à l'aluminium".....	91
Figure 35: Résultats du test de labyrinthe en croix sur élevé "toxicité à l'aluminium".....	92
Figure 36: Résultats du test de curiosité "toxicité à l'aluminium".....	93
Figure 37: résultats du test de labyrinthe de Morris "toxicité à l'aluminium".....	94.
Figure 38: Résultats du test de labyrinthe en 8 " Mémoire spatial de travail.....	95
Figure 39: Taux d'aluminium dans le cerveau.....	96
Figure 40A: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe des souris témoins.....	98
Figure 40B: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg).....	99
Figure 40C: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade.....	100
Figure 40D: Etude microscopique du cortex cérébral et de l'hippocampe des souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg).....	101
Figure 41A: Etude microscopique du foie des souris témoins.....	102
Figure 41B: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg).....	103
Figure 41C: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait de grenade (v/v).....	103
Figure 41D: Etude microscopique du foie des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade (v/v) (G x 400).....	104
Figure 42A: Etude microscopique du rein des souris témoins.....	105
Figure 42B: Etude microscopique du rein des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg).....	106
Figure 42C: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait de grenade (v/v)	106
Figure 42D: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade (v/v).....	107

Liste des tableaux

Tableau 1 : Réactifs utilisés pour le dosage AST.....	43
Tableau 2 : Réactifs utilisés pour le dosage ALT.....	44
Tableau 3 : Réactifs utilisés pour le dosage du calcium.....	44
Tableau 4 : Mode opératoire de dosage du calcium.....	45
Tableau 5 : Réactifs utilisés pour le dosage du cholestérol.....	46
Tableau 6 : Mode opératoire de dosage du cholestérol.....	46
Tableau 7 : Réaction de caractérisation des extraits de <i>Punica granatum</i>	49
Tableau 8 : Teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux & tanins condensés dans le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade.....	56
Tableau 9 : Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC.....	57
Tableau 10 : L'évolution pondérale "toxicité plomb".....	62
Tableau 11 : volume moyen de la solution consommée "toxicité plomb".....	63
Tableau 12 : Taux de TGP, TGO et Ca dans le sang.....	68
Tableau 13 : L'évolution pondérale "toxicité aluminium".....	87
Tableau 14 : volume moyen de la solution consommée "toxicité aluminium".....	88
Tableau 15 : Taux de TGP, TGO, cholestérol et du calcium dans le sang.....	97

Table des matières

Abstract

Résumé

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie théorique

Chapitre 1: Métaux lourds aluminium et plomb

1. Plomb.....	4
1.1 Généralités.....	4
1.2 Sources d'exposition.....	4
1.3 Toxicocinétique.....	5
1.4 Les effets toxiques du plomb.....	6
1.4.1 Effets hématologiques.....	6
1.4.2 Effets sur le système nerveux central.....	7
1.4.2.1 Neurotransmission et signalisation cellulaire.....	7
1.4.2.2 Stress Oxydatif et Membrane.....	8
1.4.3 Effets rénaux.....	8
1.4.4 Effets hépatiques.....	9
1.4.5 Effets sur l'os.....	9
1.4.6 Effets digestifs.....	9
1.4.7 Effets respiratoires.....	10
1.4.8 Effets cardiovasculaires.....	10
1.4.9 effets sur la reproduction.....	10
1.4.10 Effets tératogènes.....	10
1.4.11 Effets mutagènes.....	11
1.5 Thérapie chélatrice du Plomb.....	11
2. Aluminium.....	12
2.1 Généralités.....	12
2.2 Sources d'exposition.....	12
2.3 Toxicocinétique.....	12
2.4 Les effets toxiques de l'aluminium	14
2.4.1 Effets hématologiques.....	14
2.4.2 Effets sur le système nerveux central.....	14
2.4.2.1 Stress Oxydatif et Membrane.....	14
2.4.2.2 Neurotransmission et signalisation cellulaire.....	15
2.4.3 Effets rénaux.....	16
2.4.4 Effets hépatiques.....	16
2.4.5 Effets sur l'os.....	16
2.4.6 Effets digestifs.....	17
2.4.7 Effets respiratoires.....	17
2.4.8 Effets cardiovasculaires.....	17
2.4.9 Effets sur la reproduction.....	17
2.4.10 Effets tératogènes.....	18
2.4.11 Effets mutagènes.....	18
2.5 Thérapie chélatrice de l'aluminium.....	18

Chapitre 2: *Punica granatum*

1. Généralités	19
2. <i>Punica granatum</i>	19
2.1. Généralités.....	19
2.2. Aspects ethnobotaniques de <i>P. granatum</i>	21
2.2.1 Classification botanique	21
2.3 Phytochimie de <i>P. granatum</i>	21
2.4 Activités thérapeutiques de <i>P. granatum</i>	23
2.4.1 Activité antioxydante de <i>P. granatum</i>	23
2.4.2 Activité anti-inflammatoire de <i>P. granatum</i>	24
2.4.3 Activité anti-carcinogène.....	24
2.5 Toxicité et risque d'interaction	25

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes

1. Etude <i>phytochimique</i>	27
1.1. Matériel végétal choisis " <i>Punica granatum</i> "	27
1.2. Préparation des extraits.....	28
1.2.1 Préparation du jus de <i>Punica granatum</i>	28
1.2.2 Préparation des extraits d'écorce de <i>Punica granatum</i>	28
1.3 Criblage phytochimique.....	30
1.3.1 Tanins.....	30
1.3.2 Flavonoïdes.....	30
1.3.3 Anthocyanine.....	30
1.3.4 Alcaloïdes.....	30
1.3.5 Saponines	31
1.4 Chromatographie sur couches minces (CCM).....	31
1.5 Analyse quantitative.....	32
1.5.1 Dosage des polyphénols totaux	32
1.5.2 Dosage des Flavonoïdes totaux	33
1.5.3 Dosage des Tanins totaux	33
1.5.4 Dosage des Tanins condensés (Méthode de la vanilline).....	33
1.6 Analyse par HPLC-DAD.....	34
2. Etude <i>in vivo</i>	35
2.1 Intoxication et traitement	35
2.2 Paramètres neurologiques	36
2.2.1 Tests de comportement.....	36
2.2.1.1 Test de l'activité locomotrice.....	36
2.2.1.2 Test de la nage forcée.....	36
2.2.1.3 Test la chambre obscure/illuminée.....	37
2.2.1.4 Test de labyrinthe en croix surélevé.....	38
2.2.1.5 Test de curiosité	39
2.2.2 Tests de mémoire	40
2.2.2.1 Test de la piscine de Morris	40
2.2.2.2 Test de labyrinthe à 8 bras.....	41
2.2.2.2.1 Mémoire spatial de travail.....	41

2.3 Dosage du plomb et de l'aluminium dans le cerveau.....	42
2.4 Dosage des transaminases, calcium et Cholestérol.....	42
2.5 Etude histologique.....	46
2.5.1 Fixation	46
2.5.2 Déshydratation et inclusion.....	47
2.5.3 Découpage.....	48
2.5.4 Coloration et montage	48
2.6 Etude statistique.....	48

Chapitre 2: Résultats et Discussion

1. Etude <i>phytochimique</i>	49
1.1 Analyse des extraits.....	49
1.1.1 Analyse qualitative.....	49
1.1.2 Analyse quantitative.....	54
1.1.3 Analyse HPLC.....	56
• Discussion.....	58
2. Etude <i>in vivo</i>	62
2.1 Plomb.....	62
2.1.1 Evolution pondérale	62
2.1.2 Solution consommée	62
2.1.3 Paramètres neurologiques étudiés	63
2.1.3.1 Tests de comportement.....	63
2.1.3.1.1 Test de l'activité locomotrice.....	63
2.1.3.1.2 Test de la chambre noire/clair.....	64
2.1.3.1.3 Test de la nage forcée.....	65
2.1.4 Dosage du plomb au niveau cérébral.....	66
2.1.5 Dosage TGP TGO et Calcium.....	67
2.1.6 Etude histologique	68
2.1.6.1 Cerveau.....	68
2.1.6.2 Tissu hépatique.....	73
2.1.6.3 Tissu rénal.....	76
• Discussion.....	79
2.2 Aluminium.....	87
2.2.1 Evolution pondérale	87
2.2.2 Solution consommée.....	87
2.2.3 Paramètres neurologiques étudiés.....	88
2.2.3.1 Test de comportement	88
2.2.3.1.1 Test de l'activité locomotrice	88
2.2.3.1.2 Test de la nage forcée	89
2.2.3.1.3 Test de la chambre noire/clair.....	90
2.2.3.1.4 Test de labyrinthe en croix sur élevé.....	91
2.2.3.1.5 Test de curiosité.....	92
2.2.3.2 Tests de mémoire	93
2.2.3.2.1 Test de labyrinthe de Morris.....	93
2.2.3.2.2 Test de labyrinthe en 8.....	94

2.2.4 Paramètres biochimiques étudiés.....	95
2.2.4.1 Dosage de l'aluminium au niveau du cerveau.....	95
2.2.4.2 Dosage TGP TGO, calcium et du cholestérol.....	96
2.2.5 Etude histologique	97
2.2.5.1 Tissu nerveux.....	97
2.2.5.2 Tissu hépatique.....	102
2.2.5.3 Tissu rénal.....	105
• Discussion.....	108
Conclusion.....	117
Références bibliographiques	120
Activités scientifiques.....	148
Publication.....	149
Annexes.....	158

Introduction

Introduction

Les métaux lourds sont des constituants naturels de la croûte terrestre et sont des contaminants environnementaux non dégradés ou détruits (Duruibe et *al.*, 2007). Leurs multiples applications industrielles, domestiques, agricoles, médicales et technologiques ont conduit à leur large diffusion dans l'environnement; suscitant des inquiétudes quant à leurs effets potentiels sur la santé humaine et à l'environnement (Tchounwou et *al.*, 2012).

Plusieurs études ont mis en évidence que l'exposition au plomb provoque de nombreuses incidences pathologiques, notamment des dysfonctionnements physiologiques, biochimiques et comportementaux variés dans le système nerveux périphérique et central, le système circulatoire, cardiovasculaire, excréteur, métabolique et reproducteur chez l'homme (Wani et *al.*, 2015). Les principaux compartiments du corps qui stockent le plomb sont le sang, les tissus mous et les os (Liu et *al.*, 2013).

Le plomb, un toxique systémique affecte pratiquement tous les organes et principalement le système nerveux central, en particulier le cerveau en développement (Sanders et *al.*, 2009). Saleh et *al.*, (2017); ont constaté que le plomb produit une large gamme d'effets toxiques y compris la neurotoxicité en particulier chez les jeunes et les enfants en croissance. Dans le cerveau, les dommages induits par le plomb dans le cortex cérébral préfrontal, l'hippocampe et le cervelet peuvent entraîner divers troubles neurologiques, tels que les lésions cérébrales, un retard mental, des troubles du comportement, des lésions nerveuses et possiblement la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Schizophrénie (Liu, 2013).

En effet, l'exposition au Pb perturbe le système aminergique dans le cortex cérébral, le cervelet et l'hippocampe et peut contribuer aux troubles cognitifs et comportementaux (Devi et *al.*, 2005; Kharoubi et *al.*, 2011).

En outre, Mason et *al.*, (2004); ont révélé que l'exposition au plomb peut entraîner des difficultés neuropsychologiques communément associées à l'intelligence, la mémoire, le fonctionnement exécutif, l'attention, la vitesse de traitement, le langage, les compétences visuo-spatiales, les habiletés motrices et l'affect / humeur.

L'aluminium (Al) est une substance omniprésente à la fois naturellement (troisième élément le plus abondant) et intentionnellement (utilisée dans l'eau, les aliments, les produits pharmaceutiques et les vaccins). Il est également présent dans les particules atmosphériques

ambiantes et professionnelles. Les données existantes soulignent l'importance des formes physiques et chimiques de l'Al en ce qui concerne son absorption, son accumulation et sa biodisponibilité systémique (Willhite et *al.*, 2014).

L'aluminium (Al) est une neurotoxine environnementale qui affecte les fonctions cérébrales et provoque des complications de santé (Prakash et *al.*, 2013). Al est présent dans le cerveau humain et il peut s'y accumuler avec l'âge (Exley, 2014). L'exposition à l'Al biodisponible peut provoquer des lésions cérébrales (Tüzmen et *al.*, 2015).

Les symptômes neurotoxiques résultant de l'exposition à l'aluminium incluent des troubles de la parole, de la dyspraxie, des tremblements, une paralysie partielle et un déclin marqué de l'apprentissage et de la mémoire. En outre, plusieurs études chez l'animal ont également montré que l'exposition à l'aluminium provoque des modifications neuropathologiques, neurocomportementales, neurophysiques et neurochimiques, ce qui entraîne la réduction de la capacité d'apprentissage (Kaur et Gill, 2006).

Divers avantages pour la santé, y compris l'amélioration des fonctions cardiovasculaires et cérébrales ont été liés à la consommation des polyphénols alimentaires dérivés des fruits et des légumes (Kennedy et *al.*, 2014). Ces composés sont capables de protéger les cellules neuronales à travers diverses cibles intracellulaires testées dans différents modèles *in vivo* et *in vitro* (Campos-Esparza Mdel et Torres-Ramos, 2010).

L'effet neuroprotecteur des polyphénols réside dans leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et à neutraliser les radicaux libres et à chélater les ions des métaux de transition (Aquilano et *al.*, 2008). Youdim et *al.*, (2003), ont démontré que les flavonoïdes et certains métabolites sont capables de traverser le cerveau-sang, et que le potentiel de perméabilité est compatible avec la lipophilie du composé.

En outre, les polyphénols possèdent des propriétés qui peuvent combattre le stress oxydatif et stimuler l'activation des molécules qui aident à la plasticité synaptique, affectant ainsi un large éventail de mécanismes dans le cerveau qui peuvent aider au maintien de la santé cognitive et mentale dans les maladies neurodégénératives (Gomez-Pinilla et Nguyen, 2012).

Les polyphénols ont été associés à un risque réduit de développer une démence, une amélioration des performances cognitives dans le vieillissement normal et une amélioration de l'évolution cognitive par leurs actions neuroprotectrices à travers le potentiel de protéger les

neurones contre les lésions induites par les neurotoxines, une capacité à supprimer la neuroinflammation et le stress oxydatif (Vauzour, 2012).

La grenade a un potentiel antioxydant élevé et plusieurs avantages pour la santé; des propriétés anti-athérogènes, antihypertensives et anti-inflammatoires. La Grenade peut être utilisée dans la prévention et le traitement de diverses maladies: beaucoup de cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, et d'autres pathologies. Ce fruit est riche par plusieurs classes de composants chimiques tels que; les flavonoïdes, les anthocyanes, l'acide punique, les ellagitanins, les alcaloïdes, une partie des hydrates de carbone, les acides organiques simples et d'autres composants (Zarfeshany et *al.*, 2014).

Dans ce contexte bibliographique, notre travail de recherche se résume en deux parties:

- Une première partie est consacrée à une revue bibliographique mettant l'accent sur les métaux lourds (Aluminium et plomb) et la plante choisie.
- Une seconde décrit la partie expérimentale qui traite:
 1. une étude *in vitro* consacrée à la phytochimie des extraits de *Punica granatum* (jus et extrait méthanolique issu d'écorce); une extraction, un dosage quantitative des polyphénols et une caractérisation qualitative par des tests phytochimiques, une chromatographie sur une couche mince et enfin une HPLC-DAD pour le jus de grenade.
 2. une étude *in vivo* comprend:
 - a. une intoxication chronique par les métaux lourds (Aluminium ou Plomb) et un traitement par les extraits de grenade pendant 90 jours.
 - b. l'impact des métaux lourds sur les paramètres neurologiques
 - c. une étude biochimiques qui portera sur la réalisation des dosages de l'aluminium et du plomb au niveau du cerveau, une exploration de la fonction hépatique par le dosage du TGP, TGO, Cholestérol, et un dosage du calcium.
 - d. une étude histologique du cerveau, foie et rein par la coloration hématoxyline et éosine (H&E).
 3. les résultats et discussion

Ce travail s'achève par une conclusion et des perspectives.

PARTIE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Métaux lourds Al & Pb

1. Plomb

1.1 Généralités

Le Plomb est trouvé dans la nature en tant que cation divalent, formant principalement des complexes stables avec le soufre. Du point de vue chimique, il appartient au groupe IVa du tableau périodique des éléments, il a relativement un rayon ionique important ($1,2 \text{ \AA}$) et une forte électronégativité (2,33 dans l'échelle de Pauling), ce qui favorise ses interactions avec la coordination des groupes de protéines (Godwin, 2001; Ahyayauch et *al.*, 2013).

Le plomb (Pb) est un métal xénobiotique sans fonction essentielle connue dans la croissance cellulaire, la prolifération ou la signalisation (White et *al.*, 2007). Il peut endommager différents systèmes du corps y compris le système hématopoïétique, rénal et squelettique, le système nerveux central étant sa cible principale (Wilson et *al.*, 2000; Ahyayauch et *al.*, 2013).

1.2 Sources d'exposition

Le plomb est un élément omniprésent dans l'environnement, il est utilisé dans de nombreuses activités industrielles, notamment l'extraction, le raffinage et la production de batteries au plomb (Figure 1).

L'exposition humaine au plomb se produit par l'intermédiaire de la nourriture, l'eau, l'air, le sol, l'utilisation de la vaisselle en céramique, les boîtes de conserve et de la plomberie. Une autre source importante d'exposition au Pb est la peinture détériorée dans les anciens logements (White et *al.*, 2007).

Le plomb est transféré dans la chaîne alimentaire à l'homme et aux animaux, sa toxicité dépend de sa forme chimique administrée à l'animal, de la voie d'administration et de la fréquence et de la durée administrées aux animaux (Baht et Moy, 1997; Ibrahim et *al.*, 2017).

De plus, d'autres sources de contaminations existent comme les fonderies, les incinérateurs et les industries de fabrication de Pb (White et *al.*, 2007).

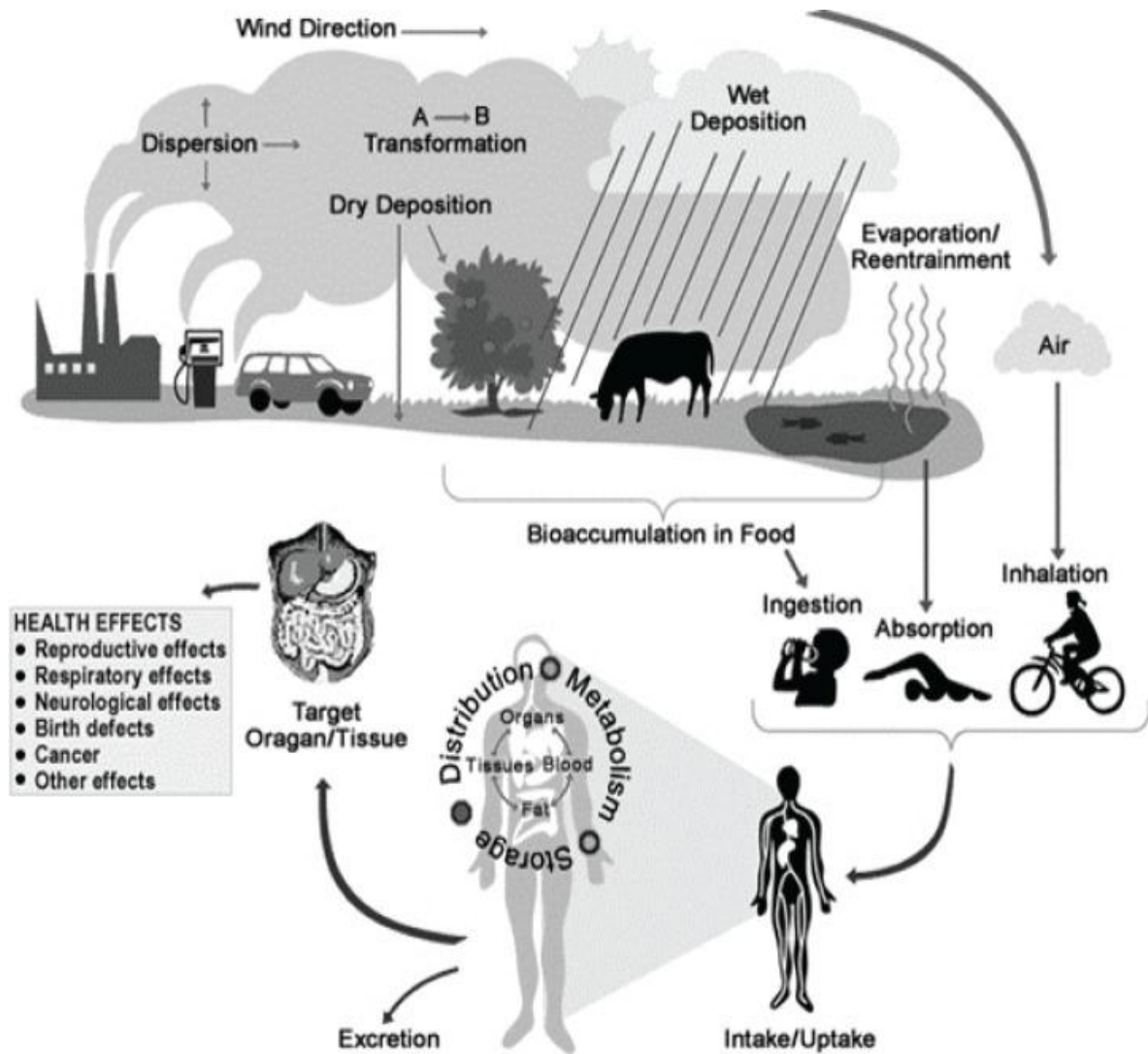


Figure 1: Sources d'exposition et les effets sur la santé humaine (Wani *et al.*, 2015)

1.3 Toxicocinétique

Les principales voies d'exposition au plomb sont l'inhalation et l'ingestion. L'exposition par inhalation au Pb est une voie d'absorption beaucoup plus efficace que l'ingestion (Neal et Guilarte, 2013). Une fois absorbé, le Plomb est conjugué dans le foie avec du glutathion où une partie de celui-ci et son conjugué sont accumulés dans les tissus hépatiques (Yagminas *et al.*, 1990)

Une fois que le plomb atteint la circulation sanguine; il est excrété dans les urines et la bile à un taux de clairance de 1 à 3 ml / min, avec une demi-vie d'environ 30 jours. Le plomb restant se lie aux globules rouges, et se répartit dans les tissus et finira par s'accumuler dans l'os. Bien que, la demi-vie du Pb dans le sang est seulement de 35 jours, dans le cerveau, elle est environ de 2 ans et en os, il persiste des décennies. Pendant la grossesse et la période post-

partum, le Pb est libéré de l'os dans le sang augmentant ainsi les niveaux du plomb dans le sang (Gulson et *al.*, 1999) .

1.4 Les effets toxiques du plomb

Le plomb est une toxine environnementale omniprésente capable de provoquer de nombreuses pathologies circulatoires, neurologiques, hématologiques, gastro-intestinales, reproductives et immunologiques aiguës et chroniques (Nemsadze et *al.*, 2009).

Le plomb a été associé à diverses formes de cancer, de néphrotoxicité, d'effets sur le système nerveux central et de maladies cardiovasculaires chez l'homme. La toxicité du plomb est étroitement liée à l'âge, au sexe, à la voie d'exposition, à la solubilité, à l'oxydation du métal, au pourcentage de rétention, à la durée d'exposition, à la fréquence d'absorption, au taux d'absorption, aux mécanismes et à l'efficacité de l'excrétion (Pitot et Dragan, 1993).

1.4.1 Effets hématologiques

Le plomb affecte directement le système hématopoïétique en inhibant plusieurs enzymes clés impliquées dans la voie de synthèse de l'hème ce qui limite la synthèse de l'hémoglobine. Il réduit également la durée de vie des érythrocytes circulants en augmentant la fragilité des membranes cellulaires. Les séquelles combinées de ces deux processus conduisent à l'anémie (Flora et *al.*, 2012).

Le plomb agit sur la synthèse de l'hème via son effet inhibiteur de l'ALA déshydrogénase (ALAD), l'enzyme impliquée dans l'étape finale de la voie synthétique de l'hème ce qui provoque une sorte d'anémie et un niveau accru d'acide δ -aminolévulinique, qui est un agent neuropathogène (Pearce, 2007) Figure 2.

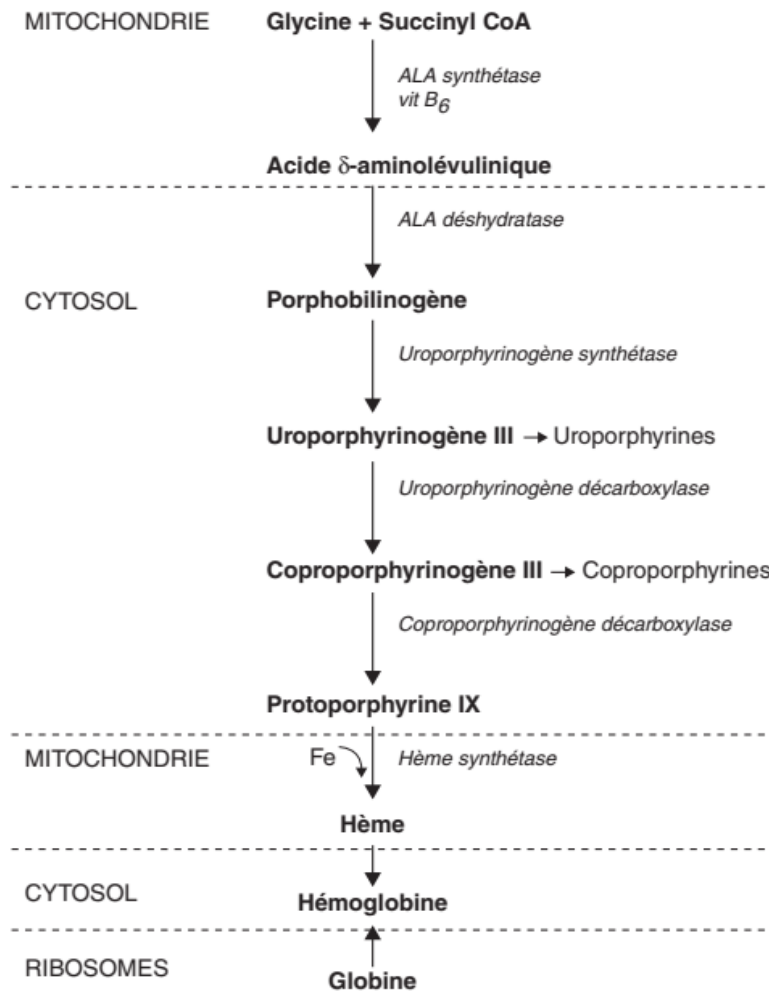


Figure 2: Synthèse de l'hème. Le plomb inhibe l'ALA-déshydratase, l'hème-synthétase et à un moindre degré, la coproporphyrinogène-décarboxylase (Garnier., 2005).

1.4.2 Effets sur le système nerveux central

1.4.2.1 Neurotransmission et signalisation cellulaire

La neurotoxicité au plomb provoque une altération comportementale et neurochimique des neurones en raison des changements et des perturbations des principaux composants structuraux de la barrière hémato-encéphalique, à travers une lésion primaire des astrocytes et des dommages secondaires de la microvasculature endothéliale (Fischbein, 1999).

La capacité du plomb à traverser la barrière hémato-encéphalique est due en grande partie à sa capacité à se substituer aux ions calcium. Au niveau moléculaire, le plomb interfère avec l'action régulatrice du calcium sur les fonctions cellulaires et perturbe de nombreuses activités biologiques intracellulaires liés à ce métal (Sanders et *al.*, 2009).

Le plomb interfère également avec la libération des neurotransmetteurs, perturbant la fonction des systèmes GABAergique, dopaminergique et cholinergique, ainsi que l'inhibition des canaux ioniques NMDA pendant la période néonatale (Verity, 1995).

1.4.2.2 Stress Oxydatif et Membrane

La toxicité primaire du plomb découle de sa capacité à provoquer un stress oxydatif en induisant la génération des ROS, en réduisant le système de défense antioxydant des cellules via l'épuisement du glutathion, en inhibant les enzymes sulfhydryl-dépendantes et / ou en augmentant la susceptibilité des cellules à l'attaque oxydante (Flora et *al.*, 2012).

Le plomb induit un stress oxydatif qui joue un rôle important dans les lésions cérébrales (Soltaninejad et *al.*, 2003). L'induction de la peroxydation lipidique et la génération accrue des radicaux libres d'oxygène dans des tissus de différents organes de souris après l'inhalation de l'acétate de plomb pendant 1 h suggérant l'induction de la génotoxicité et la carcino-génotoxicité par des interactions indirects, tels que l'implication du stress oxydant (Valverde et *al.*, 2001).

Ye et *al.*, (1999) ont signalé un taux sanguin de plomb corrélé positivement avec une augmentation significative du taux de MDA plasmatique, comme mesure de la peroxydation lipidique.

1.4.3 Effets rénaux

Le plomb peut exercer des effets toxiques sur plusieurs organes, mais ceux du rein sont les plus insidieux. La néphropathie aiguë par le plomb est caractérisée par un dysfonctionnement tubulaire proximal avec le développement d'un syndrome de type Fanconi, des altérations de la structure mitochondriale et le développement de corps d'inclusion cytosoliques et nucléaires (Nolan et Shaikh, 1992).

L'effet du plomb sur la fonction rénale pourrait être attribué à des altérations dans le système antioxydant défensif, entraînant une lésion rénale (Ibrahim et *al.*, 2012).

Deux types de néphropathie ont été observés chez l'homme; la néphropathie aiguë et chronique. La néphropathie aiguë du Pb est caractérisée fonctionnellement par un déficit généralisé des mécanismes de transport tubulaire (syndrome de Fanconi) et morphologiquement par l'apparition des modifications dégénératives de l'épithélium tubulaire et des inclusions nucléaires contenant des complexes de protéines Pb. La néphropathie chronique par le plomb est une maladie rénale irréversible qui se développe après des mois ou

des années d'exposition excessive. Elle est associée à une forte incidence de dysfonctionnement rénal, caractérisée par des modifications glomérulaires et tubulo-interstitielles, entraînant une insuffisance rénale chronique, une hypertension et une hyperuricémie (Rastogi, 2008).

1.4.4 Effets hépatiques

Le plomb est conjugué dans le foie avec le glutathion où une partie de celui-ci et son conjugué s'accumulent dans les tissus hépatiques conduisant à des fonctions hépatiques altérées. Des études biochimiques ont montré que le plomb induit une réduction des taux de lipides, du cholestérol et du glycogène dans le foie et une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique (Jarrar et Taib, 2012).

L'exposition au plomb provoque une histopathologie hépatique prononcée, attestée par des alternances histologiques dans le foie, notamment une nécrose focale avec des cellules inflammatoires, une congestion, des sinusoides non visibles, un gonflement centrilobulaire, une vacuolisation, un gonflement des hépatocytes, une désorganisation du parenchyme, une dilatation de l'espace inter hépatocytaire et des caillots hémorragiques (Sharma et Pandey, 2010).

1.4.5 Effets sur l'os

Selon Pounds et *al.*, (1991); l'intoxication au plomb modifie directement et indirectement de nombreux aspects de la fonction des cellules osseuses:

Tout d'abord, le plomb peut altérer indirectement la fonction des cellules osseuses en modifiant en particulier la 1,25-dihydroxyvitamine D3, qui modulent la fonction des cellules osseuses. Deuxièmement, le plomb peut modifier directement la fonction des cellules osseuses en perturbant la capacité des cellules osseuses à répondre à la régulation hormonale. Troisièmement, le plomb peut altérer la capacité des cellules à synthétiser ou à sécréter d'autres composants de la matrice osseuse, comme le collagène ou les sialoprotéines osseuses (ostéopontine). Enfin, le plomb peut directement affecter ou remplacer le calcium dans les sites actifs du système messager du calcium, entraînant une perte de la régulation physiologique

1.4.6 Effets digestifs

Un des systèmes importants qui sont touchés par le plomb est le tractus gastro-intestinal parce que le plomb ingéré est directement absorbé par ce dernier. Le plomb

provoque des changements importants dans la prolifération et la différenciation des cellules duodénales au cours du développement (Sharma et Barber, 2012).

1.4.7 Effets respiratoires

Il est suggéré que la pollution par le plomb peut contribuer à la pathogenèse des cancers pulmonaires, de l'asthme, de la MPOC, mais il n'y a pas encore de résultat satisfaisant à cet égard (Khazdair et *al.*, 2012). L'exposition au plomb peut être associée à une production excessive d'immunoglobuline E, ce qui pourrait augmenter le risque d'asthme (Joseph et *al.*, 2005). Des résultats récents indiquent que le plomb peut être un facteur de développement de l'asthme en modifiant le stress oxydatif, les réponses immunitaires et inflammatoires (Farkhondeh et *al.*, 2014).

1.4.8 Effets cardiovasculaires

Les effets cardiovasculaires du plomb ne se limitent pas à l'augmentation de la pression artérielle et l'hypertension. L'exposition au plomb a également été associée à une augmentation de l'incidence des critères cardiovasculaires cliniques tels que la coronaropathie, l'accident vasculaire cérébral et la maladie artérielle périphérique et d'autres anomalies des fonctions cardiovasculaires telles que l'hypertrophie ventriculaire gauche et les altérations du rythme cardiaque. L'exposition aiguë au plomb affecte la fonction cardiaque et que l'exposition chronique a été liée à l'athérosclérose et à l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire (Navas-Acien et *al.*, 2007; Vaziri et Gonick, 2008).

1.4.9 Effets sur la reproduction

Le plomb est connu pour causer un certain nombre de résultats défavorables chez les hommes et les femmes. Les effets signalés chez les hommes incluent une baisse de la libido, des effets sur la spermatogenèse (motilité et nombre réduits, morphologie normale accrue), lésions chromosomiques, infertilité, fonction prostatique anormale et changements dans la testostérone sérique. Les effets chez les femmes incluent l'infertilité, la fausse couche, la rupture prématurée de membrane, la pré-éclampsie, l'hypertension de grossesse et l'accouchement prématuré (Winder, 1993)

1.4.10 Effets tératogènes

Le plomb peut facilement traverser le placenta chez les mères enceintes exposées au plomb (Leiba et *al.*, 2010; Sadeghi et *al.*, 2013). Des expositions élevées au Pb chez les femmes enceintes peuvent causer un faible poids du nourrisson à la naissance, une

prématurité, des fausses couches, ou mort-né. En outre, lorsque le niveau du Pb dans le sang maternel augmente, les niveaux de Pb dans le lait maternel augmentent également, ce qui pose un risque supplémentaire pour le nouveau-né (Li et *al.*, 2000).

1.4.11 Effets mutagènes

Le plomb semble toucher les acides nucléiques par un mécanisme inconnu, ce qui suscite des inquiétudes concernant les anomalies chromosomiques et la régulation génétique (Sadeghi et *al.*, 2013). Le stress oxydatif peut conduire à des modifications de l'ADN de plusieurs façons qui implique des sites abasiques, des cassures d'ADN simple ou double brin, des mutations, des délétions ou des translocations, des transversions et la réticulation avec des protéines. La plupart de ces modifications de l'ADN sont très pertinentes pour la carcinogenèse, le vieillissement et les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et auto-immunes (Birben et *al.*, 2012; Cui et *al.*, 2012).

1.5 Thérapie chélatrice du Plomb

Dimercaprol, éthylènediamine tétra acétique de calcium disodique (CaNa₂EDTA) et l'acide dimercaptosuccinique ou DMSA sont les trois agents principalement utilisés pour la chélation (Gracia et Snodgrass, 2007).

La chélation du plomb avec l'EDTA calcium disodique implique l'échange d'un ion calcium central de l'antidote par un ion de plomb (Pb²⁺), un processus qui est assisté par le fait que le complexe calcique est beaucoup moins stable que le complexe plomb. Le chélate de plomb formé est excrété par filtration glomérulaire (Bradberry et Vale, 2009).

Ce médicament chélateur a des effets secondaires graves principalement les insuffisances rénales, les arythmies, la tétanie, l'hypocalcémie, l'hypotension, appauvrissement de la moelle osseuse, le temps de saignement prolongé, les convulsions, l'arrêt respiratoire. D'autres effets indésirables peuvent inclure la fatigue, les maux de tête, la fièvre, la congestion nasale, larmoiement, les lésions cutanéomuqueuses, la glycosurie, la myalgie, l'hépatotoxicité et des symptômes gastro-intestinaux (Flora et Vidhu Pachauri, 2010).

Le DMSA est un chélateur efficace qui chélate principalement le plomb rénal. Il est généralement bien toléré, mais peut parfois occasionner des effets indésirables cliniquement importants (Bradberry et Vale, 2009). La chélation implique la coordination du Pb²⁺ avec un atome d'oxygène et un atome de soufre du DMSA (Rivera et *al.*, 1989).

2. Aluminium

2.1 Généralités

Aluminium est l'un des métaux les plus abondants de la croûte terrestre et qui représente environ 8 % du total des composants minéraux. Dans la nature, Al est présent sous forme d'un cation trivalent (Al^{3+}). Il n'existe pas à l'état pur mais toujours combiné avec d'autres éléments tels que le chlorure, l'hydroxyde, le silicate, le sulfate et le phosphate. La large distribution assure le risque d'exposition humaine et des dommages (Zhang et Zhou, 2005). Il peut se lier à l'oxygène et à des composés contenant de l'azote, en particulier aux phosphates organiques et inorganiques grâce à ces types d'interactions, Al se lie à de nombreuses macromolécules biologiques (Ganrot, 1986).

Aluminium n'a aucune fonction biologique. Au contraire, son accumulation dans les tissus et les organes entraîne une toxicité et leur dysfonctionnement, ces effets sont généralement corrélés avec la concentration locale du métal (Yokel et *al.*, 2008). Al se lie à diverses protéines liant les métaux et perturbe l'homéostasie d'autres métaux tels que le magnésium, le calcium et le fer: en fait, Al imite ces métaux dans leurs fonctions biologiques et déclenche de nombreuses altérations biochimiques (Kawahara et Kato-Negishi, 2011).

2.2 Sources d'exposition

L'aluminium se trouve naturellement dans les silicates, la cryolite et la roche de bauxite. Les processus naturels représentent la majeure partie de la redistribution de l'aluminium dans l'environnement. La précipitation acide mobilise l'aluminium à partir des sources naturelles, et les rejets anthropiques directs de composés d'aluminium associés aux processus industriels se produisent principalement dans l'air. Certaines utilisations conduisent à la présence d'aluminium dans l'eau potable et les denrées alimentaires (Krewski et *al.*, 2007), et l'utilisation d'un certain nombre de produits cosmétiques et pharmacologiques (Yokel et *al.*, 2008).

2.3 Toxicocinétique

L'exposition à Al se produit par diverses voies, y compris l'inhalation, l'ingestion et l'absorption dermique. En raison de son abondance dans de nombreux produits alimentaires, son ingestion a été la voie prédominante de la façon dont il gagne les systèmes biologiques humains (Krewski et *al.*, 2007; Yokel et McNamara, 2001) Figure 3.

Les sites d'absorption d'aluminium sont la cavité nasale (Yokel et McNamara, 2001), le tractus gastro-intestinal (eau potable et nourriture) (Ittel, 1993), la peau (antitranspirant) (Exley, 2004 a), l'épithélium olfactif et oral (Roberts, 1986), épithélium pulmonaire (Barr et *al.*, 1993) et par injection intramusculaire (vaccins), peuvent éventuellement être absorbés (Yokel et McNamara, 2001, Kashiwagi et *al.*, 2014).

Dans le sang, l'aluminium se retrouve majoritairement dans la fraction plasmatique, lié de façon préférentielle à la transferrine (80 %), mais également à l'albumine (10 %) et à des protéines de bas poids moléculaire, formes de transport qui vont favoriser son stockage vers certains organes cibles (Gourier-Fréry et Frér, 2004).

Les effets toxiques de l'aluminium s'observent au niveau du cerveau, des os, du sang, du cœur, foie et la rate (Willhite et *al.*, 2014). Le cerveau est le principal organe cible de son accumulation (Kaneko et *al.*, 2004). Il peut traverser la barrière hémato-encéphalique (Zatta et *al.*, 2002), et s'accumuler dans toutes les régions du cerveau, la plupart étant dans l'hippocampe (Kaur et *al.*, 2006 b). L'os semble être un puit important pour l'Al absorbé. Plusieurs études ont montré le rôle de l'Al dans les troubles osseux tels que l'ostéomalacie et l'ostéoporose (Chary-Valckenaere et *al.*, 1994).

Après absorption gastro-intestinale (ou injection intra péritonéale), l'aluminium est véhiculé par l'intermédiaire de la circulation portique vers le foie, où il subirait une biotransformation de premier passage; c'est-à-dire, une grande partie est retirée de la circulation sanguine (Day et *al.*, 1994).

Les reins éliminent efficacement l'aluminium du corps humain (Brown et *al.*, 2008). L'élimination d'Al est principalement rénale avec 2% de la fraction absorbée est excrété dans la bile (Robert et *al.*, 2001). Différents mécanismes d'excrétion rénale de Al ont été suggérés. Celles-ci comprennent la filtration glomérulaire (Yokel et McNamara, 1985), la réabsorption tubulaire de l'Al filtré et sa sécrétion dans le néphron distal (Shirley et Lote, 2005) et l'excrétion dans les tubules distaux (Al-Hashem, 2009). Ainsi, l'Al accumulé dans les reins induit une toxicité rénale (Exley, 2004 b). Si une charge importante supérieure à la capacité d'excrétion de l'organisme, l'excès est déposé dans divers tissus, y compris les os, le cerveau, le foie, le cœur, la rate, et le muscle. Cette accumulation entraîne une morbidité et la mortalité à travers divers mécanismes (Bernardo et *al.*, 2010). En outre, l'arrêt de l'exposition est suivi d'un relargage à partir des os et d'une excrétion urinaire pendant plusieurs mois ou années (Testud, 1998).

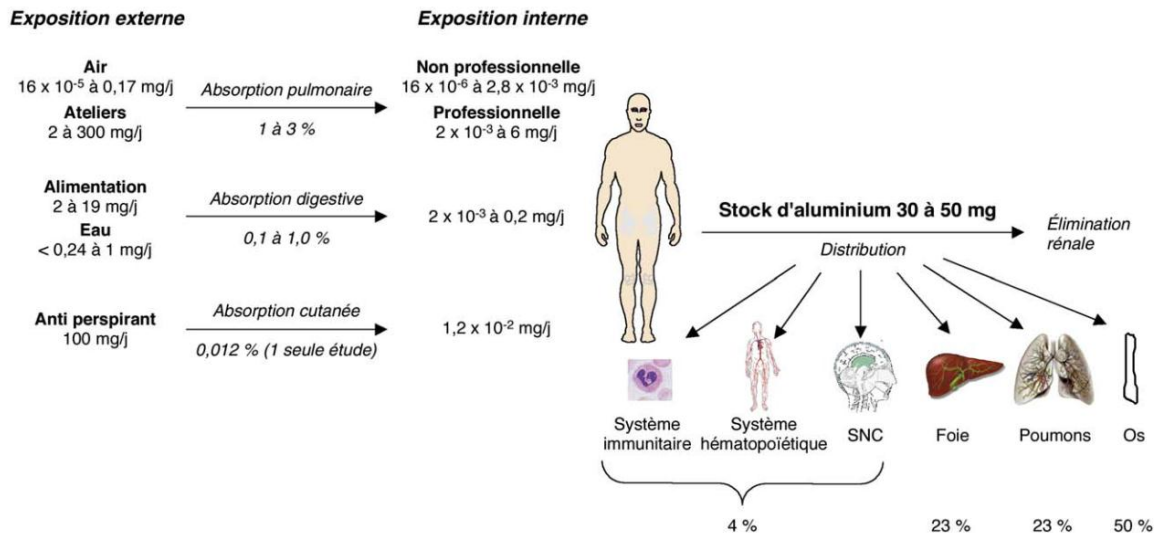


Figure 3: Absorption quotidienne et distribution de l'aluminium dans l'organisme humain (Gourier-Fréry et Fréry, 2004)

2.4 Les effets toxiques de l'aluminium

2.4.1 Effets hématologiques

Aluminium provoque une anémie normo-ou microcytaire, car il perturbe la maturation des cellules érythroblastiques en série et la biosynthèse de l'hème; Il diminue la résistance osmotique des globules rouges. L'aluminium inhibe les mécanismes défensifs liés aux globules blancs et aux macrophages. Un certain nombre de processus, à savoir l'activité hémolytique de l'aluminium, la durée de vie plus courte des cellules sanguines ou le processus d'érythropoïèse perturbé, sont responsables des changements hématologiques (Osińska et al., 2004).

2.4.2 Effets sur le système nerveux central

2.4.2.1 Stress Oxydatif et Membrane

Le chlorure d'Al accélère la peroxydation lipidique (LPO), une activité réduite de l'acétylcholine estérase (AChE) et réduit les niveaux de superoxyde dismutase (SOD), de catalase (CAT), de glutathion réduit (GSH) et de glutathion-S-transférase (GST). L'augmentation des radicaux oxygénés et la perte de l'hémostase cellulaire provoquent un stress oxydatif qui conduit à une dysfonction cognitive (Amjad et Umesalma, 2015)

L'augmentation de du taux d'aluminium dans le cerveau est capable de stimuler la génération de radicaux libres. Diverses études in vitro montrant que les radicaux libres sont

capables de favoriser la dégénérescence et la mort des neurones. Les produits oxydants libérés dans les neurones sont l'aldéhyde, les carbonyles, les peroxytrinitriles, les nitrotyrosines et les enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), l'hémoxigénase-I, etc (Markewberry, 1994).

Al altère l'état redox cellulaire en inhibant les enzymes impliquées dans la défense antioxydante qui neutralisent les radicaux libres ce qui se traduit par une diminution significative des activités de la SOD et de la catalase dans le cerveau, l'hémisphère cérébral et le tronc cérébral après exposition à l'Al (Nehru et Anand, 2005).

2.4.2.2 Neurotransmission et signalisation cellulaire

Le chlorure d'Al est cholinotoxique et produit un changement fonctionnel dans la neurotransmission cholinergique et noradrénergique. Acetyl cholinestérase est responsable du métabolisme de l'acétylcholine en métabolites inactifs, la choline et l'acétate dont les altérations causent des changements neurocomportementaux, notamment la mémoire et la fonction cognitive (Amjad et Umesalma, 2015). Selon Maya et *al.*, (2016) et Maheswari et *al.*, (2014), le potentiel cholinotoxique de l'Al est une conséquence du stress oxydatif.

Beaucoup d'études ont indiqué que l'exposition à Al entravait l'expression des récepteurs du glutamate et de la fonction hippocampique, bien que les mécanismes sous-jacents restent insaisissables (Cao et *al.*, 2016).

L'aluminium est responsable de deux principaux types de dommages toxiques dans les cellules. En tant que pro-oxydant, l'aluminium provoque des dommages oxydatifs à la fois par lui-même et en synergie avec le fer. L'aluminium entre également en compétition avec les métaux essentiels ou les remplace - principalement le Mg^{2+} , le fer et les ions Ca^{2+} - et les protéines et leurs cofacteurs (Walton, 2012).

La perturbation du métabolisme des neurotransmetteurs de la monoamine dans le cerveau, résultant de l'inhibition de la dihydroptéridine réductase par l'aluminium, a également été suggérée comme une source potentielle de signes cliniques d'intoxication par l'aluminium (Gonçalves et Silva, 2007).

2.4.3 Effets rénaux

Une détérioration significative de l'architecture et de la fonction rénale après une exposition à l' $AlCl_3$. Ceci s'est accompagné par une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation rénale, ce qui suggère une forte activité prooxydante de l' $AlCl_3$ malgré son état non rédox (Al Dera, 2016).

L'accumulation de l'aluminium dans le tissu rénal affecte le métabolisme cellulaire, favorise le stress oxydatif et induit des altérations du transport au niveau des tubules rénaux, ainsi qu'une altération de l'équilibre hydrique et sodique (Mahieu et *al.*, 2003). En effet, l'accumulation d'Al dans le rein a été associée à une détérioration de la fonction rénale (Al-Hashem, 2009)

2.4.4 Effets hépatiques

L'aluminium (Al) induit une cholestase associée à des multiples altérations dans les transporteurs hépatocellulaires impliqués dans la fonction sécrétoire de la bile. Ces données indiquent que le stress oxydatif joue un rôle crucial dans la cholestase, les lésions hépatocellulaires apoptotiques / nécrotiques et l'altération de la fonction de transport du foie induite par Al (Gonzalez et *al.*, 2007).

L'administration orale d'aluminium donne lieu à des altérations de l'architecture des hépatocytes, à un métabolisme cellulaire accru, à une infiltration de cellules inflammatoires, à des variations nucléaires telles que la pyknosis, la karryorrhéxis témoignant d'un hépatite toxique (Agarwal et Jain, 2011).

2.4.5 Effets sur l'os

L'aluminium affecte les os et provoque des perturbations dans les niveaux de phosphore et de calcium, ce qui est démontré principalement par l'ostéomalacie (Osinska et *al.*, 2004).

Dans l'os, des doses élevées d'Al inhibent le remodelage, ralentissant à la fois les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques provoquant l'ostéomalacie et la maladie osseuse adynamique. En revanche, Il a été démontré que l'aluminium a une action mitogénique à l'ostéoblaste, mais que l'effet de la résorption sur les modifications ostéoblastiques de l'activité ostéoclastique n'a pas encore été déterminé. Les taux d'hormone parathyroïdienne (PTH) sont perturbés par l'Al chez les humains et les animaux (Jeffery et *al.*, 1996).

2.4.6 Effets digestifs

L'aluminium augmente l'intensité et la durée de l'inflammation de l'activité de la myéloperoxydase colique, l'expression des cytokines inflammatoires et diminue le renouvellement des cellules épithéliales. Dans des conditions basales, l'aluminium altère la fonction de la barrière intestinale. Ces effets délétères de l'aluminium suggèrent fortement que l'aluminium pourrait être un facteur de risque environnemental (Pineton de Chambrun et *al.*, 2014).

2.4.7 Effets respiratoires

L'exposition à des polluants atmosphériques dans l'industrie de l'aluminium primaire peut conduire au développement de symptômes asthmatiques, ainsi qu'à une réduction de la fonction respiratoire (Kongerud et *al.*, 1990).

Aluminium a été associée à une pneumoconiose dans certaines circonstances d'exposition. Plusieurs études ont montré que l'exposition à la poussière et aux fumées d'aluminium peut altérer la fonction pulmonaire. En effet, la fibrose pulmonaire, l'alvéolite pulmonaire et la protéinose alvéolaire, l'asthme, la bronchite chronique et la pneumonie chronique ont été signalés dans des milieux qui contiennent des polluants professionnels (Elserougy et *al.*, 2012).

2.4.8 Effets cardiovasculaires

L'aluminium provoque une cardiotoxicité qui se traduit par une diminution de l'indice anti-athérogène et une augmentation de l'indice de risque coronarien. Ces marqueurs de la toxicité cardiaque pourrait être attribuée à la fois au stress oxydatif du myocarde et au métabolisme lipidique délétère (Alqayim, 2015). Le mécanisme par lequel Al produit des effets de cardiotoxicité peut être attribué au stress oxydatif et à la perturbation du système redox intracellulaire (Ghorbel et *al.*, 2017).

2.4.9 Effets sur la reproduction

L'ingestion du chlorure d'aluminium entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, du nombre de spermatozoïdes et du taux de spermatozoïdes vivants / morts ainsi des anomalies totales du spermatozoïde et un dysfonctionnement testiculaire (Ighodaro et *al.*, 2012). Wang et *al.*, (2011) ont montré que la sécrétion des hormones sexuelles E2, P, LH et FSH chez les rattes est inhibée par une exposition chronique à aluminium.

2.4.10 Effets tératogènes

Il est maintenant bien établi que Al peut être une toxine embryonnaire / fœtale en fonction de la voie d'exposition et / ou de la solubilité du composé Al administré. Bien que le chlorure d'Al a été jugé embryotoxique et tératogène lorsqu'il a été administré par voie parentérale à des rats et à des souris (Domingo et *al.*, 2000).

2.4.11 Effets mutagènes

Les composés aluminiques peuvent se lier à l'ADN et à l'ARN et inhiber des enzymes telles que l'hexokinase, les phosphatases acides et alcalines, la phosphodiesterase et la phosphoxydase (Ochmanski et Barabasz, 2000).

2.5 Thérapie chélatrice de l'aluminium

La déferoxamine (DFO), isolée de *Streptomyces pilosus*, est un chélateur d'aluminium assez bien établi. Le DFO a une affinité pour le fer ferrique de presque neuf ordres de grandeur au-dessus de celle de l'aluminium. Cependant, les effets secondaires de la thérapie par le DFO incluent l'hyperparathyroïdie (potentiellement due à l'atténuation de l'effet inhibiteur de l'aluminium sur la fonction de la glande parathyroïde lors de la chélation), l'hypocalcémie (postulée à se produire en raison d'une augmentation permissive du calcium osseux après chélation de l'aluminium), et diminution de la ferritine (secondaire aux effets de chélation du fer ferrique du DFO) (Smith, 2013).

Chapitre 2

Punica granatum L

1. Généralités

Plusieurs recherches ont montré l'efficacité des plantes médicinales et la nutrition sur l'amélioration de la toxicité induite par les métaux. Ils affectent la biodisponibilité, la toxicodynamique et le transport vers les organes cibles, et influencent les réponses fonctionnelles immunologiques, biochimiques ou cytologiques aux métaux lourds (Chukwuemeka et al., 2012).

Les propriétés chélatrices, prophylactiques et curatives de l'*Allium sativum* (Ail) (Obioha et al., 2009, Kumar et al., 2017), de *Garcinia kola* (Nwokocha et al., 2010), *Sarcocornia perennis L* (Gargouri et al., 2017), d'*indigofera oblongifolia* (Dkhil et al., 2016), de *Ginkgo biloba* (Mohamed et Abd El-Moneim, 2017) et de *Ziziphus Jujube Mill* (Cheng et al., 2012) ont été rapportées liés principalement à leurs propriétés antioxydantes.

En général, un antioxydant peut prévenir la toxicité des métaux lourds de trois façons (Garcia et Gonzalez, 2008, Flora, 2012):

- En inactivant les ROS générés au niveau moléculaire, mettant ainsi fin à la réaction en chaîne radicalaire (rupture de chaîne).
- En chélatant le métal et en empêchant la formation supplémentaire des ROS.
- En chélatant le métal et en le maintenant dans un état redox, ce qui conduit à son incapacité pour réduire l'oxygène moléculaire.

2. *Punica granatum*

2.1. Généralités

Punica granatum, communément appelée grenade, est un membre de la famille des monochéniques, Punicaceae. Un Arbuste de 2-5 m très rameux. Feuilles opposées oblongues, luisantes. Fleurs d'un rouge écarlate, grandes, 20-25 mm, par 1-3 à l'aisselle des feuilles. Calice longuement campanulé coriace, rouge orangé à 5-7 lobes. Pétales 5-7. Etamines très nombreuses. Fruit volumineux couronné par la partie supérieure du calice, à graines nombreuses (grenades) cultivé partout et souvent sub spontané dans le Tell (Quezel et santa, 1962).



Figure 4: *Punica granatum*

Cette espèce végétale a été cultivée au Moyen-Orient, il y a plus de 5 000 ans et a été utilisée en médecine Siddha, Ayurveda et Unani est considéré "une pharmacie à part entière" (Akter et *al.*, 2013). La grenade est un symbole de la vie, de la longévité, de la santé, de la féminité, de la fécondité, du savoir, de la moralité, de l'immortalité et de la spiritualité, sinon de la divinité (Mahdihassan, 1984; Lansky et Newman, 2007; Charles, 2012).

En Algérie, les variétés les plus cultivées en Oranie seraient : Tendral (appelée Molla), Blanca, Si Hueso, Colorado. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petits jardins en Kabylie, on ne connaît que leur l'appellation locale (Lahlou, Elmouze, ..). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat; Espagne rouge, Gajin Selection, station Corda, travita, Sefri, Chelfi, Moller hueso, Zemdautomne, Doux de kolea, Mellisse Sulfani, Messaad, Papers shell, Spanish duoy (INRAA, 2006).

Selon Lansky et Newman (2007), environ 67% du fruit de la grenade est constitué de d'écorce, tandis que les graines et le jus représentent respectivement environ 3 et 30% du poids du fruit. Les graines renferment environ 30% d'huiles.

La grenade possède diverses propriétés pharmacologiques et toxicologiques, y compris des activités antioxydantes, anti-inflammatoires (en inhibant les cytokines pro-inflammatoires), anticancéreuses et anti-angiogéniques (Rahimi et *al.*, 2012).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études sur les propriétés antioxydantes, anti-cancérogènes et anti-inflammatoires des constituants de la grenade ont été publiées, portant sur le traitement et la prévention du cancer, des maladies cardiovasculaires, du diabète, des affections dentaires et des dommages des rayons ultraviolets. D'autres applications potentielles incluent l'ischémie cérébrale infantile, l'infertilité masculine, la maladie d'Alzheimer, l'arthrite et l'obésité (Bhandari, 2012).

2.2 Aspects ethnobotaniques de *P. granatum*

2.2.1. Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Telle est cette classification (Spichiger et *al.*, 2004 in Wald, 2009):

- **Règne** : Plantae
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Ordre** : Myrtales
- **Famille** : Punicaceae
- **Genre** : Punica
- **Espèce** : *P. granatum*

Cette classification a été révisée en 2003, donnant naissance à la classification phylogénétique APGII, qui comporte 457 familles réparties dans 45 ordres. Au sein de cette classification, la position du grenadier est (Spichiger et *al.*, 2004 in Wald, 2009):

- Clade** : Angiospermes
- Clade** : Dicotylédones vraies
- Clade** : Rosidées
- Ordre** : Myrtales
- Famille** : Lythraceae
- Genre** : Punica
- Espèce**: *Punica granatum*

2.3 Phytochimie de *P. granatum*

La grenade est une source riche de nombreux composés phénoliques, y compris les ellagitannins (punicalagine, punicaline, pédonculagine, acide gallagique, acide ellagique, ellagitannins et gallotannins), anthocyanes (cyanidine, delphinidine et pélargonidine glycosides), flavonoïdes (quercétine, kaempferol et luteoline glycosides) (Chaudhari et al.,

2014; Carballo et al., 2009) et des acides phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide o-coumarique, l'acide p-coumarique, l'acide ferulique, syringique, vanillique, phlorodizine, la rutine (Chaudhari et al., 2014; Gundogdu et Yilmaz, 2012).

La part comestible des fruits de grenade (50%) se compose de 40% d'arilles et de 10% de graines. Les arilles contiennent 85% d'eau, 10% de sucres totaux, principalement le fructose et le glucose et 1,5% de pectine, l'acide organique, comme l'acide ascorbique, l'acide citrique et l'acide malique, et les composés bioactifs comme les phénoliques et les flavonoïdes, principalement les anthocyanes (Viuda-Martos et al., 2010).

Les composés phénoliques identifiés dans les jus de grenade fraîchement préparés étaient l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide férulique, les acides o- et p -coumariques, la catéchine, la phloridzine et la quercétine (Poyrazoglu et al., 2002).

Les arilles contiennent la delphinidine-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, delphinidine-3,5-diglucoside, cyanidine-3,5-diglucoside, pélargonidine-3,5-Le diglucoside et le pélargonidine-3-glucoside, le delphinidine-3,5-diglucoside étant l'anthocyanine principale du jus de grenade (Syed et al., 2006).

12 à 20% du poids total de graines de grenade comprend de l'huile de graines et possède plus de 70% d'acides linoléiques conjugués. Le composant acide gras de l'huile de graine de grenade comprend plus de 95% de l'huile, dont 99% sont des triacylglycérols. Les composants mineurs de l'huile comprennent les stérols, les stéroïdes et un composant clé des gaines de myéline de mammifères, le cérébroside (Sreekumar, 2014).

L'écorce, est une source importante de composés bioactifs tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les ellagitanins et les composés proanthocyanidiniques, les minéraux, principalement le potassium, l'azote, le calcium, le phosphore, le magnésium et le sodium; polysaccharides complexes (Viladomiu et al., 2013).

Les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés sont les principaux polyphénols de la grenade. Les anthocyanes, qui confèrent une couleur rouge aux arilles, sont les plus abondantes et responsables des bienfaits potentiels pour la santé. Plus de 18 tanins hydrolysables ont été signalés dans les feuilles, l'écorce et les fruits, parmi lesquels les gallotannins, ellagitannins, punicalgin et punicalin qui sont les antioxydants les plus puissants de la grenade. D'autres composés phytochimiques rapportés dans la grenade comprennent la

catéchine et les procyanidines, les acides organiques, les acides phénoliques, les stérols, les terpénoïdes, les acides gras, les triglycérides, les alcaloïdes et certains autres composés (Sharma et Maity, 2010).

Les fleurs contiennent également différents composés dont les plus abondants sont les polyphénols (l'acide gallique et l'acide éllagique) des triterpènes (acide oléanolique, l'acide ursolique, maslinique et asiatique), aussi un seul stérol (daucostérol) et un seul flavonoïde (punicaflavone), ces composés ont montré une importante valeur médicinale et biologique importante (Eren et *al.*, 2014).

2.4 Activités thérapeutiques de *P. granatum*

Le fruit de grenade présente de fortes propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-obésité et antitumorales, menant ainsi à une popularité accrue en tant qu'aliment fonctionnel et source nutraceutique depuis l'Antiquité. Il peut être divisé en trois parties: les graines, l'écorce et le jus, qui semblent tous avoir des vertus médicinales. De nombreux effets bénéfiques sont liés à la présence d'acide ellagique, d'ellagitanins (y compris les punicalagines), d'acide punique et d'autres acides gras, de flavonoïdes, d'anthocyanidines, d'anthocyanes, de flavonols œstrogéniques et de flavones, qui semblent être ses composants thérapeutiques les plus bénéfiques (Viladomiu et *al.*, 2013)

Plusieurs tanins, flavonoïdes, anthocyanidines avec diverses activités pharmacologiques et biologiques, Anti-inflammatoire (Chia-Jung et *al.*, 2010), anti-diarrhée, antitumorale (Khan et *al.*, 2007), antihépatotoxicité (Kaur et *al.*, 2006a), anthelminthique, anti-lipoperoxydation (Reddy et *al.*, 2007), anti-ulcère (Ajaikumar et *al.*, 2005), anti-bactérien (Al-Zoreky, 2009), anti-virale (Zhang et *al.*, 1995), antidépresseur (Junko et *al.*, 2004) ont été identifiés dans la grenade.

2.4.1. Activité antioxydante de *P. granatum*

L'extrait de fleur de grenade élimine efficacement les radicaux libres tels que les espèces réactives d'oxygène (ROS), les espèces réactives d'azote (RNS), le superoxyde (O₂-), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les radicaux hydroxyles (-OH) et de l'oxyde nitrique (NO). Ce qui fait de cet extrait un puissant inhibiteur des dommages oxydatifs des biomolécules (Kaur et *al.*, 2006). L'effet protecteur du jus de grenade peut être dû à la fois à une augmentation de l'activité du système de défense antioxydant et à une inhibition de la peroxydation lipidique et de la production d'oxyde nitrique (Al-Olaya et *al.*, 2014).

L'activité antioxydante de la grenade provient principalement des groupements hydroxyyles des composés phénoliques et des doubles liaisons qui entrent dans la structure des tanins, des flavonoïdes et des acides gras insaturés. Des corrélations linéaires significatives et positives ont été trouvées entre les capacités antioxydantes totales et le contenu phénolique, ce qui indique que les composés phénoliques sont des antioxydants dominants du grenadier (Surveswaran et *al.*, 2007, Wang et *al.*, 2010).

2.4.2 Activité anti-inflammatoire de *P. granatum*

Schubert et *al.*, (1999) ont montré que le jus fermenté et les flavonoïdes de l'huile de graine de grenade pressée à froid inhibaient *in vitro* les enzymes de la cyclooxygénase et de la lipoxycgénase et ont montré une forte activité antioxydante. De plus, des études suggèrent que les composés biodisponibles dérivés des extraits de grenades peuvent exercer un effet anti-inflammatoire en inhibant la production de PGE2 et de NO induite par les cytokines inflammatoires *in vivo* (Shukla et *al.*, 2008).

L'acide punique se trouve principalement dans les graines de grenades. il exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant l'amorçage induit par le TNF- α de la NADPH oxydase et la libération de myéloperoxydase. Ainsi, il pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique alternative dans les maladies inflammatoires (Aruna et *al.*, 2015)

De Nigiris et *al.*, (2007) ont montré qu'une supplémentation quotidienne en extraits de grenades (jus et écorce) diminue significativement l'expression des marqueurs inflammatoires vasculaires, la trombospondine et la cytokine TGF- β 1 et une augmentation significative de l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) chez un model de syndrome métabolique.

Les composants anti-inflammatoires de l'extrait d'écorce de grenade, à savoir la punicalagine, la punicaline, la strictinine A et la granuline B réduisent significativement la production d'oxyde nitrique et de PGE2 en inhibant l'expression des protéines pro-inflammatoires. Ce qui fait d'eux une mesure de traitement très efficace contre les troubles inflammatoires (Ismail et *al.*, 2012).

2.4.3 Activité anti-carcinogène

Les grenades sont une source extrêmement riche en plusieurs flavonoïdes polyphénoliques complexes tels que les anthocyanes, les tanins hydrolysables tels que la punicaline et l'acide ellagique ainsi que les acides gras tels que l'acide punique. Il a été

démontré que ces composés ont des effets antitumoraux puissants prometteurs en raison de leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et inductrices d'apoptose (Bishayee et Darvesh, 2012).

Malik et Mukhtar, (2006) ont démontré que l'extrait de fruit de grenade a entraîné une inhibition de la croissance cellulaire suivie d'une apoptose de cellules PC3 de carcinome prostatique humain hautement agressif.

Malik et *al.*, (2005) suggèrent que le jus de grenade peut avoir des effets chimioprévention ainsi que des effets chimiothérapeutiques contre le cancer de la prostate chez l'homme.

La grenade évoque des effets antiprolifératifs, anti-invasifs et antimétastatiques, induit l'apoptose par la modulation des protéines Bcl-2, régule à la hausse p21 et p27 et à la baisse du réseau cycline-cdk. En outre, la grenade bloque l'activation des voies inflammatoires, y compris, mais sans s'y limiter, la voie NF-KB. La plus forte preuve de son activité anticancéreuse provient d'études sur le cancer de la prostate (Turrini et *al.*, 2015).

La grenade a indiqué des effets antiprolifératifs, anti-métastatiques et anti-invasifs sur différentes lignées de cellules cancéreuses *in vitro*, *in vivo* et essai clinique. Toutes les parties de la grenade telles que la peau, le jus et l'huile ont montré des activités anticancéreuses comprenant une interférence avec la prolifération des cellules tumorales, le cycle cellulaire et l'angiogenèse (Bassiri-Jahromi et *al.*, 2018).

2.5 Toxicité et risque d'interaction

Du point de vue toxicologique, le jus de fruit, les extraits et les préparations de grenade ont prouvé leur innocuité (Ismail et *al.*, 2012). L'administration orale répétée de fortes teneurs de ellagitannin et de punicalagin de dérivées de grenade à des rats pendant 37 jours est non toxique (Cedra et *al.*, 2007).

En effet, Vidal et *al.*, (2003) ont montré que l'extrait de fruit entier n'a produit aucun effet toxique en termes d'apport alimentaire, de prise de poids, de paramètres comportementaux, biochimiques et histopathologiques. La DL50 de l'extrait du fruit entier, déterminée chez des souris OF-1 des deux sexes après administration intrapéritonéale, était de 731 mg / kg.

La dose sans effet nocif observé (NOAEL) pour l'huile de graine de grenade était de 50 000 ppm (= 4,3 g / kg de poids corporel / jour). Ainsi, aucune mutagénicité d'huile de graine de grenade n'a été observée avec le test d'Ames et le test d'aberration chromosomique (Meerts et *al.*, 2009).

Dans une étude de la toxicité aiguë et subchronique d'un extrait de fruit de grenade standardisé contenant 30% de punicalagines, la dose sans effet nocif observé (NOAEL) pour cet extrait a été déterminée à 600 mg / kg de poids corporel / jour (Patel et *al.*, 2008).

Hidaka et *al.*, (2005) ont étudié l'interaction entre le jus de grenade et la pharmacocinétique d'un carbamazépine (substrat de CYP3A). Le jus de grenade altère la fonction du CYP3A ce qui inhibe le métabolisme de la carbamazépine à médiation par le CYP3A humain et modifie la pharmacocinétique de ce dernier chez le rat.

Nagata et *al.* ., (2007) ont découvert que le jus de grenade inhibait l'activité du CYP2C9 humain et augmentait en outre la biodisponibilité du tolbutamide (substrat de CYP2C9) chez le rat. Le jus et l'extrait de grenade n'ont eu aucun effet sur l'activité du CYP2C9 chez les sujets humains et peuvent être consommés par les patients prenant des médicaments substrats du CYP2C9 avec un risque négligeable d'interaction pharmacocinétique (Hanley et *al.* ., 2012).

PARTIE II

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre 1

Matériels et Méthodes

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal choisis " *Punica granatum* "

15 kg de fruit de la variété *Sefri* de *Punica granatum* ont été récoltés durant le mois d'octobre 2014 dans un verger local "Verger de M^r Benaboura, Oued Sly" dans la région ouest de Chlef (36 ° 06'04 "N, 1 ° 11'58" E, 90 m, Algérie). L'identification botanique a été faite au niveau du laboratoire de botanique à l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques (Alger) où un spécimen a été déposé. L'espèce existe au niveau du Paquet :N° 35 de l'herbier Afrique du nord. La variété *Sefri* est un gros fruit jaune qui peut atteindre les 500g est caractérisée par des graines demi-tendres roses claires, très juteuses et sucrées à maturités début d'octobre (Figure 5,6).

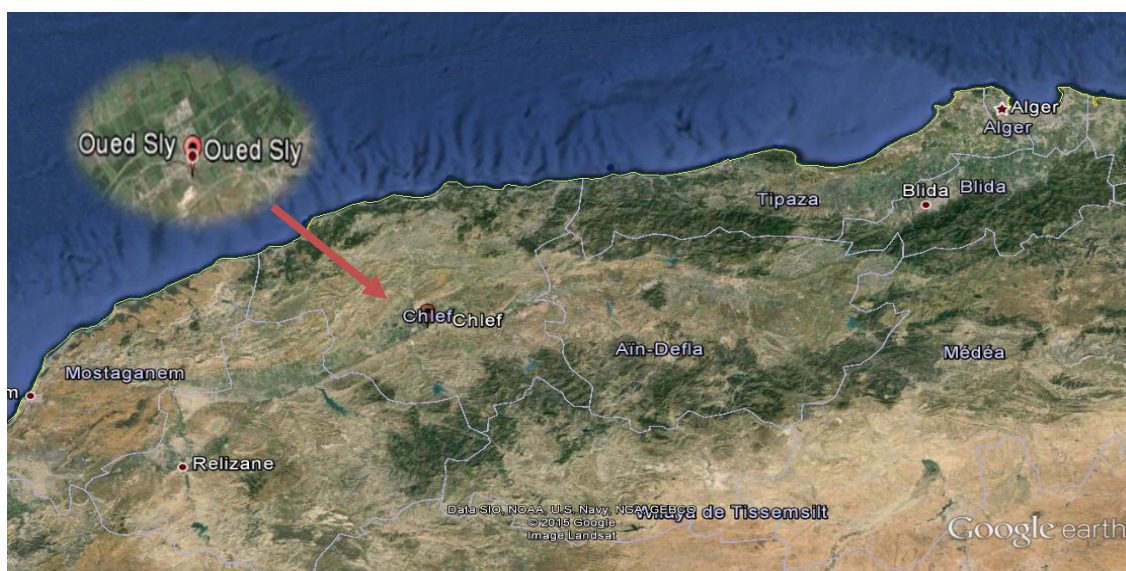


Figure 5: Carte géographique où l'échantillonnage a été effectué (Google earth,2018)



Figure 6: Aspect morphologique de la variété *Sefri* du grenadier

1.2 Préparation des extraits

1.2.1 Préparation du jus de *Punica granatum*

La partie comestible de la grenade (Arilles) a été pressée à l'aide d'un robot culinaire après avoir enlevé les graines. Le jus obtenu a été centrifugé à 10 000 tr / min à 4°C pendant 10 min. Le surnageant a été dilué avec de l'eau distillé v:v (Fuster-Muñoz et al., 2016) et est stocké à - 40 °C.

1.2.2 Préparation des extraits d'écorce de *Punica granatum*

Le fruit de *Punica granatum* a été lavé avec de l'eau de robinet, les écorces ont été séchées à l'ombre pendant un (01) mois, à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante. Après séchage, les écorces ont été broyées, la poudre obtenue a été conservée dans des récipients hermétiquement fermés jusqu'à leur extraction.

La méthode d'extraction que nous avons employée est la macération successive par trois solvants de polarité croissante : éther de pétrole, chloroforme et le méthanol (Diallo et al, 2004).

200 g de poudre sèche de l'écorce est d'abord macérée dans 2 litres d'éther de pétrole pendant 24 heures, le mélange est filtré par un papier Whatman (N1). Le marc a été repris avec deux litres de chloroforme; puis avec deux litres de méthanol. Les filtrats obtenus de chaque solvant sont ensuite évaporés à sec en utilisant un évaporateur rotatif à 30°C. L'extraction a été répétée trois fois avec chaque solvant dans le but d'augmenter le rendement (Figure 7).

Les extraits obtenus sont ensuite stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Cette étude porte sur l'extrait méthanolique car le rendement était plus important.

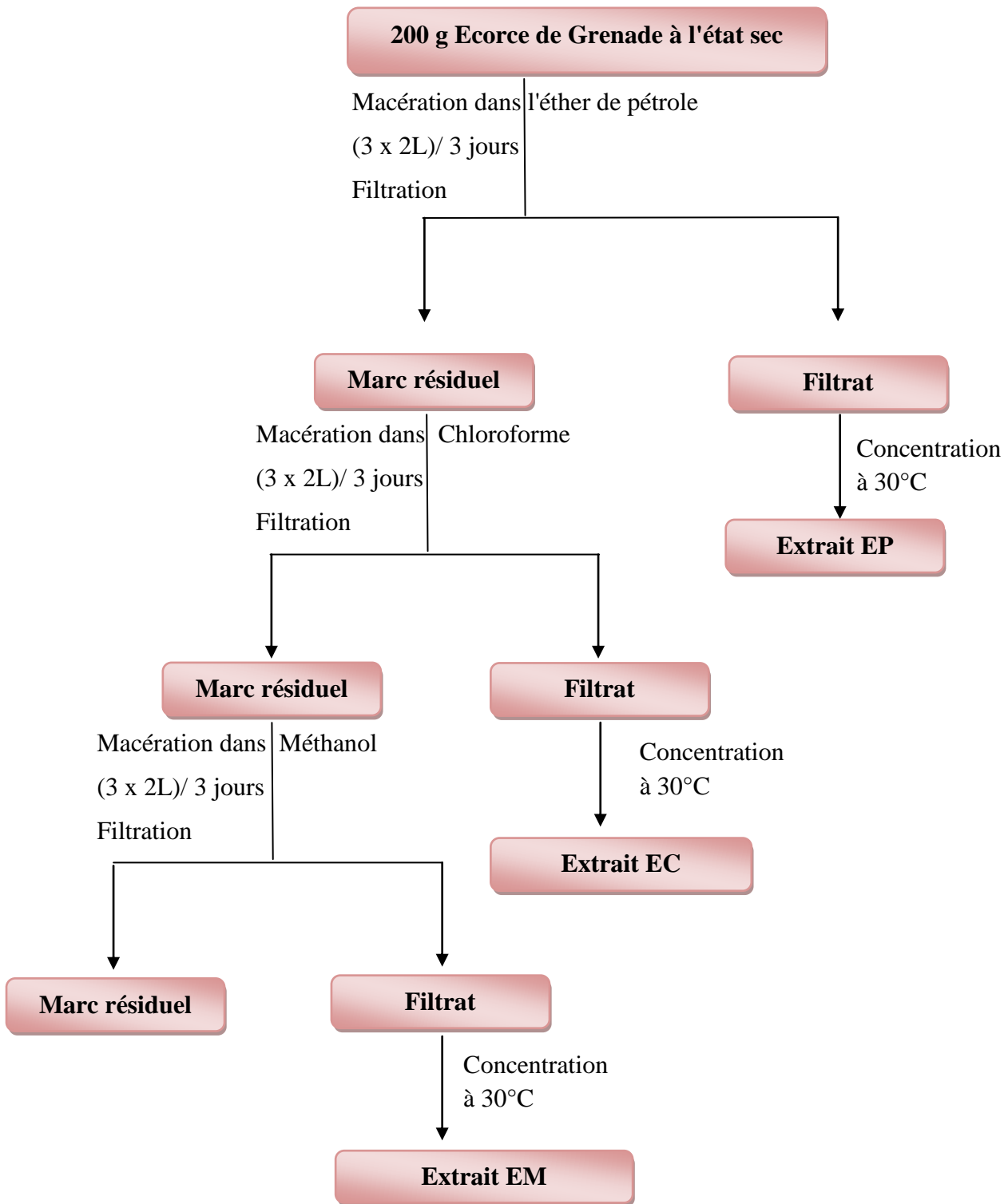


Figure 7: Schéma d'extraction à partir d'écorce de *Punica granatum* par la macération successive par trois solvants de polarité croissante (Diallo *et al*, 2004).

1.3 Criblage phytochimique

Des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer les classes phytochimiques contenues dans l'écorce (extrait éther de pétrole EP, extrait chloroforme EC, extrait méthanol EM) et le jus de fruit J. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

1.3.1 Tanins

Les tanins ont été caractérisés par le chlorure de fer. A 2 ml (extrait éther de pétrole EP, extrait chloroforme EC, extrait méthanol EM et le jus de fruit J) ont été ajoutées quelques gouttes d'une solution aqueuse de chlorure ferrique 2 %. L'apparition d'une coloration noirâtre indique la présence des tanins galliques. La couleur verdâtre est indicateur de présence des tanins catéchiques (Sabri et *al.*, 2012).

1.3.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été caractérisée par la réaction à la cyanidine. L'alcool - chlorhydrique (éthanol à 95%, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume) et quelques copeaux de magnésium ont été ajouté à 2ml (extrait éther de pétrole EP, extrait chloroforme EC, extrait méthanol EM et le jus de fruit J) et un 1 ml d'alcool isoamylique (Obouayeba et *al.*, 2015). L'apparition d'une coloration: rose orangée (flavones), rose violacé (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblé dans la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavonoïque, négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones (Diarra, 2003)

1.3.3 Anthocyanine

La présence des anthocyanes a été démontrée en mélangeant 2 ml (extrait éther de pétrole EP, extrait chloroforme EC, extrait méthanol EM et le jus de fruit J) avec 2 ml HCl 2N. l'apparition d'une couleur rose rouge qui vire vert un bleu-violet après adition de l'ammoniaque indique la présence des anthocyanes (Obouayeba et *al.*, 2015).

1.3.4 Alcaloïdes

La recherche des alcaloïdes est basée sur des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux des alcaloïdes: le réactif de Mayer et le réactif de Wagner (Annexe1). 10 ml de chaque extrait a été évaporé à sec et le résidu sec obtenu a été ajouté à 1,5 ml de

solution d'acide chlorhydrique (2%). Le test a été réalisé en premier avec 5 gouttes de réactif de Mayer et après avec 5 gouttes de réactif de Wagner.

Test Mayer: La formation d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes après traitement par quelques gouttes du réactif de Mayer.

Test Wagner: L'addition de quelques gouttes du réactif de Wagner se traduit pas l'apparition d'un précipité marron orangé qui révèle de présence des alcaloïdes (Sabri et *al.*, 2012).

1.3.5 Saponines

La présence des saponines est déterminée qualitativement par l'apparition, après agitation, d'une mousse persistante pour plus de 15 min.

Test de mousse: 5 ml de chaque échantillon ont été agité pendant 15 minutes. la formation d'une mousse stable est indicateur de présence des saponines. Une mousse supérieure à 10 mm (Obouayeba et *al.*, 2015).

1.4 Chromatographie sur couches minces (CCM).

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est en fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile (Braithwaite et Smith, 1999).

1 ml de jus a été dilué dans 1 ml d'eau distillée par contre les extraits : extrait éther de pétrole EP, extrait chloroforme EC, extrait méthanol EM ont été respectivement dissous dans 1ml d'éther de pétrole, 1ml de chloroforme, et 1ml de méthanol. À l'aide d'une micropipette, nous avons déposé une goutte de chaque solution sur une ligne (1cm) préalablement tracée sur la plaque de silice; les plaques sont des plaques en verre de silicagel de type 60 F254 (Merk , USA). Ces plaques sont ensuite placées dans des cuves conventionnelles en verre, remplis à environ 0.5 cm avec une phase mobile (10ml), dans notre cas, les systèmes de solvants utilisés sont les suivants :

➤ **Les extraits apolaires éther de pétrole EP et chloroforme EC:**

chloroforme : (1)

chloroforme : méthanol : (8:2)

➤ **Les extraits polaires méthanol EM et le jus de fruit J:**

chloroforme: méthanol: eau distillée:

(8: 1,8 : 0.2)

butanol : acide acétique : eau distillée :

(6: 2,5 : 1,5)

butanol : acide acétique : eau distillée :

(4 : 3 : 3)

Nous avons réalisé deux plaques pour chaque système de séparation. Après une migration qui a duré 2h; les plaques sont pulvérisées par les réactifs suivants ;

➤ Réactif à la vanilline sulfurique (Annexe 1)

➤ Réactif de Dragendorff (Annexe 1)

Après pulvérisation, les plaques sont séchées à 60°C pendant 5 minutes à fin de révéler les spots issus de la séparation (Diallo et *al.*, 2004).

1.5 Analyse quantitative

1.5.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum* a été déterminé selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce test repose sur le transfère des électrons à partir des composés phénoliques sur le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Les composés phénoliques sont énergétiquement oxydés dans un milieu basique, entraînant la formation du radical anion superoxyde (O₂⁻). Le radical O₂⁻ réagit avec le molybdate pour former un mélange d'oxydes bleus (tungstène W₈O₂₃ et molybdène Mo₈O₂₃) détectables par spectrophotométrie à 750-765 nm (Janeth et *al.*, 2018).

250 µl de réactif phénol de Folin Ciocalteu, 50 µl de jus de grenade et 500 µl de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 20% ont été mélangés. Après un passage au vortex; la solution est ajustée par 5 ml d'eau distillée. Après 30 min d'incubation l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux présente est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-1mg/ml). Les mêmes étapes ont été effectuées

pour l'extrait méthanolique. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique/ g de matière sèche (mg EAG/ g de matière sèche) et en mg d'équivalent d'acide gallique par litre de jus (mg EAG/l de jus) (Raafat et Samy 2014).

1.5.2 Dosage des Flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes dans les jus et dans l'extrait méthanolique issu d'écorce de *Punica granatum* a été déterminée en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant la absorbance maximale à 430 nm. Chaque échantillon (1 ml) a été mélangé séparément avec 1 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2%. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'ombre, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 µg/ml) et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg d'équivalent en quercétine par litre de jus (mg EQ/l de jus) et par g de matière sèche (mg EQ/g de matière sèche) (Hmid et *al.*, 2013).

1.5.3 Dosage des Tanins totaux

La teneur totale en tanins a été déterminée par la méthodes de Polshettiwar et *al.*, (2007). 100 µl d'échantillon, 7.5 ml d'eau distillée, 0.5 ml de réactif de Folin-Denis et 1 ml de solution de Na₂CO₃ (35%) ont été mélangés et complétés jusqu'à 10 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée à 760 nm après 30 minutes d'incubation. Les concentrations des tanins sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la l'acide tannique (0-0.1mg/ml) et la teneur en tanins a été exprimée en mg d'équivalent en acide tannique par litre de jus (mg ET/l de jus) et par g de matière sèche (mg ET/ g de matière sèche) (Padma et *al.*, 2013).

1.5.4 Dosage des Tanins condensés (Méthode de la vanilline)

Le dosage des tanins condensés par le test de la vanilline a été effectué selon la méthode de Julkunen-Titto, (1985). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydrique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm. Brièvement, 50µl du jus de grenade a été mixé avec 1.5 ml de la vanilline à 4 % (préparée dans le méthanol) après 750 µl d'HCL concentré a été ajouté au mélange. La solution a été secouée vigoureusement et incubée à température ambiante pendant 20 minutes dans l'obscurité. La concentration des tanins

condensés (proanthocyanidins) est déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0-0.4mg/ml) et sont exprimées en milligramme d'équivalent catéchine par g de matière sèche (mg ECat/g de matière sèche) et par l de jus (mg ECat/l de jus) (Julkunen-Titto, 1985).

1.6 Analyse par HPLC-DAD

Le jus a été analysé par la chromatographie liquide à haute performance HPLC afin de d'obtenir une information sur sa composition. Le système utilisé est un appareil HPLC de marque AGILENT série 1100 avec:

- Une pompe quaternaire, dégazeur on-line et injecteur automatique.
- Détecteur a barrette de diodes (DAD) avec plusieurs longueurs d'ondes : 220nm, 254nm, 280nm, 300nm et 365nm choisis en fonction des absorbances maximales des molécules recherchées.
- La phase stationnaire utilisée est une colonne (Hypersil BDS-C18, 5µm, 250X4.6 mm) a une température de 30°C.
- La phase mobile est constituée de deux solvants, le premier est l'eau acidifiée par l'acide acétique (0.2%) a pH=3.1 (solvant A) et le deuxième est l'acétonitrile (solvant B); les deux solvants sont utilisés en gradient d'élution linéaire pendant 30 minutes a 1ml/min, en commençant par 95% de solvant A et en terminant par 100 % de solvant B. Le volume injecté est de 20µl.

Les différents constituants de l'extrait à analyser sont identifiés en comparant les temps de rétentions des composés à identifier avec des standard qui ont été analysés dans les mêmes conditions opératoires. Les standards utilisés sont : Acide gallique, acide caféique, vanilline, acide isovanillique, acide ferulique, acide syringique, acide o-anisique, acide 3-hydroxy-4-methoxycinnamique, acide m-anisique, acide trans-cinnamique, rutine, prunine, luteoline, quercetine, apigenine, isorhamnetine, hesperidine, acide tannique.

2. Etude *in vivo*

Des souris albinos de souche *Swiss* pesant 18.64 ± 2.68 g et âgées de 4 semaines ont été obtenues de l'institut Pasteur d'Alger et élevées à l'animalerie de l'université de Mostaganem. Elles ont été maintenues à 24 ± 5 °C avec un cycle lumière / obscurité de 12h et avec un accès libre à la nourriture et à l'eau potable. Les souris ont été acclimatées quelques jours avant l'expérimentation.

2.1 Intoxication et traitement

Notre étude porte sur deux métaux l'aluminium et le plomb. Un effectif de 49 souris a été réparti en groupe de 7 souris:

➤ Cas du Plomb

1. Groupe témoin (T): souris recevant de l'eau potable pendant 90 jours
2. Groupe intoxiqué par le plomb (Pb): une dose de 1000 ppm d'acétate de plomb a été administrée aux souris par voie orale pendant 12 semaines (Djebli et *al.*, 2005).
3. Groupe intoxiqué par le plomb (Pb) et traité par le jus de *Punica granatum* (Pb-J): Les souris ont reçu un traitement avec du jus de grenade dilué avec de l'eau distillée (v / v) fournie dans des bouteilles d'eau sombre (renouvelée toutes les 1 heure) pendant 4 h / jour suivie d'acétate de plomb à une dose de 1000 ppm par voie orale pendant 20 h / J pendant 90 jours (Djebli et *al.*, 2005).
- 4- Groupe intoxiqué par le plomb (Pb) et traité par l'extrait méthanolique de *Punica granatum* (Pb-E): Les souris ont reçu un traitement de 500 mg/kg de l'extrait methanolique fournie dans des bouteilles d'eau sombre (renouvelée toutes les 1 heure) pendant 4 h / jour suivie d'acétate de plomb à une dose de 1000 ppm par voie orale pendant 20 h / J pendant 90 jours (Djebli et *al.*, 2005).

➤ Cas de l'aluminium

1. Groupe témoin (T): Souris recevant de l'eau potable pendant 90 jours
2. Groupe intoxiqué par l'aluminium (Al): L'intoxication par l'aluminium a été provoquée par l'administration d'AlCl₃ à 500 mg / kg par voie orale (Gong et *al.*, 2005) pendant 12 semaines.
- 3- Groupe intoxiqué par l'aluminium (Al) et traité par le jus de *Punica granatum* (Al-J): les souris ont reçu un traitement avec du jus de grenade dilué avec de l'eau distillée (v: v) fournie dans des bouteilles d'eau sombre (renouvelée toutes les 1 heure) pendant 4 h / jour suivie de

Matériels et Méthodes

chlorure d'aluminium à une dose de 500 mg / kg par voie orale pendant 20 h / J pendant 90 jours.

4- Groupe intoxiqué par l'aluminium (Al) et traité par l'extrait méthanolique de *Punica granatum* (Al-E): Les souris ont reçu un traitement avec 500mg/kg de l'extrait méthanolique fournie dans des bouteilles d'eau sombre (renouvelée toute les 1 heure) pendant 4 h / jour suivie de chlorure d'aluminium à une dose de 500 mg / kg par voie orale pendant 20 h / J pendant 90 jours.

La prise du poids et la consommation de la boisson sont mesurées chaque semaine pendant 90 jours

2.2 Paramètres neurologiques étudiés

2.2.1 Tests de comportement

2.2.1.1 Test de l'activité locomotrice

Le test d'activité locomotrice est effectué pour mesurer la fonction motrice des souris qui ont tendance à explorer un espace clos. Le dispositif (une cage) contient une plate-forme (32 x32 cm) divisée en 16 carrés égaux. Chaque souris est placée individuellement au centre de cette plateforme et laissée libre de bouger pendant 5 min d'exploration (Sáenz et *al.*, 2006). Le nombre de carrés visités a été enregistré pour chaque souris pendant 5 min. Le test est réalisé en 4 phases chacune dure 5 minutes (Figure 8).



Figure 8: Test de l'activité locomotrice

2.2.1.2 Test de la nage forcée

Le test de la nage forcée ou test de Porsolt, est fréquemment utilisé pour examiner le comportement dépressif (Porsolt et *al.*, 1977). Il consiste à maintenir la souris dans un bain tiède de 21°C et d'une hauteur de 16 cm à fin que la souris ne touche pas le fond et ne se sert pas de ses membres inférieurs pour se tenir à la surface; la souris nage pour maintenir sa tête

hors de l'eau puis elle s'immobilise par désespoir. Les souris ont été observées pendant 5 min et le temps d'immobilité a été enregistré (Figure 9)



Figure 9: Test de porsolt

2.2.1.3 Test de compartiment noir et blanc (test d'anxiété)

Ce test a été développé par Crawley et Goodwin, (1980), et fournit un autre moyen d'examiner le comportement anxieux chez les rongeurs. L'animal est exposé à un nouvel environnement non protégé "compartiment de lumière" avec une zone protégée "compartiment foncé". Le conflit inhérent entre la tendance à explorer et l'évitement des risques inhibe l'exploration (Kathleen et *al.*, 2009; Crawley et Goodwin, 1980; Blumstein et Crawley, 1981; Crawley, 1981). La plupart des souris démontrent naturellement une préférence pour le compartiment sombre et protégé. Le test de lumière / obscurité peut être utile pour prédire l'activité anxiolytique ou anxiogène d'un médicament chez souris (Bourin et Hascoet, 2003). Imaizumi et *al.*, 1994 ont constaté que les anxiolytiques augmentent les déplacements et le temps passé dans la zone illuminée au contraire des anxiogènes qui les diminuent.

Le dispositif est divisé en deux compartiments (50 x 40 x 20 centimètres), l'un d'eux est obscur l'autre étant clair communiquant par une ouverture (7 x 10 centimètres) jouant le rôle d'une porte ce qui permet à l'animal de se déplacer librement. La souris est placée dans le compartiment clair et ses activités comportementales est enregistrée pendant 5 min. Ce test est réalisé en 20 minutes réparties en quatre phase (Figure 10).



Figure 10: Test d'anxiété (Test de compartiment noir et blanc)

2.2.1.4 Test de labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé est un test comportemental largement utilisé chez les rongeurs. Il a été validé pour évaluer l'effet anxiolytique des agents pharmacologiques et des hormones stéroïdiens, et pour définir les régions du cerveau et les mécanismes sous-jacents au comportement anxieux (Walf et Fry, 2007).

Le labyrinthe en croix surélevé (EPM) est un appareil composé de deux bras; un environnement protégé, sombre et fermé, et un environnement lumineux, ouvert et élevé, non protégé, relié par une plate-forme centrale permettant un libre accès aux deux bras. Le niveau d'anxiété repose sur le comportement naturel d'anxiété des rongeurs à rester dans l'ombre, à proximité des murs et à éviter les hauteurs (Albrechet-Souza et al., 2005). L'activité accrue dans les bras ouverts était indicative d'une diminution d'anxiété (Hogg, 1996).

Le dispositif est constitué d'un labyrinthe en croix comportant deux bras opposés qui sont ouverts (50 cm de longueur, 10 cm de largeur et une bordure de 1.5 cm de hauteur) et de deux bras opposés de même longueur et largeur qui sont dit "fermés" car bordés de cloisons de 40 cm. Ces 4 bras sont reliés par une plate-forme centrale carrée (10 cm de côté) à 73 cm au-dessus du sol. Les souris ont été placées individuellement au centre du labyrinthe qui est élevé à 50 cm au-dessus du sol, face à l'un des bras ouverts. Le temps passé dans les bras ouverts a été enregistré pendant 5 min. Ce test est effectué en quatre phases (Figure 11).



Figure 11: Test d'anxiété (Test de labyrinthe en croix surélevé)

2.2.1.5 Test de curiosité

Le comportement exploratoire des souris dans un environnement nouveau a été mesuré à l'aide d'un test à trous (Boissier et Simon, 1962). Cette méthode est utilisée pour mesurer la réponse des souris à un environnement peu familier.

Le dispositif est une plaque en bois de 50 centimètres au-dessus de la terre, contenant 16 trous d'inspection. Chaque trou a un diamètre de 2 cm espacés de 5 cm. La capacité exploratrice reflète l'état d'esprit de la souris. On la mesure en comptant le nombre de trous explorés par la souris. Ce test dure 9 minutes effectué en trois phases (Figure 12).



Figure 12: Test de curiosité (Test de trou)

2.2.2 Tests de mémoire

2.2.2.1 Test de la piscine de Morris

Le labyrinthe aquatique de Morris est le test le plus couramment utilisé pour évaluer les fonctions cognitives liées à la mémoire et à l'apprentissage. Lors de ce test, l'animal apprend à nager dans un réservoir d'eau, guidé par des indices externes, et trouve (et grimpe) une plate-forme submergée (Morris et *al.*, 1984).

Mémoire de travail spatiale "plate-forme visible": les souris sont placées dans un bassin d'eau, où elles doivent nager jusqu'à une plate-forme visible. La référence de la mémoire spatiale "plate-forme cachée": Les animaux sont placés dans un bassin d'eau coloré opaque, où ils doivent nager vers une plate-forme d'évasion cachée. Parce qu'ils sont dans l'eau opaque, les animaux ne peuvent pas voir la plate-forme, et ne peuvent pas compter sur l'odeur pour trouver la voie. Au lieu de cela, ils doivent s'appuyer sur des indices externes / extra-labyrinthes. Comme les animaux deviennent plus familiers avec la tâche, ils sont en mesure de trouver la plate-forme plus rapidement. Développé par Richard G. Morris en 1984, ce paradigme est devenu l'un des «standards d'or» de la neuroscience comportementale (Sharma, 2009).

Pour les deux tests, le temps écoulé pour atteindre la plate-forme est enregistré. La durée de l'expérience était de 5 minutes pendant 5 jours pour chaque souris. Une souris normale est capable d'atteindre la plateforme en utilisant le trajet le plus court quelque soit son point de départ (Figure 13).



Figure 13: Test de la piscine de Morris (MST, MSR)

2.2.2.2 Test du labyrinthe à 8 bras.

Le labyrinthe radial à huit bras est conçu pour évaluer simultanément les performances de référence et de mémoire de travail en demandant aux sujets d'utiliser des repères extra-labyrinthes pour localiser les plates-formes d'évasion et remédier aux limites observées dans les modèles de bras radiaux terrestres. La mémoire de travail et de référence sont couramment évaluée en utilisant le labyrinthe à bras radial terrestre (Penley et *al.*, 2013).

2.2.2.2.1 Mémoire spatiale de travail

Ce paradigme nécessite un pré-entraînement, une privation de la nourriture et peut introduire des indices de confusion. En effet, les sujets sont tenus d'éviter les bras précédemment utilisés pour s'échapper pendant chaque journée de test (mémoire de travail). Ré-entrées dans les bras qui ont déjà été utilisés pour échapper au cours d'une session de test indiquent des déficits de mémoire de travail (Penley et *al.*, 2013). Lors de ce test, nous avons comptabilisé le nombre de bras répété pendant une période 5 jours 3 minutes par séance (Figure 14).



Figure 14: Test de mémoire spatiale de travail (Test du labyrinthe à 8 bras)

2.3 Dosage du plomb et de l'aluminium dans le cerveau

Après sacrifice; les cerveaux de chaque lot ont été broyés par dans de l'acide nitrique 5:1 acide perchlorique comme décrit par Gupta et Gill, (2000) pour le dosage des métaux lourds qui a été déterminé par spectrophotomètre absorption atomique 240 Z AA a Four Graphite (GTA 120) et a Correction Zeeman (Agilent 240 ZAA / GTA 120, CRAPC Algérie) basé sur l'atomisation. L'échantillon est placé à l'intérieur d'un tube de graphite puis chauffé de manière résistive pour effectuer la désolvatation de l'échantillon, le calcination ou la carbonisation (pour décomposer l'échantillon et volatiliser une partie de la matrice) et finalement l'atomisation (Holcombe, 2000).

Les étalons ont été préparés avec des solutions mères de 1000 mg/l pour l'Al et le Pb.

Al: La longueur d'onde: 309.3 nm

La fente: 0.5 nm.

Le Courant de lamp: 10.0

Pb: La longueur d'onde: 283.3 nm

La fente: 0.5 nm.

Le Courant de lamp: 10.0

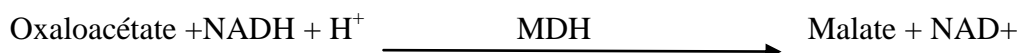
Les données ont été exprimés en tant que mg/l de tissu

2.4 Dosage des transaminases, cholestérol et calcium

Après une étude comportementale; les souris on été sacrifiées et le sang a été recueillis dans des tubes héparines pour l'analyse de quelques marqueurs biochimiques: TGP, TGO (Kit SPINREACT), calcium et cholestérol en utilisant un kit Biomaghreb.

- **Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO)**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi la glutamateoxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique de l'aspartate vers l' α -cétoglutarate avec formation du glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH^+H^+ selon les réactions suivantes:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH^+H^+ , mesurée photo numériquement est proportionnelle à la concentration catalytique de l'AST (Murray, 1984).

Matériels et Méthodes

Le réactif de travail (RT) est préparé en faisant dissoudre un comprimé R2 dans un flacon de R1 (Tableau 1) et mélanger légèrement. Ce dernier est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

100 µl de l'échantillon ont été mélangé à 1 ml de ce réactif. Les lectures au spectrophotomètre ont été faites après 1 minute d'incubation. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

Tableau 1 : Réactifs utilisés pour le dosage AST

Réactif 1	Tris pH 7.8	80 mmol/L
Tampon	L- aspartate	200 mmol/L
Réactif 2	NADH	0.18 mmol/L
Substrat	Lactate déshydrogéné (LDH)	800 U/L
	Malate désydrogéné (MDH)	600 U/L
	α - cétooglutarate	12 mmol/L

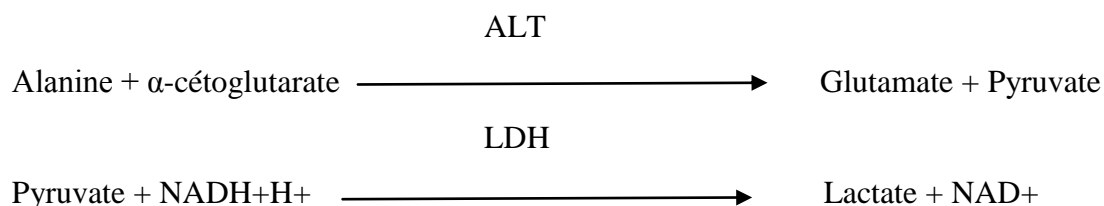
Calculs de la concentration : l'activité catalytique de l'AST est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité de AST (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

ΔA: La moyenne de l'augmentation d'absorbance par minute.

- **Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) :**

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique à d'alanine vers α-cétooglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions suivantes :



La vitesse de réduction de la concentration en $\text{NADH} + \text{H}^+$, mesurée photo numériquement est proportionnelle à la concentration catalytique de l'ALT (Murray, 1984).

100 µl de l'échantillon ont été mélangé à 1 ml de d'un réactif (tampon + substrat) qui a été préparé préalablement (Tableau 2). L'absorbance initiale de l'échantillon (A) est lue après une

Matériels et Méthodes

heure d'incubation à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

Tableau 2: Réactifs utilisés pour le dosage ALT

Réactif 1 Tampon	Tris pH 7.8 L- Alanine	100 mmol/L 1200 mmol/L
Réactif 2 Substrat	NADH Lactate déshydrogénase (LDH) α - cétooglutarate	0.18 mmol/L 500 mmol/L 15 mmol/L

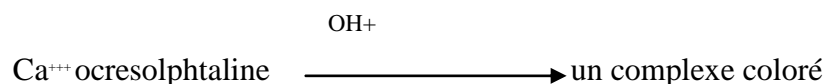
Calculs de la concentration : l'activité catalytique de l'ALAT est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité de ALAT (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 1750$$

ΔA : La moyenne de l'augmentation d'absorbance par minute.

- **Dosage du calcium**

L'analyse de la calcémie est recommandée pour examiner, diagnostiquer et surveiller une gamme de conditions concernant les os, le cœur, les neurones, les reins, et les dents. Le calcium forme avec le complexant crésol phtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium



Un volume du reactif R1 a été mélangé avec un volume de réactif R2 (Tableau 3). Le mélange est stable pendant 4 heures à 20-25°C et 20 heures à 2-8 °C.

Tableau 3: Réactifs utilisés pour le dosage du calcium

Réactif 1 Tampon	Tampon Alcalin 2-Amino-2-methyl 1-Propanol	500 mmol/L
Réactif 2 Solution chromogène	Complexant crésolphtaléine Hydroxy 8 quiniléine	0.62 mmol/L 69 mmol/L
Réactif 3 Standard	Standard calcium	10 mg/dl 100 mg/l 2.5 mmol/l

Trois tubes ont été préparés (blanc, standard, échantillon) (Tableau 4). La lecture de l'absorbance a été faite après 5 minutes d'incubation à 570nm. La couleur est stable pendant 1 heure.

Tableau 4: Mode opératoire de dosage du calcium.

	Blanc	standard	Echantillon
Standard	-	20 µl	-
Echantillon	-		20 µl
Mélange réactif	1ml	1ml	1ml

Calculs de la concentration

DO échantillon / DO Standard x n

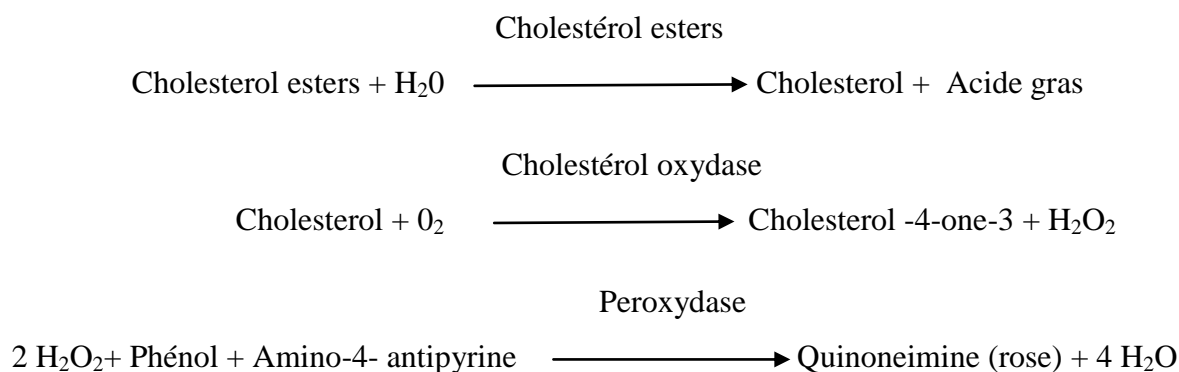
mg/l n= 100

mg/dl n= 10

mmol/l n=2.5

- **Dosage Cholestérol**

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du amino 4 antipyrine en présence du phénol et de peroxydase (Naito, 1984).



Le réactif de travail est préparé en mélangeant légèrement le contenu du flacon R2 avec l'autre flacon R1 (Tableau 5). Ce dernier est stable pendant 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

Matériels et Méthodes

Tableau 5 : Réactifs utilisés pour le dosage du cholestérol

Réactif 1	PIPES pH 6.9	90 mmol/L
Tampon	Phénol	26 mmol/L
Réactif 2	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
Enzymes	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	Amin-4-antipyrine (4-AP)	0,4 mmol/L
Réactif Standard	Cholestérol pur	200 mg/dl 2g/l 5.17 mmol/l

Trois tubes ont été préparés (blanc, étalon, échantillon) (Tableau 6). La lecture de l'absorbance a été faite après 5 minutes d'incubation. La couleur est stable pendant 30 minutes.

Tableau 6: Mode opératoire de dosage du cholestérol

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml
Etalon	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl

Calculs de la concentration

DO échantillon / DO Standard x n

mg/dl n= 200

mg/l n= 2

mmol/l n= 5.17

2.5 Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital militaire d'Oran au niveau de laboratoire d'anatomo-pathologique.

2.5.1 Fixation

La fixation est le processus d'utilisation de méthodes chimiques pour préserver, stabiliser et renforcer un spécimen biologique pour des procédures histologiques ultérieures et une analyse microscopique. Ce processus préserve les cellules et les tissus en renforçant les interactions moléculaires, en désactivant les enzymes protéolytiques endogènes et en détruisant les microorganismes qui pourraient autrement dégrader l'échantillon. Ainsi, la

fixation met fin à toutes les réactions biochimiques en cours en «fixant» les protéines en place, un processus qui tue les cellules qui ne sont pas déjà mortes (Carter et Shieh, 2014).

Il ya un certain nombre de fixateurs en usage, mais le formaldéhyde est le plus couramment utilisés (Black, 2012). Les fixateurs à base d'alcool sont des fixateurs dénaturants. L'action de l'alcool présent dans la solution agit sur la dénaturation des protéines en éliminant l'eau des groupes carboxyle, hydroxyle, amines libres des protéines ce qui entraîne une coagulation des protéines et un rétrécissement des tissus. Les fixateurs contenant du mercure sont peu utilisés dans la pratique courante et on pense qu'ils agissent en se liant aux groupes sulfhydryle et amino dans une réaction additive. Bouin, constitué d'acide picrique, d'acide acétique et de formaldéhyde, il possède à la fois un effet coagulant et réticulant sur les protéines (Howat et Wilson, 2014).

Après sacrifice; Les organes "cerveaux, reins et foies" ont été fixés rapidement dans le formol à 10% (une solution aqueuse d'aldéhyde formique à 10%) dont il doit être au moins 10 fois le volume d'une pièce.

2.5.2 Déshydratation et inclusion

Les agents déshydratants agissent pour éliminer l'eau libre et liée (Rhodes et al., 2013). Beaucoup de réactifs de déshydratation sont hydrophiles («aimant l'eau»), possédant des groupes polaires forts qui interagissent avec les molécules d'eau dans le tissu par liaison hydrogène. D'autres réactifs affectent la déshydratation par une dilution répétée des fluides tissulaires aqueux. Il y a de nombreux agents déshydratants; éthanol, éthanol acétone, méthanol, isopropyle, glycol et alcools dénaturés (Spencer et Bancroft, 2013)

Les échantillons ont été transférés dans des bains d'alcool de plus en plus purs (70°, 80°, 90°, puis l'alcool pur). L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine: il s'agit soit de xylène. Ce dernier élimine l'éthanol.

Une fois déshydratés, dégagés, et infiltrés, le tissu est placé dans de la paraffine fondue à 65°C; la chaleur provoque l'évaporation du solvant (et sa dissolution dans la paraffine): les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. Puis la paraffine est placée dans de petits moules, à température ambiante, ce qui provoque son durcissement et donc la rigidification des fragments tissulaires prélevés. On procède alors au démoulage : on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine qui ont été par la suite mit au congélateur -30°C.

2.5.3 Confection des coupes

Les coupes histologiques sont préparées par un microtomes en forme de "ruban" montées sur une lame pour examen microscopique. Dans ce cas, une série de fines coupes de tissus d'épaisseur requise sont découpées et préparées (Alturkistani et *al.*, 2016). Les sections de 5 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un microtome (Leica). La qualité des coupes dépend des performances de l'appareil: qualité du rasoir, mécanisme permettant de régler l'épaisseur des coupes, précision du mouvement, absence de vibration. Les coupes ainsi obtenues sont collées sur une lame de verre et déparaffinées.

2.5.4 Coloration et montage

La coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) est la coloration histologique la plus utilisée. L'hématoxyline peut être préparée de nombreuses façons et a une applicabilité étendue aux tissus de différents sites. Essentiellement, le composant hématoxyline colore les noyaux des cellules bleues, montrant de bons détails intranucléaires, tandis que l'éosine colore le cytoplasme des cellules et la plupart des tissus conjonctifs dans des nuances et des intensités variables de rose, orange et rouge (Bancroft et Layton, 2013).

Après découpage, les coupes collées sur les lames sont colorés à Hématéine (hématoxyline) et Eosine (Annexe 2). A la fin, on procède à un montage de lamelles sur lames par la colle après une nuit de séchage; la lame est prête pour observation microscopique.

2.6 Etude statistique

Les valeurs représentent la moyenne de 5 expériences. Les différences entre les groupes expérimentaux ont été évaluées par l'analyse de la variance suivie d'un test de *Student*. La différence était considérée comme significative à $P < 0,05$.

Chapitre 2

Résultats et Discussion

PHYTOCHIMIE

1. Etude phytochimique

1.1 Analyse des extraits

1.1.1 Analyse qualitative

Les tests de caractérisation réalisés sur les extraits d'écorce et sur le jus de *Punica granatum* ont donné les résultats reportés dans le tableau 7

L'apparition d'une couleur bleue noirâtre dans le jus de grenade (43%) a indiqué la présence des tanins galliques et la couleur verte dans l'extrait méthanolique d'écorce (31%) a révélé la présence des tanins catéchiques. D'une autre part la coloration rose orangée a montré la présence des flavones dans l'extrait méthanolique d'écorce alors que l'apparition d'un rouge vif dans le jus de fruit a révélé la présence des flavonols et/ou flavanonols. L'ajout du réactif de Mayer et de Wagner s'est traduit par l'apparition d'une turbidité et d'un précipité dans les tubes EM et J avec une intensité plus importante dans le jus de fruit. Ce test préliminaire a révélé la présence des alcaloïdes dans le fruit de *Punica granatum*. L'addition de l'ammoniac au jus et aux extraits de l'écorce acidifiés par l'HCL a permis de détecter les anthocyanes uniquement dans le jus de grenade. Les résultats obtenus après le test de mousse a révèlent la présence des saponosides dans le jus (mousse < 1cm).

Les tests de recherche des flavonoïdes, des anthocyanines, des alcaloïdes et des tanins ont été négatifs sur les extraits: éther pétrole (1%) et chloroforme (2.5%).

Tableau 7: Réaction de caractérisation des extraits: éther de pétrole EP, chloroforme EC, méthanol EM d'écorce et du jus J de fruit de *Punica granatum*.

Extrait	Saponosides	Alcaloïdes	Tanins Cathéchiques (condensés)	Tanins galliques (hydrolysables)	Flavonoïdes	Anthocyanes
J	+	++	-	++	+++	++++
EP	-	-	-	-	-	-
EC	-	-	-	-	-	-
EM	+/-	+	++	-	++	-

++++ : Très abondant ; +++ : abondant ; ++ : moyen ; +/- : réaction louche; - : absence

Résultats et Discussion

Des chromatographies sur couche mince ont été menées sur le jus et les extraits obtenus à partir de l'écorce de grenade pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce.

- **Système Chloroforme (1)**

Dans le système de séparation chloroforme; la plupart des spots observés dans l'extrait éther de pétrole EP sont présents dans l'extrait chloroformique EC. Les chromatogrammes des extraits apolaires révélés par la vanilline sulfurique présentent de nombreuses taches correspondant aux différentes molécules apolaires, qui sont probablement des stérols, des terpénoïdes et des lipides. L'absence de taches après révélation par le réactif de Dragendorff indique l'absence des alcaloïdes dans nos extraits ce qui confirme les résultats obtenus dans les réactions de caractérisation (Figure 15).

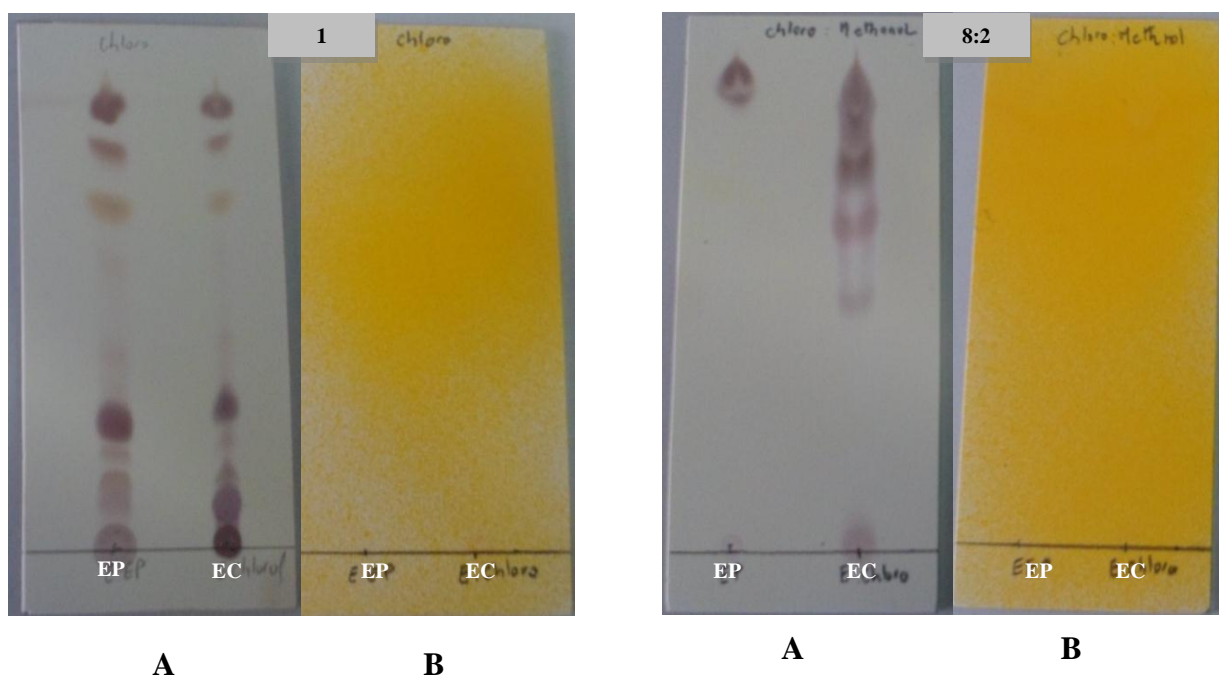


Figure 15. Chromatogrammes des extraits apolaires " éther de pétrole EP et chloroforme EC " obtenus par un système de migration chloroforme (1) et chloroforme : méthanol (8:2) après révélation par A) vanilline sulfurique; B) Réactif de Dragendorff.

- **Système chloroforme : méthanol : eau distillée (8 : 1,8 : 0.2)**

Les résultats obtenus après migration par le système de séparation chloroforme: méthanol : eau distillée (8 : 1,8 : 0.2) montrent que le jus n'a pas migré avec une migration lente pour l'extrait méthanolique d'écorce de grenade car ils contiennent du sucre (Figure 16).

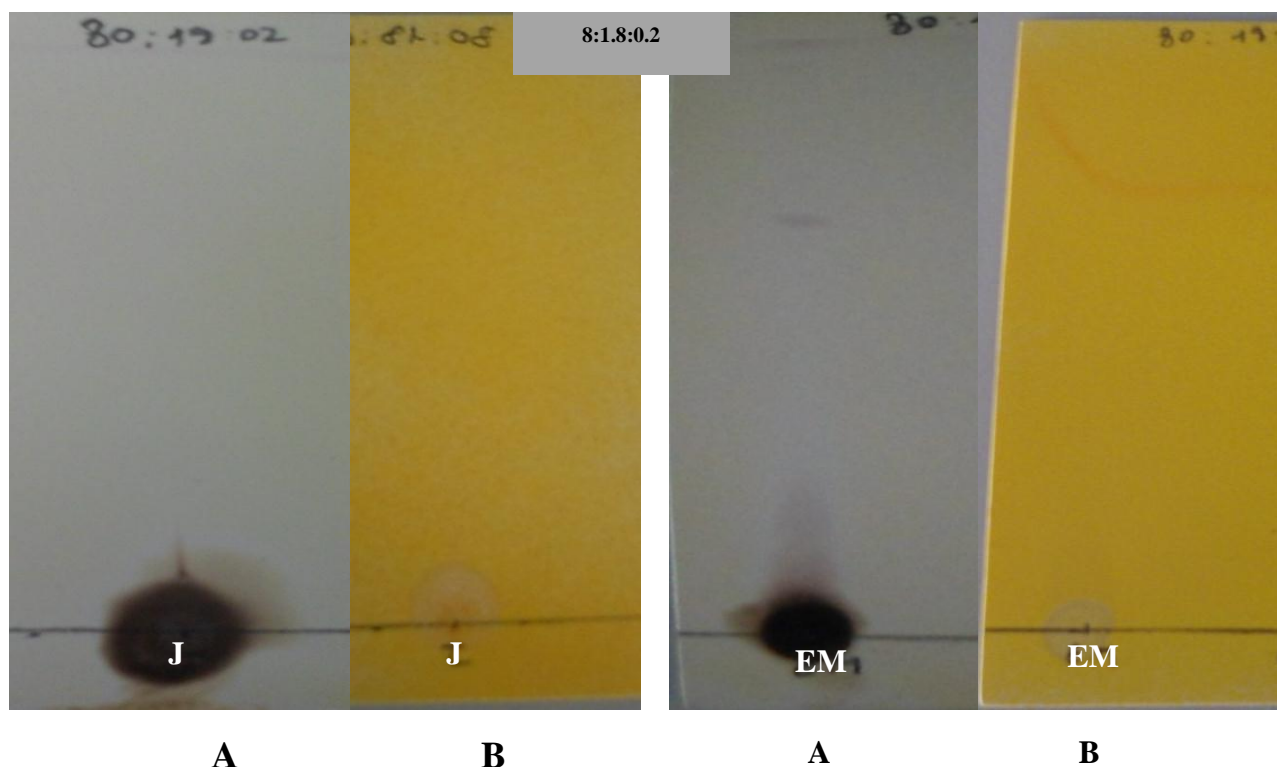


Figure 16. Chromatogramme des extraits polaires jus et extrait méthanolique de la grenade par un système de migration chloroforme : méthanol : eau distillée (8 : 1,8 : 0,2) et après révélation par A) vanilline sulfurique; B) Réactif de Dragendorff.

- **Système butanol : acide acétique ; eau distillée (6: 2,5 : 1,5)**

Le système de migration constitué de butanol : acide acétique ; eau distillée (6: 2,5 : 1,5) a permis d'avoir une assez bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable. Le réactif de Dragendorff a révélé une trainée brune-orangée pour l'EM et des taches oranges pour le jus de fruit ce qui indique la présence des alcaloïdes. Cette constatation approuve les résultats obtenus lors des réactions de caractérisation des alcaloïdes. Pour les chromatogrammes obtenus après révélation par la vanilline sulfurique montrent une composition riche en métabolites secondaires dans le jus et l'écorce avec dépôt de sucre dans la ligne de départ pour les deux spots (Figure 17).

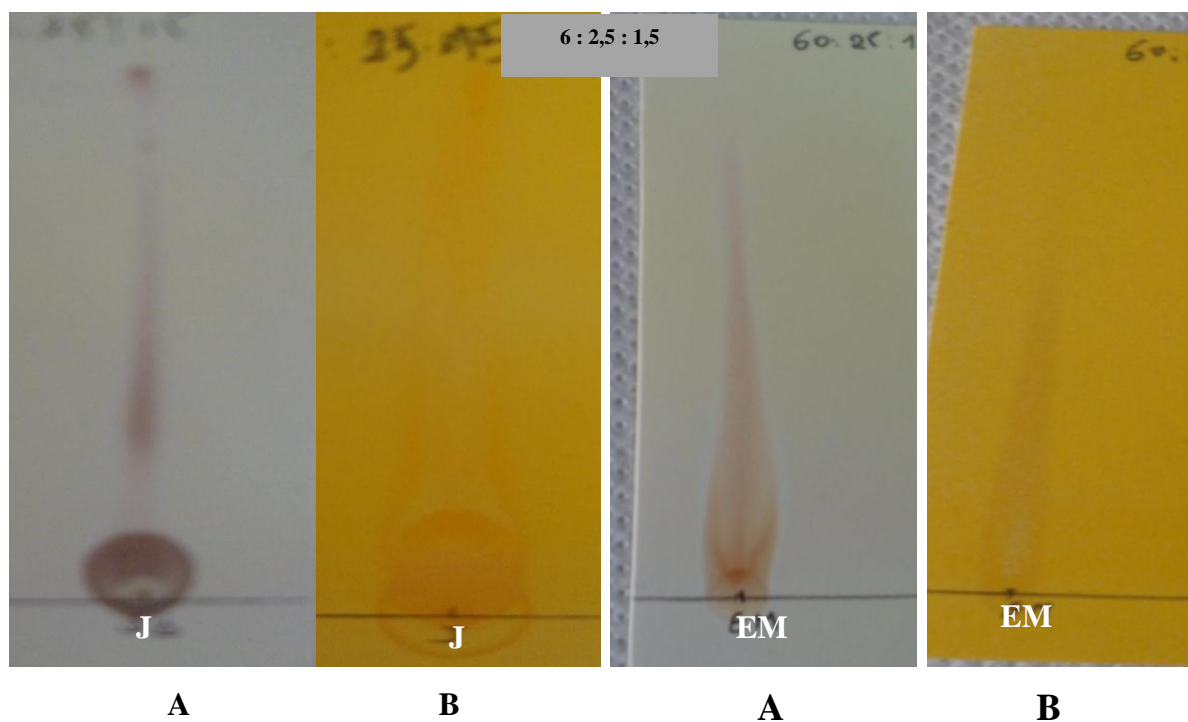


Figure 17. Chromatogramme des extraits polaires méthanol EMeoh et le jus J grenade par un système de migration butanol : acide acétique ; eau distillée (6 : 2,5 : 1,5) et après révélation par A) vanilline sulfurique; B) Réactif de Dragendorff.

- **Système butanol : acide acétique : eau distillée (4 : 3 : 3)**

Le système de séparation butanol : acide acétique : eau distillée (4 : 3 : 3) et après révélation à vanilline sulfurique et au réactif de Dragendorff est inadéquat car il a donné des taches diffuses avec une faible trainée (Figure 18). Après plusieurs lavages de l'extrait et du jus avec le butanol dans le but d'éliminer les sucres; le système 8:1.2:0.2 montre un mélange complexe inclus dans une trainée de la phase butanol des deux extraits alors que la phase aqueuse contient du sucre (Figure 19).

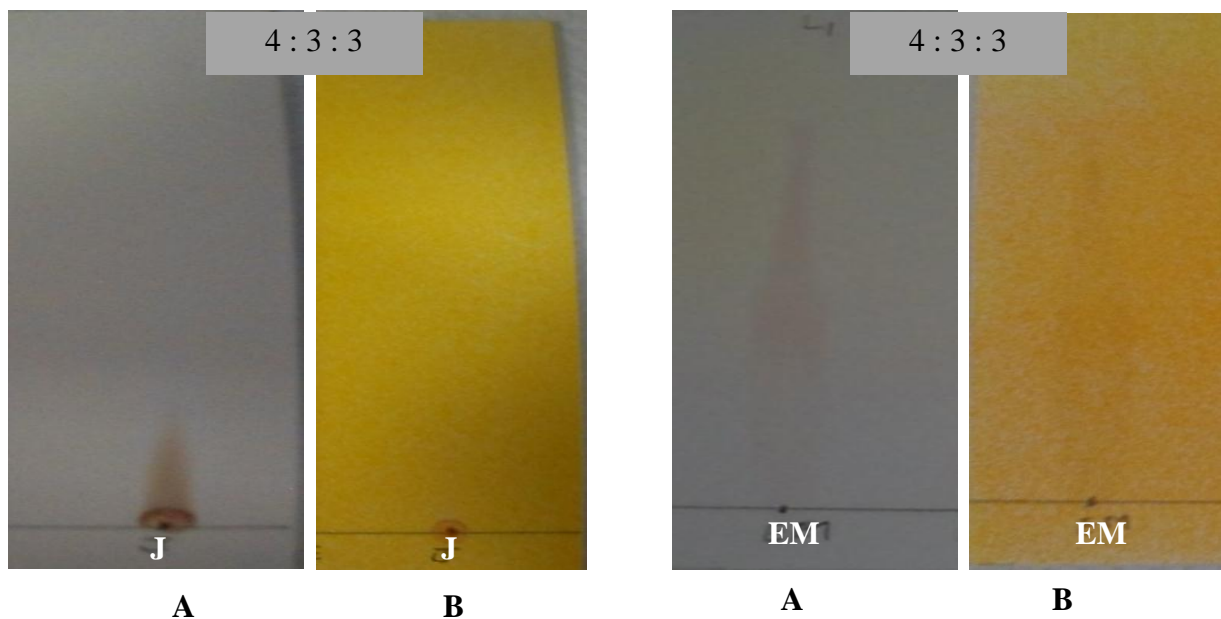


Figure 18: Chromatogramme des extraits polaires jus et extrait méthanolique d'écorce de grenade par un système de migration butanol : acide acétique ; eau distillée (4 : 3 : 3) et après révélation par A) vanilline sulfurique; B) Réactif de Dragendorff.

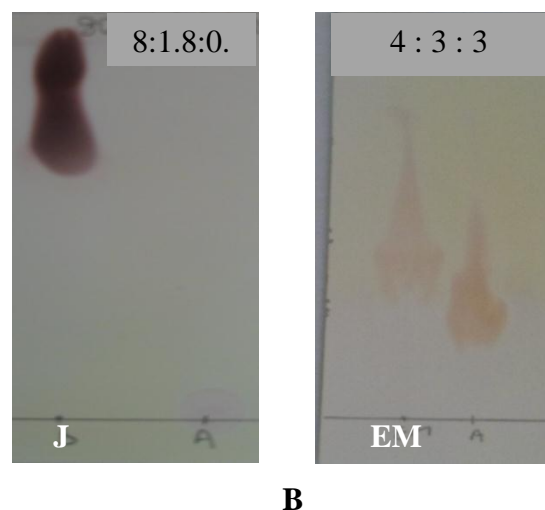


Figure 19. Chromatogramme des extraits polaires jus (80:1.8:0.2) et extrait méthanolique d'écorce (4:3:3) de la grenade après révélation par la vanilline sulfurique .

1.1.2 Analyse quantitative

Les analyses quantitatives des phénols, des flavonoïdes totaux et des tanins sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG), mg équivalent de quercétine (mg EQ), mg équivalent d'acide tannique (mg EAT) et mg équivalent de cathéchine (mg EC) par g de la matière sèche d'écorce et par litre de jus de grenade (Figure 20, 21, 22, 23)

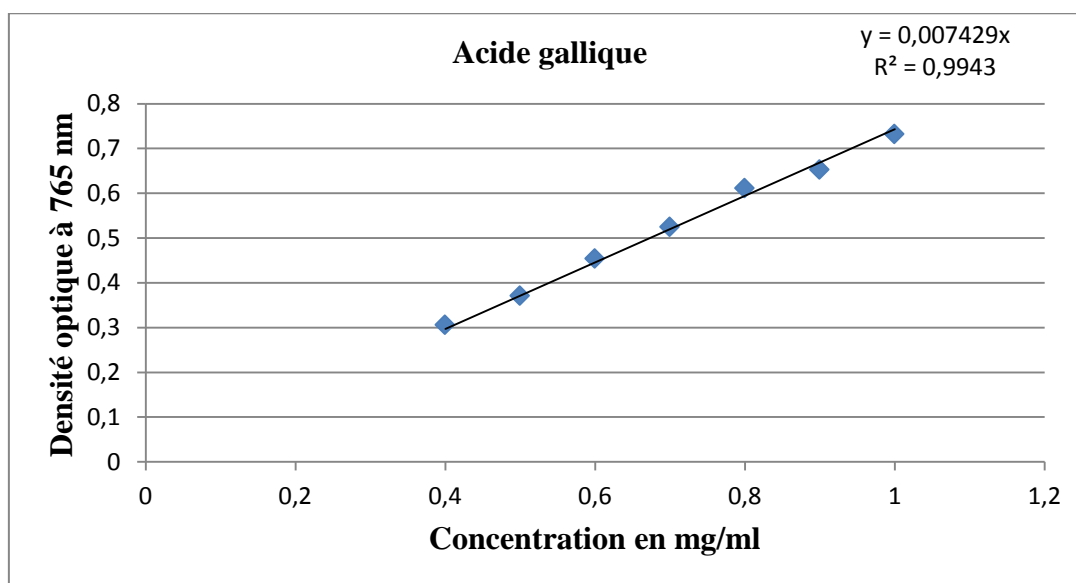


Figure 20 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

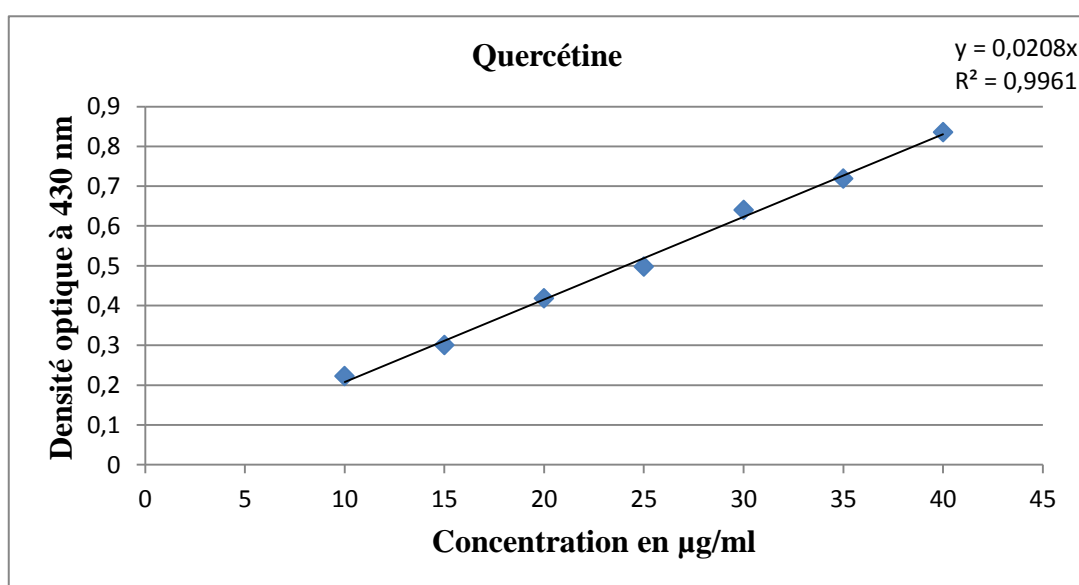


Figure 21: Courbe d'étalonnage de quercétine

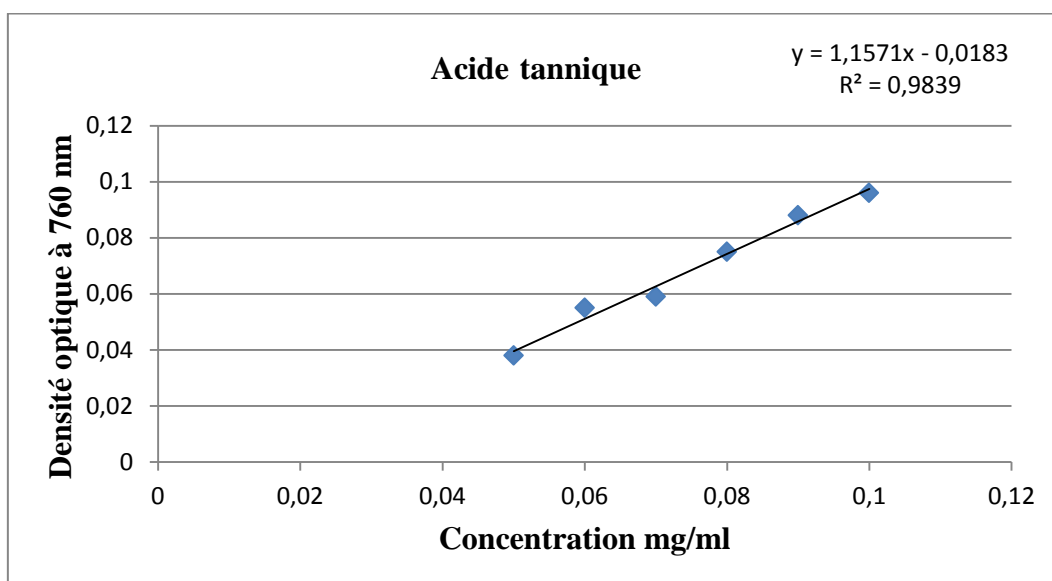


Figure 22: Courbe d'étalonnage acide tannique

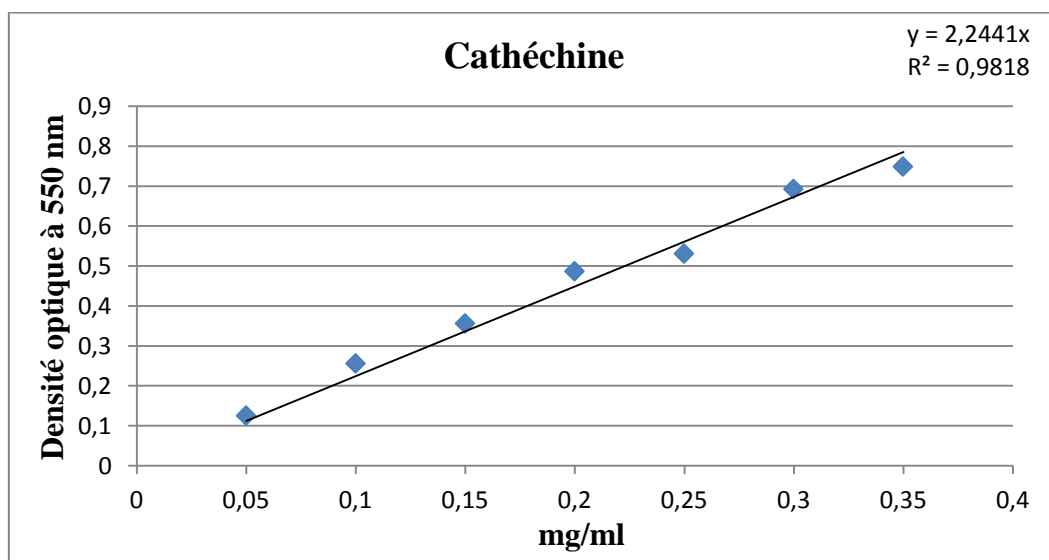


Figure 23: Courbe d'étalonnage cathéchine

La teneur en polyphénols dans le jus de *Punica granatum*, déduite à partir de la courbe d'étalonnage, est de l'ordre de 3809.8 ± 29.404 mg EAG/l, celle des flavonoïdes est de l'ordre 2109.57 ± 18.9 mg EQ/l. Les tanins totaux et les tanins condensés sont de l'ordre de 1761.81 ± 95.01 mg EAT/l et 409.39 ± 22.55 mg EC/l respectivement.

L'extrait méthanolique d'écorce de grenade a montré les concentrations suivantes: 183.67 ± 1.91 mg GAE/g de MS de polyphénols totaux, 53.59 ± 0.53 mg EQ/g de MS de flavonoïdes totaux, 143.81 ± 10.53 mg EAT/g de MS de tanins totaux et 113.18 ± 21.38 mg EC/g de MS de tanins condensés (Tableau 8).

Résultats et Discussion

Tableau 8: Teneur totale en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux & tanins condensés dans le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade.

	Polyphénols Totaux	Flavonoïdes totaux	Tanins totaux	Tanins condensés
	mg EAG	mg EQ	mg EAT	mg EC
Jus (mg /l)	3809.80 ± 29.40	2109.57 ± 18.93	1761.81± 95.01	409.39 ± 22.55
EM (mg/g MS)	183.67 ± 1.91	53.59 ± 0.53	143.81± 10.53	113.18 ± 21.38

1.1.3 Analyse HPLC

Les résultats de l'analyse HPLC-DAD-UV du jus de grenade sont présentés dans la figure 20 et le tableau 9.

La figure 24 représente le chromatogramme HPLC du jus de grenade sur le quel on observe plus de 53 pics bien distincts (la totalité des composés), 18 pics ont été identifiés à l'aide des standards utilisés.

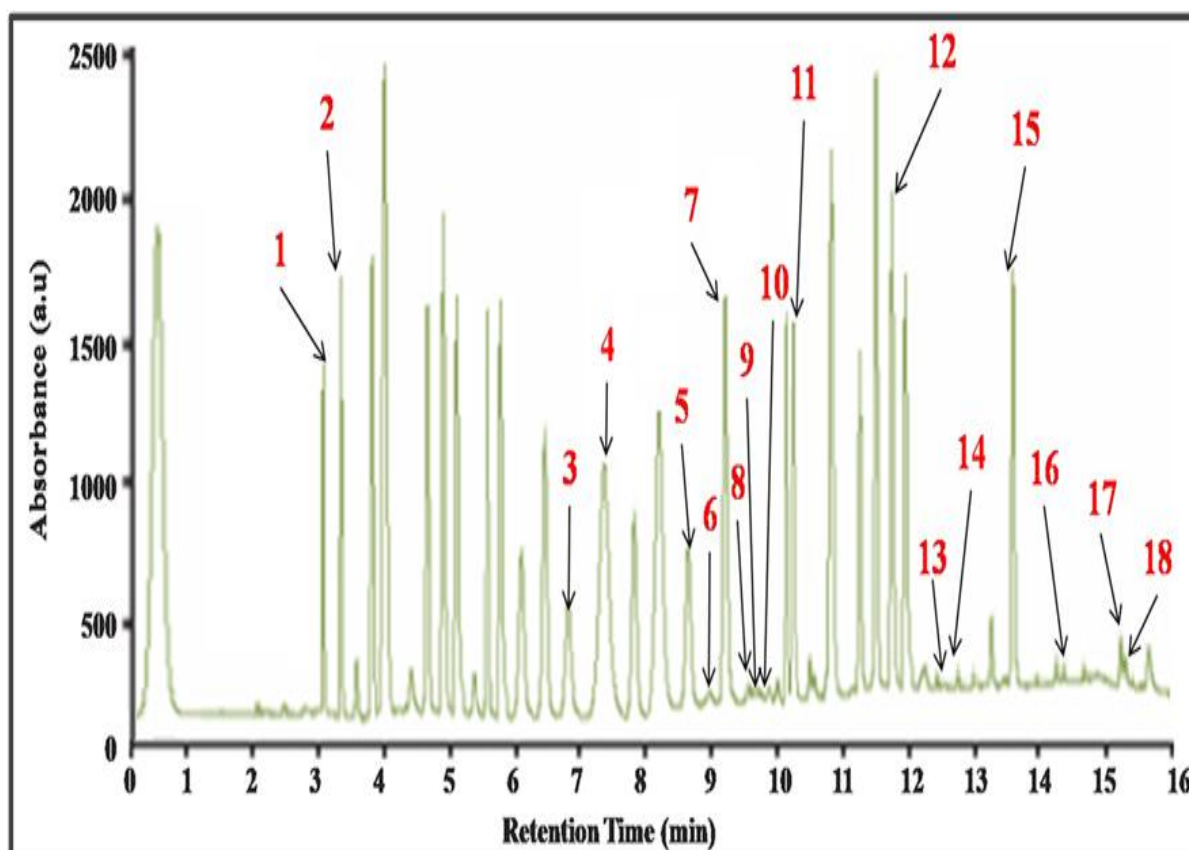


Figure 24: Chromatogramme d' HPLC-UV/DAD du jus de *Punica granatum* à 300 nm.

Résultats et Discussion

L'analyse HPLC nous a permis d'identifier dix acides phénoliques (Acide gallique, acide caféique, vanilline, acide isovanillique, acide ferulique, acide syringique, acide o-anisique, acide 3-hydroxy-4-methoxycinnamique, acide m-anisique et acide trans-cinnamique), sept flavonoïdes (rutine, prunine, luteoline, quercetine, apigénine, isorhamnetine, hesperidine) et un tanin (acide tannique). Leurs temps de rétention est donné (Tr) dans le tableau et leurs structures chimiques sont donnés dans l'annexe 1. Ces résultats confirment ceux obtenus dans le screening phytochimiques (réaction de caractérisation et chromatographie sur couche mince) dont ils ont montré une composition riche en métabolites secondaires. Toutes fois plusieurs composés sont présents dans le jus de grenades mais qui n'ont pas été identifiés dans notre chromatogramme.

Tableau 9: Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC

Acides phénoliques			Flavonoïdes		
Pique	Standards	Tr (min)	Pique	Standards	Tr (min)
1	Acide gallique	3.260	6	Rutine	8.923
3	Acide caféique	6.931	11	Prunine	10.383
4	Acide isovanillique	7.450	13	Luteoline	12.713
5	Vanilline	8.862	14	Quercetine	12.816
7	Acide ferulique	9.266	16	Apigénine	14.497
8	Acide syringique	9.660	17	Isorhamnetine	15.305
9	Acide o-Anisique	9.668	18	Hesperidine	15.379
10	Acide 3-hydroxy-4-methoxycinnamique	9.767		Tanins	
12	Acide m-Anisique	11.865	Pique	Standards	Tr (min)
15	Acide trans-Cinnamique	13.821	2	Acide Tannique	3.370

Discussion

De nombreuses études ont montré que les fruits sources de polyphénols peuvent exercer une action neuroprotectrice par réduction du risque et/ou l'incidence des maladies neurodégénératives. Les polyphénols modulent la neuroinflammation en inhibant l'expression des gènes inflammatoires et le niveau d'antioxydants intracellulaires (Aquilano et *al.*, 2008).

D'une autre part; les flavonoïdes exercent une multiplicité d'actions neuroprotectrices dans le cerveau, y compris un potentiel pour protéger les neurones contre les dommages induits par les neurotoxines, une capacité de supprimer la neuroinflammation, et le potentiel de promouvoir la mémoire, l'apprentissage et la fonction cognitive (Vauzour et *al.*, 2008).

Les grenades contiennent des niveaux très élevés de substances polyphénoliques antioxydantes, comparativement aux autres fruits et légumes. Les polyphénols se sont révélés neuroprotecteurs dans des systèmes modèles différents (Subash et *al.*, 2014).

Les essais phytochimiques préliminaires sont utiles pour la détection des molécules bioactives et peuvent ensuite conduire au développement et à la découverte des médicaments. De plus, ces tests facilitent l'estimation quantitative et la séparation qualitative des composés chimiques pharmacologiquement actifs (Bhandary et *al.*, 2012; Varadarajan et *al.*, 2008).

Le screening phytochimique de l'écorce et du jus de *Punica granatum* a indiqué la présence des alcaloïdes, des tanins et des flavonoïdes alors que les anthocyanes et les saponines ont été détectés uniquement dans le jus de grenade. La présence de ces métabolites secondaires suggère un potentiel bioactif important.

Omorieg et *al.*, (2010), ont mis en évidence des alcaloïdes dans des extraits d'écorce issus de solvants apolaires et polaires (hexane, ethyl actéae, méthanol) avec absence des saponines. Ces mêmes auteurs ont détecté la présence des tanins, des flavonoïdes et des sucres dans l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade. Les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les saponines sont présents dans l'extrait méthanoliques de l'écorce (Elfalleh et *al.*, 2012). Le chloroforme et l'éther de pétrole ont donné des résultats négatifs. Ceci est en accord avec le screening phtyochimiques réalisé sur l'extrait chloroformique par Bhandary et *al.*, (2012) qui ont révélé l'absence des tanins, des flavonoïdes, des saponines et des alcaloïdes. À cet égard, Elfalleh et *al.*, (2012) ont indiqué que la phytochimie de grenade différait selon les solvants et les organes utilisés pour extraire les métabolites secondaires.

Résultats et Discussion

La phytochimie a révélé la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des saponines, des glycosides, des triterpénoïdes, des stéroïdes et de la vitamine C dans le jus de grenade. Ces composés ont une application potentiellement considérable contre la pathologie humaine (Ali, 2016).

Le taux élevé de polyphénols totaux trouvé dans notre jus concordent avec ceux rapportés par Nuncio-Jáuregui et *al.*, (2014) dans plusieurs variétés de grenade (3222-4065 mg GAE L-1). En outre, Mena et *al.*, (2011a) ont rapporté des concentrations de polyphénols totaux entre 1500 - 4500 mg de GAE L-1 dans des variétés de grenadier cultivées en Espagne. Les polyphénols totaux du jus de grenade sont de l'ordre de 2083–3436 mg L-1 pour les jus élaborés à partir de huit cultivars en Turquie (Çam et *al.*, 2009).

La teneur en flavonoïdes dans notre jus de grenade s'est montrée plus élevée que celle trouvée par El Kar et *al.*, (2013) qui ont rapporté un taux de flavonoïdes totaux entre 120 et 1100 mg QE / L pour sept cultivars de grenade tunisiens. Cette fluctuation peut être liée à la région géographique, la floraison, la croissance, la maturation, la récolte, la saison, l'utilisation des arilles ou le fruit en entier qui peuvent modifier la composition du fruit. Ces facteurs épigénétiques provoquent des changements dans la teneur en polyphénols et les niveaux des macro/micronutriments (Mirdehghan et Rahemi, 2007).

Dans une autre part, le contenu en polyphénol total dans l'extrait méthanolique de *Punica granatum* concorde avec les résultats (100,4-181,0 mg GAE /g ms) rapportés par Saad et *al.*, (2012) et supérieur à ceux (49,36-89,23 mg GAE /g ms) rapportés par Tabaraki et *al.*, (2012). Abdel Moneim, (2012a) a rapporté un taux de $124 \pm 5,42$ mg GAE / g et $59,44 \pm 3,71$ mg Q/g de polyphénols et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique issu de l'écorce de *Punica granatum* respectivement. Elfalleh et *al.*, (2012) ont enregistré un taux de 85.60 ± 4.87 (GAE mg / g ms) et 139.63 ± 4.25 (TAE mg / g ms) de polyphénols et de tanins hydrolysables respectivement dans l'extrait méthanolique de l'écorce. L'extrait d'écorce de grenade s'est révélé être riche en tanins $420,58 \pm 9,17$ mg TAE /g de ms (Basiri et *al.*, 2014).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques. Des études ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Louerrad et Kaid-Harche, 2016; Aganga et Mosase, 2001).

Résultats et Discussion

Les polyphénols de grenade comprennent les flavonoïdes (flavonols, flavanols et anthocyanes), les tanins condensés (proanthocyanidines) et les tanins hydrolysables (ellagitanins et gallotannins). D'autres substances phytochimiques identifiées à partir de la grenade sont les acides organiques et phénoliques, les stérols et les triterpénoïdes, les acides gras, les triglycérides et les alcaloïdes (Seeram et *al.*, 2006).

Russo et *al.*, (2018) ont pu identifier différentes classes de composés phénoliques; à savoir, les anthocyanes, les acides phénoliques, les tanins hydrolysables et les flavonoïdes. Les anthocyanes ont été trouvés responsables de la couleur rouge du jus de grenade. L'analyse quantitativement et qualitativement par chromatographie liquide à haute performance a identifiée; delphinidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside, cyanidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside et pélargonidine 3-glucoside et 3,5-diglucoside (Hernández et *al.*, 1999). Ces composés présentent une activité antioxydante élevée (De Pascual-teresa et *al.*, 2004)

Effectivement, notre analyse HPLC nous a permis d'identifier dix acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, vanilline, acide isovanillique, acide férulique, acide syringique, acide o-Anisique, acide 3-hydroxy-4-methoxycinnamique, acide m-anisique et trans-cinnamique), sept flavonoïdes (rutine, prunine, lutéoline, quercétine, apigénine, isorhamnétine, hespéridine) et un tanin (acide tannique).

Toutes fois plusieurs autres composés sont présents avec des quantités significatives dans le jus de grenades mais qui n'ont pas été identifiés dans notre chromatogramme HPLC par indisponibilité des standards comme les catéchines (HE et *al.*, 2011), les anthocyanines (He et *al.*, 2011 ; Pérez-Vicente et *al.*, 2002; Alighourchi et *al.*, 2008; Hernandez et *al.*, 1999) (delphinidin 3,5-diglucoside, delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3,5-diglucoside, cyanidin 3-glucoside, pelargonidin 3,5-diglucoside, et pelargonidin 3-glucoside), des tanins (Seeram et *al.*, 2004), tanins hydrolysables et punicalagine ou encore acide ellagique (Vicinanza et *al.*, 2013).

De plus, l'analyse de la composition polyphénolique du jus de grenade montre différentes classes de polyphénols comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les stilbènes. En particulier, les acides phénoliques, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide p-coumarique, acide ellagique, acide protocatéchuique, acide ferulique, acide ellagique, quercétine et la rutine (Matthaiou et *al.*, 2014).

Résultats et Discussion

L'analyse par HPLC montre que les constituants du jus de grenade sont les anthocyanines, sucre, acide ascorbique, acide ellagique, acide gallique, acide caféique, catéchine, EGCG, quercétine, rutine, de nombreux minéraux, fer et acides aminés (De Nigris et *al.*, 2005).

Ce fruit améliore la santé. Ces effets physiologiques bénéfiques peuvent également avoir des applications préventives dans une variété de pathologies. Les avantages pour la santé de la grenade ont été attribués à sa large gamme de composés phytochimiques, qui sont principalement des polyphénols, y compris principalement des ellagitanins hydrolysables (punicalagin, punicalin, acide ellagique, gallotannins etc.), flavonoids (rutine, quercétine, kaempferol et luteoline glycosides), des anthocyanines (cyanidine, delphinidine et pélargonidine glycosides) et d'autres polyphénols (Viuda-Martos et *al.*, 2010).

La teneur en antioxydants et les bienfaits potentiels sur la santé associés à la consommation de grenade et des produits à base de grenade ont entraîné une augmentation de la demande des consommateurs pour cette culture, ce qui en fait une culture à valeur élevée. Les avantages potentiels pour la santé et la haute teneur en antioxydants de ce fruit sont attribués aux composés polyphénoliques qu'il contient, y compris les acides phénoliques omniprésents, l'acide gallique et l'acide ellagique, et punicalagin A et punicalagin B, deux polyphénoliques uniques à ce fruit (Qu et *al.*, 2012).

Plomb

2. Etude *in vivo*

2.1 Plomb

2.1.1 Evolution pondérale

Le Tableau 10 représente l'évolution du poids corporel des souris durant 12 semaines d'expérimentation. Les souris intoxiquées par l'acétate de plomb présentent une diminution du poids corporel par rapport aux souris témoins ($P > 0.05$). Le groupe des souris intoxiquées par le plomb et traitées par le jus de *Punica granatum* présente une évolution pondérale intermédiaire entre les souris qui ont reçu uniquement le plomb et celles des témoins ($P > 0.05$). Les souris ayant reçues l'extrait méthanolique issu de l'écorce de grenade ont des poids corporels comparables à ceux des témoins ($P > 0.05$).

Tableau 10. Effet de du Plomb sur le poids corporels durant 12 semaines d'expérimentation. (Pb): Le groupe des souris intoxiquées par Acétate de plomb (1000ppm). (Pb-J): Le groupe des souris intoxiquées par acétate de plomb (1000ppm) traitées par le jus de grenade; (Pb-E): Les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. * $P < 0,05$.

	Evolution pondérale (g) / Lots expérimentaux			
	T	Pb	Pb-J	Pb-E
Semaine 1	20,78 ± 1,31	18.21±1.36	19,11±1.26	21.78±0.91
Semaine 4	30,32 ± 2,74	27,78±0.52	29,56±1.20	30.42±1.36
Semaine 8	34,54 ± 2,87	32.6±1.58	30.07±1.33	35.33±3.07
Semaine 12	36,18 ± 3,09	32.17±0.42	34.175±2.33	36.78±2.46

2.1.2 Solution consommée

Le volume de la solution consommée chez les souris intoxiquées par le plomb est significativement moins important que les souris témoins ($P < 0.05$). Les souris intoxiquées par ce métal et traitées par le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum* ont un volume de consommation intermédiaire entre les souris intoxiquées et les témoins (Tableau 11).

Tableau 11. Effet de du plomb sur la consommation de l'eau de boisson durant 12 semaines d'expérimentation. (Pb) Le groupe des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (500mg/Kg). (Pb-J): Le groupe des souris intoxiquées par l'acétate de plomb (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours.
* P < 0,05.

Solution consommée en ml / Lots expérimentaux			
T	Pb	Pb-J	Pb-E
212,77±48,65	126.61±42.56*	173.84±28.78	186.57±31.70

2.1.3 Paramètres neurologiques étudiés

2.1.3.1 Tests de comportement

2.1.3.1.1 Test de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice des souris a été évaluée par le score qui est le nombre de cases visitées par les souris durant 20 minutes réparties en quatre phases.

L'exposition au plomb provoque une hyperactivité locomotrice significative chez le lot traité par le plomb par rapport au lot témoin dans les 4 phases. Cependant, le jus de *Punica granatum* a permis d'enregistrer une amélioration significative du nombre de cases explorées par les souris empoisonnées au plomb dans la phase 2 et 3 (P < 0,05). L'extrait méthanolique issu d'écorce de grenade diminue significativement l'activité locomotrice dans la troisième phase alors qu'elle augmente significativement lors des deux dernières phases (P < 0,05) Figure 25.

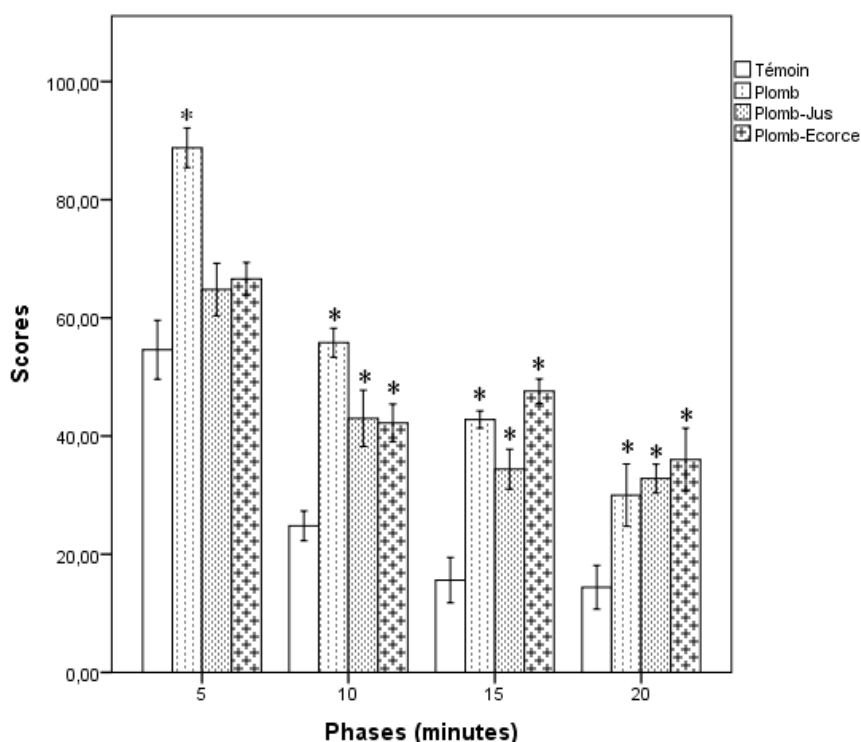


Figure 25: résultats de l'activité locomotrice chez les souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm), les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v); souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celui des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.1.2.3.2 Test de la chambre noire/clair

Le plomb ingéré par les souris entraîne une augmentation significative du temps de séjour dans le compartiment sombre. Ils passent moins de temps dans le compartiment lumineux peu familier, plus aversif et anxieux par rapport aux souris témoins ($P < 0,05$). Cependant, le groupe intoxiqué traité (jus et écorce de grenade) a un comportement similaire à celui du groupe témoin, mais pas de façon significative ($P > 0,05$) sauf dans la dernière phase l'extrait méthanolique diminue significativement le temps de séjour dans le compartiment noir provoqué par le plomb (Figure 26).

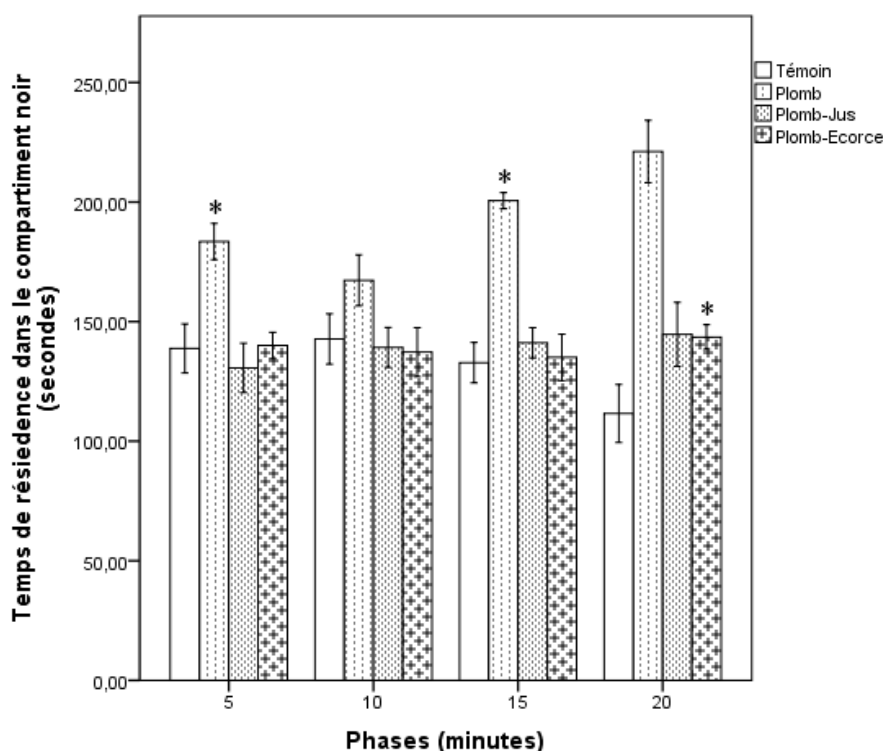


Figure 26: résultats du test compartiment noir/clair chez les souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm), les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v); souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celui des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.1.2.3.3 Test de la nage forcée

Le temps d'immobilité était plus faible chez les souris témoins et plus élevé chez les souris empoisonnées par l'acétate de plomb. Le jus de *Punica granatum* améliore significativement le temps d'immobilité chez les intoxiquées par le plomb et traités par le jus de grenade ($P < 0,05$). Quant aux souris traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade ont enregistré un temps d'immobilité intermédiaire entre les témoins et les souris ayant reçu l'acétate de plomb ($P > 0,05$). Figure 27

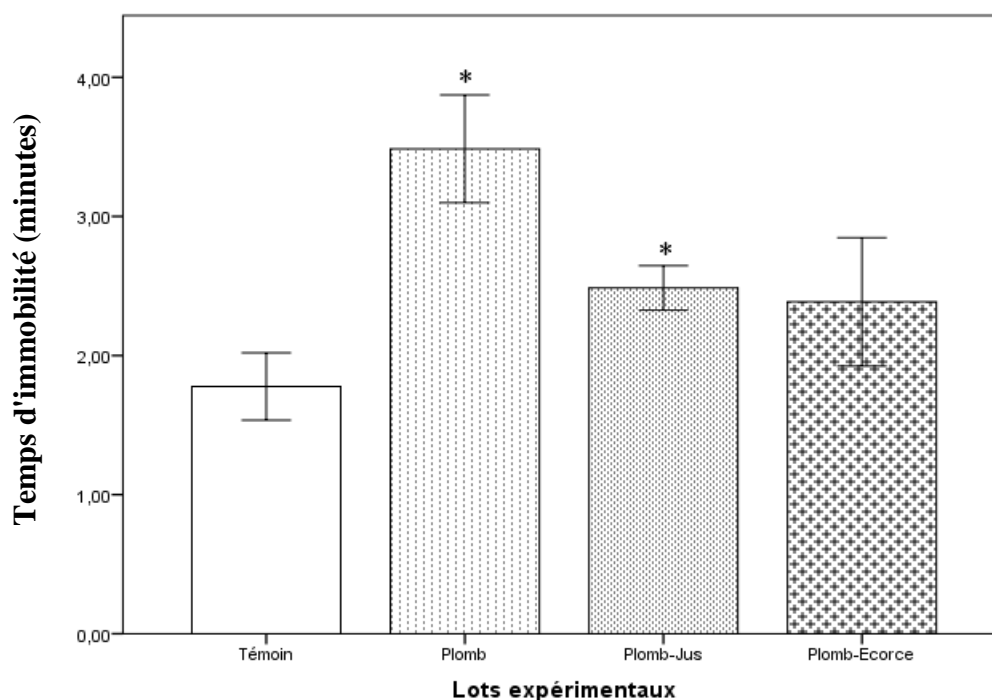


Figure 27: résultats du test de la nage forcée chez les souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm), les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v); souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celui des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.1.4 Dosage du plomb au niveau cérébral

Le dosage du plomb par spectrophotométrie atomique est donné dans la figure 28 . Les résultats montrent un taux de plomb élevé ($7,87 \pm 7,9 \mu\text{g/l}$) au niveau du cerveau cela confirme son passage à travers la membrane hémato encéphalique et que le cerveau constitue un site de fixation des métaux lourds. Le traitement par le jus et l'extrait méthanolique réduit le taux de plomb au niveau du cerveau ($1,22 \pm 0,39$ et $1,07 \pm 0,3 \mu\text{g/l}$ respectivement, $P > 0,05$).

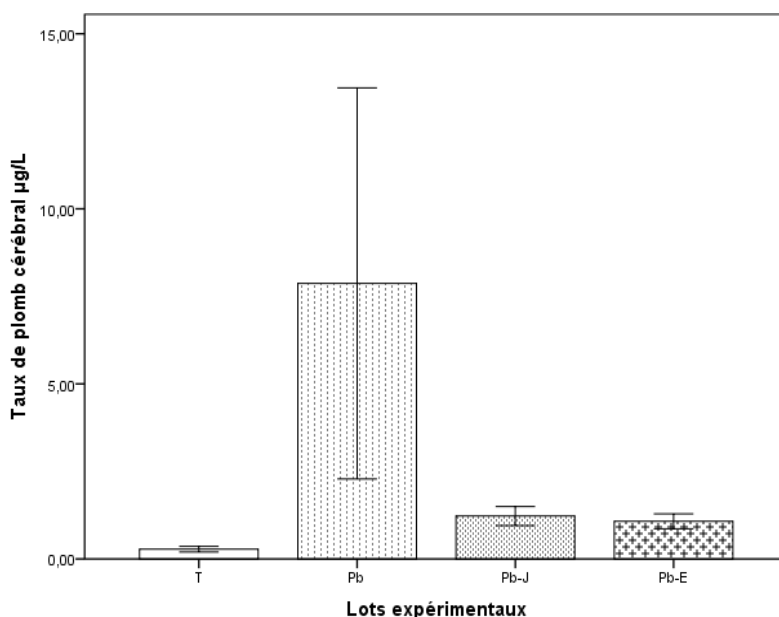


Figure 28: Taux de plomb dans le cerveau des souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm), les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v); souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celui des souris témoins

2.1.5 Dosage TGP, TGO et Ca

L'analyse des marqueurs de la fonction hépatique a montré un taux significativement élevé en TGO (444.5 ± 28.99 ; $P < 0.05$) et en TGP (109 ± 35.35 ; $P > 0.05$) chez les souris intoxiquées par rapport aux souris témoins (338 ± 12.73 ; 73.5 ± 13.43). L'administration quotidienne du jus de grenade a permis de diminuer le fuite des transaminases TGP et TGO par rapport aux souris intoxiquées $P > 0.05$. L'extrait méthanolique d'écorce de grenade diminue significativement le taux de TGO ($P < 0.05$; Tableau 12).

De plus, les résultats du tableau 12 montrent que le plomb induit chez les souris intoxiquées une augmentation significative du taux de calcium par rapport aux témoins (119.5 ± 1.41 mg/l; $P < 0.05$). Le traitement par les extraits de grenade corrige l'hypercalcémie provoquée par le plomb.

Tableau 12: Taux de TGP, TGO et Ca dans le sang

	Lot (T)	Lot (Pb)	Lot (Pb-J)	Lot (Pb-E)
TGO U/l	338 ± 12.73	444.5 ± 28.99 *	406 ± 125,86	407,5 ± 3,53 *
TGP U/l	73.5 ± 13.43	109 ± 35.35	71,5 ± 20,50	79,5 ± 27,58
Calcium (mg/l)	95.85 ± 2.9	119.5 ± 1.41*	99.7 ± 0.99	100.5 ± 0.71

2.1.6 Etude histologique

2.1.6.1 Cerveau

Le cortex cérébral des souris témoins montre une structure cellulaire normale (Figure 29 A). L'exposition au plomb a conduit à des altérations histopathologiques marquées dans de nombreuses zones du cortex cérébral et de l'hippocampe, y compris la dégénérescence neuronale sous forme de vacuolisation cytoplasmique, de congestion des vaisseaux sanguins, de nécrose et d'infiltrat inflammatoire. Ce même groupe a révélé une diminution de la densité cellulaire dans l'hippocampe et le cortex cérébral comparativement au groupe témoin (29 B). L'administration concomitante du jus de grenade avec de l'acétate de plomb a amélioré les lésions induites par l'acétate de plomb (Figure 29 C).

Le groupe traité avec ce jus de fruit présente des changements dégénératifs et une vacuolisation modérés avec absence de nécrose et d'infiltrat inflammatoire dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral par rapport au groupe intoxiqué à la fin du 3^{ème} mois.

Les souris ayant reçu le jus de grenade (v/v) présentent une neurodégénérescence et une vacuolisation moins importantes que celles des souris traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum* (500 mg/ kg) (Figure 29 C, D).

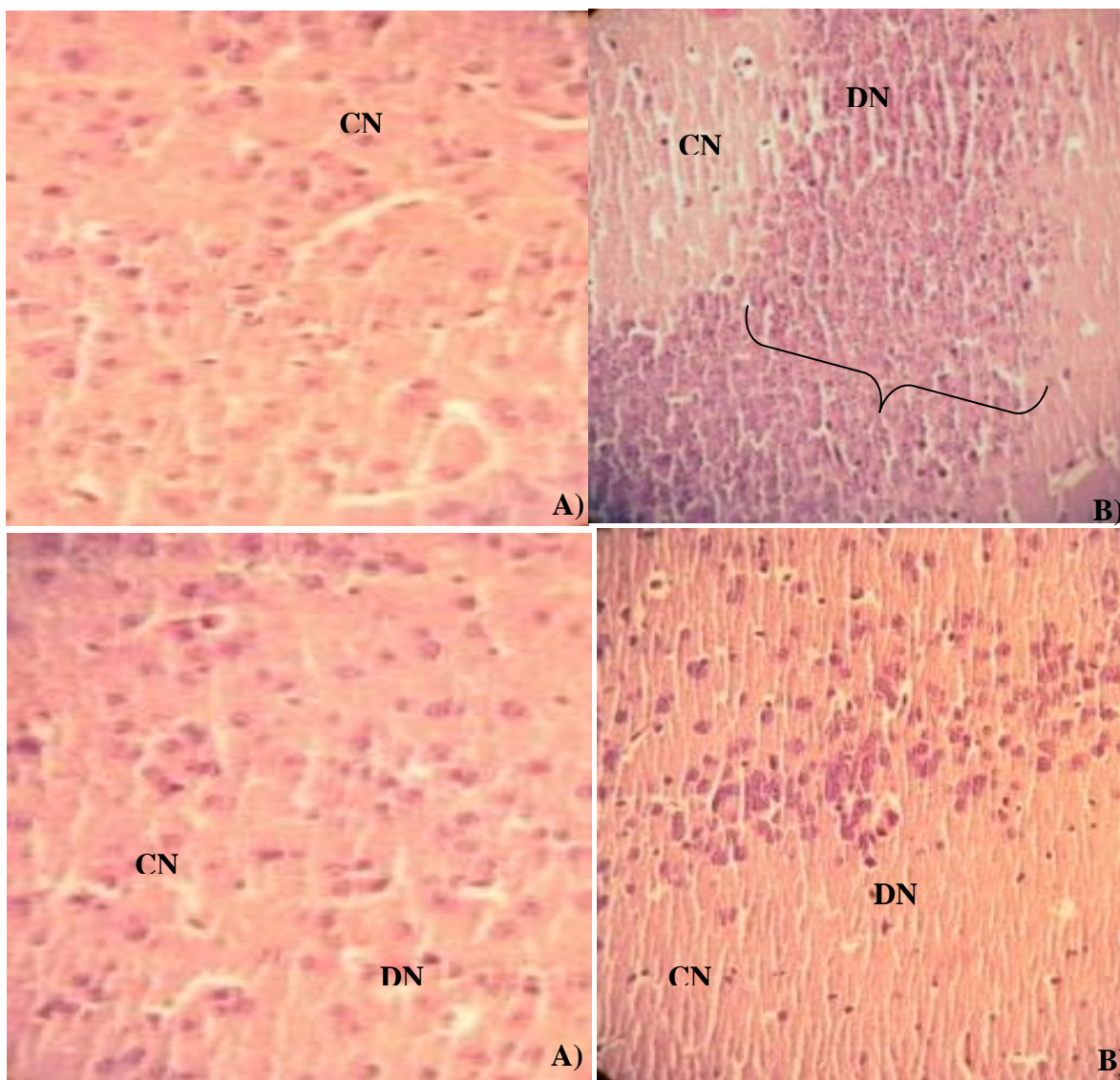


Figure 29 A: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) par coloration hématoxyline et de l'éosine (H&E) des souris témoins après 90 jours (G x 400). cellule normale (CN), densité normale (DN).

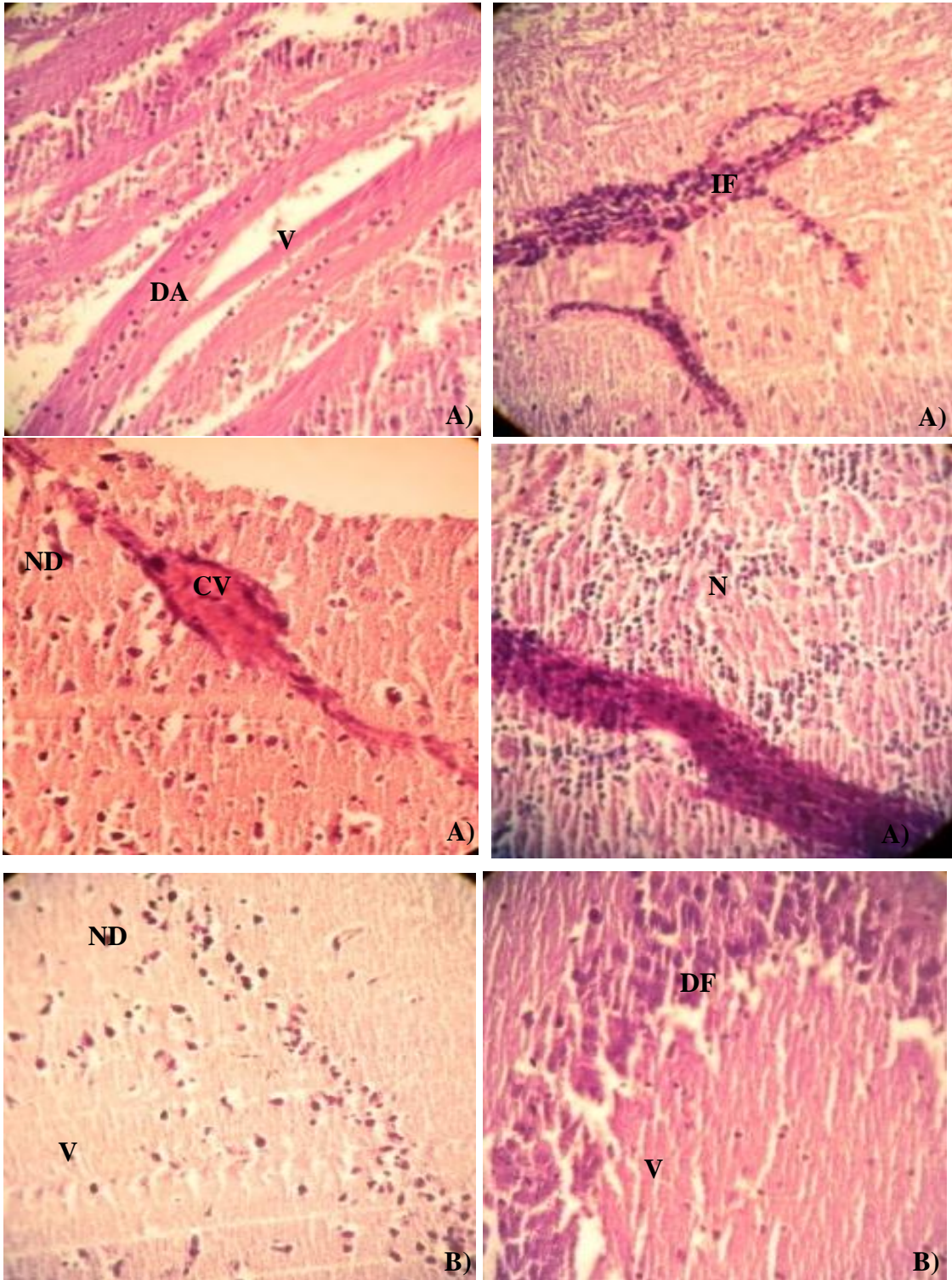


Figure 29 B: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) réalisée par coloration hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez le groupe intoxiqué par l'acétate de plomb (1000 ppm) pendant 90 jours (G x 400): cellule normale (CN), une congestion des vaisseaux sanguins (CV), la nécrose (N), l'infiltrat inflammatoire (IF), la dégénérescence neuronale (ND); vacuolisation (V), dépôts amyloïdes (DA), densité faible (DF)

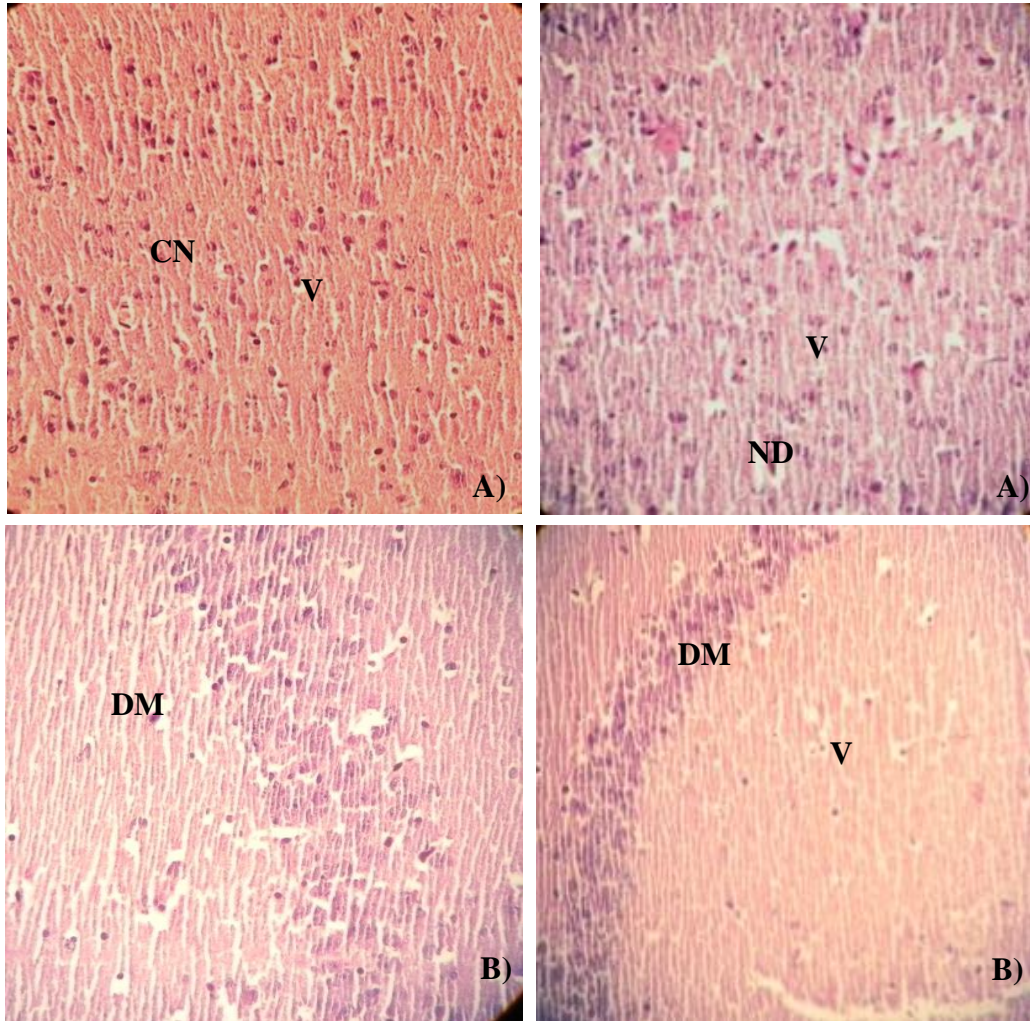


Figure 29 C: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) réalisée par coloration hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v) pendant 90 jours. cellule normale (CN), la dégénérescence neuronale (ND); vacuolisation (V); densité moyenne (DM).

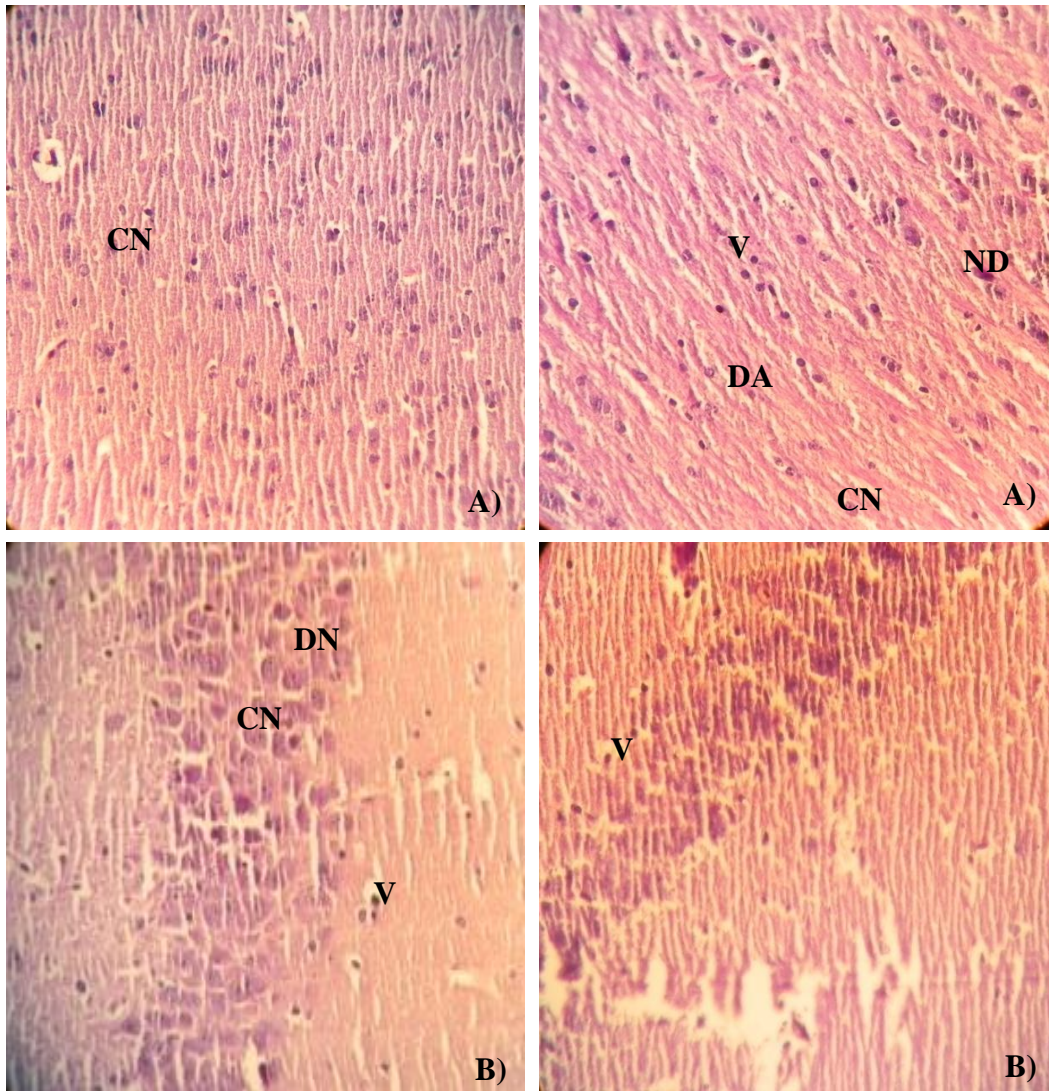


Figure 29 D: Etude microscopique de l'hippocampe par coloration hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours. (G x 400). cellule normale (CN), la dégénérescence neuronale (ND); vacuolisation (V); dépôts amyloïdes; densité normale (DN)

2.1.6.2 Tissu hépatique

L'examen histologique du foie des souris est illustré dans la figure 30 A, B, C, D. L'histologie du foie des souris témoins montre une structure histologique normale. Pour les souris traitées par une dose de 1000 ppm d'acétate de plomb pendant 90 jours; nous avons noté une altération sévère de l'architecture du foie dont des sinusoides dilatés, des veines centrolobulaires dilatées, des hépatocytes irréguliers ballonnés, des infiltrats inflammatoires et des congestions vasculaires avec une veine centrolobulaire dilatée. Chez les lots intoxiqués par le plomb et prétraités par le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade, la structure des hépatocytes est assez bien conservée par rapport aux souris intoxiquées avec présence des congestions vasculaires et absence des infiltrats inflammatoires.

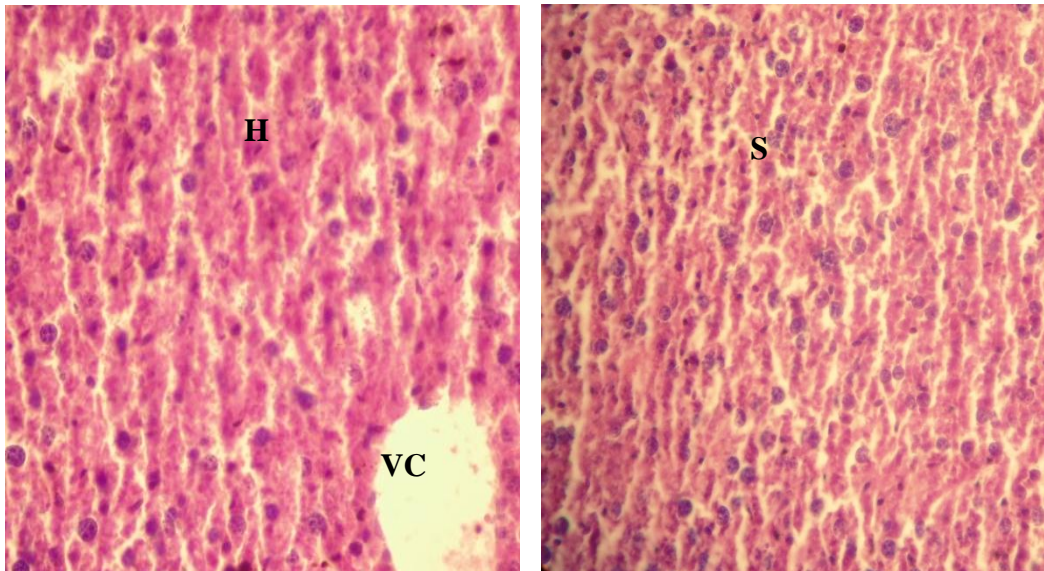


Figure 30 A: Etude microscopique du foie par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris témoins 90 jours. (G x 400). Hépatocyte (H), veine centrolobulaire (VC), sinusoides (S).

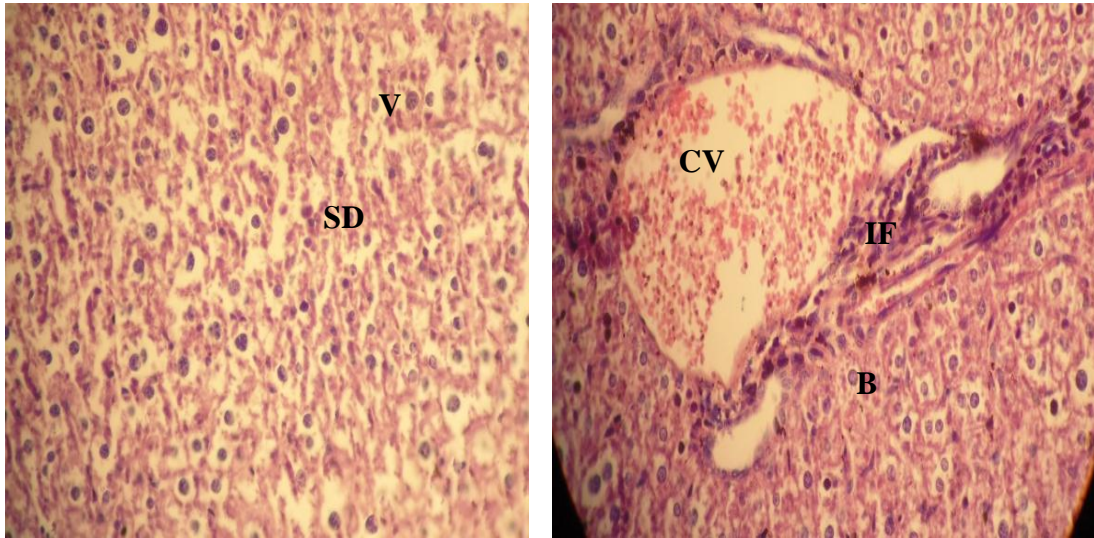


Figure 30 B: Etude microscopique du foie par coloration de l' hématoxyline et de l 'éosine (H&E) chez les souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaire (VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Ballonisation (B), infiltrat inflammatoire (IF), Congestion vasculaire (CV), Vacuolisation (V),

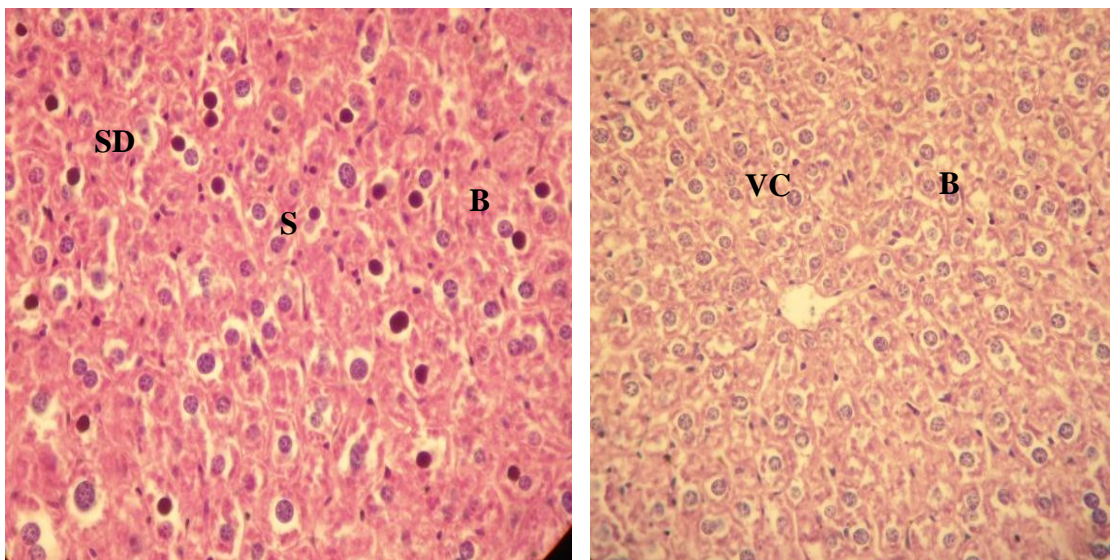


Figure 30 C: Etude microscopique du foie par coloration de l'hématoxyline et de l 'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaires(VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Ballonisation (B), Vacuolisation (V),

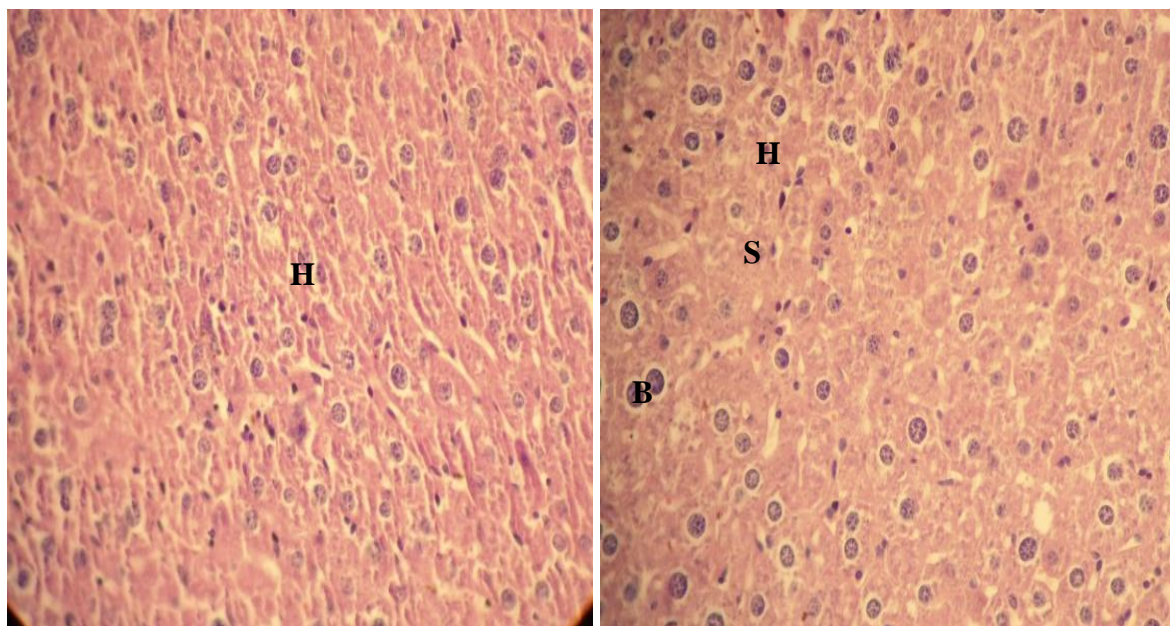


Figure 30 D: Etude microscopique du foie par coloration de l' hématoxyline et de l 'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaire (VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Ballonisation (B), Vacuolisation (V),

2.1.6.3 Tissu rénal

L'observation microscopique des coupes histologiques rénales chez les souris témoins a montré une architecture cellulaire normale. L'exposition au plomb montre une architecture histologique marquée par la présence de plusieurs infiltrats inflammatoires dans une même section et des dilatations des tubules rénales. Le traitement par le jus des souris intoxiquées montre une correction des lésions avec présence d'un infiltrat inflammatoire plus important chez les souris ayant reçu l'extrait méthanolique issu d'écorce de *Punica granatum* (Figure 31 A, B,C, D).

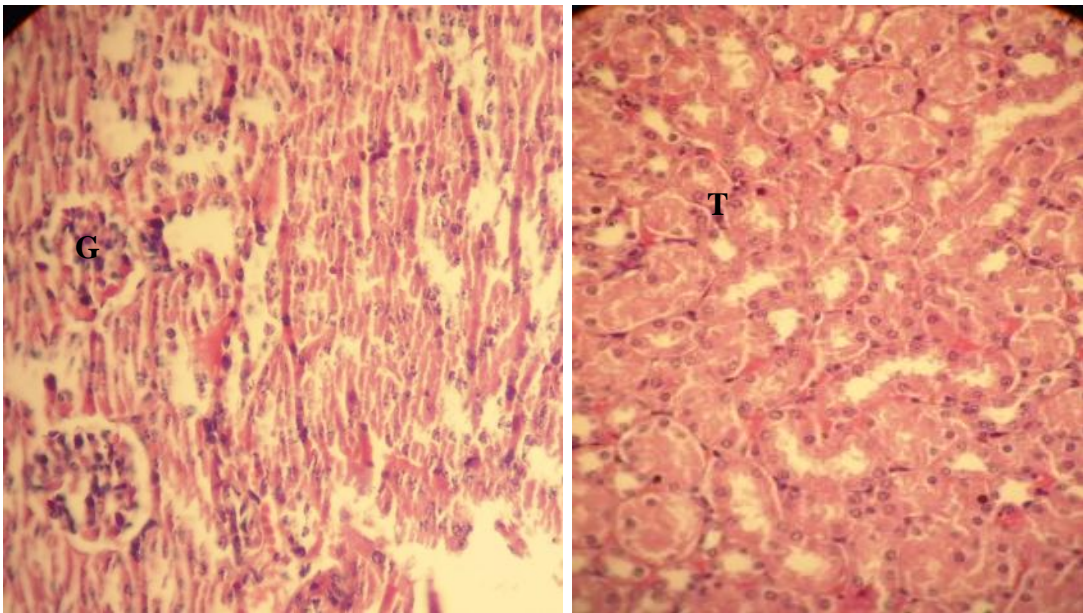


Figure 31 A: Etude microscopique du rein par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris témoins (G x 400). glomérule (G); Tubule (T).

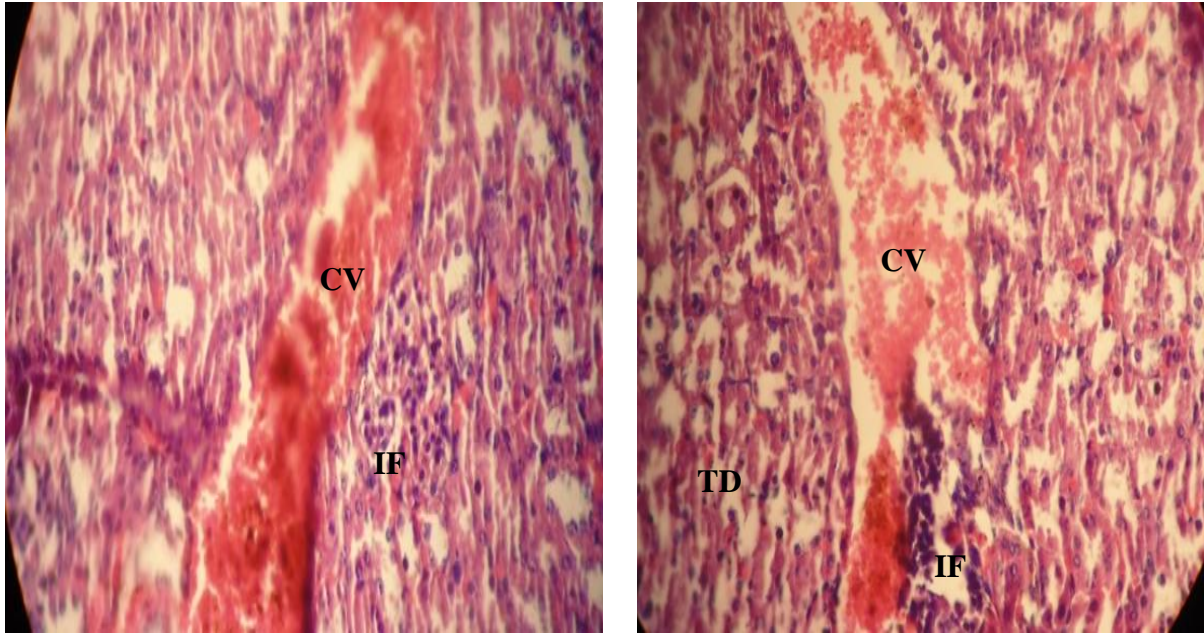


Figure 31B: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l 'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par le plomb (1000 ppm) pendant 90 jours (G x 400). infiltrat inflammatoire (IF), congestion vasculaire (CV), tubules dilatées (V).

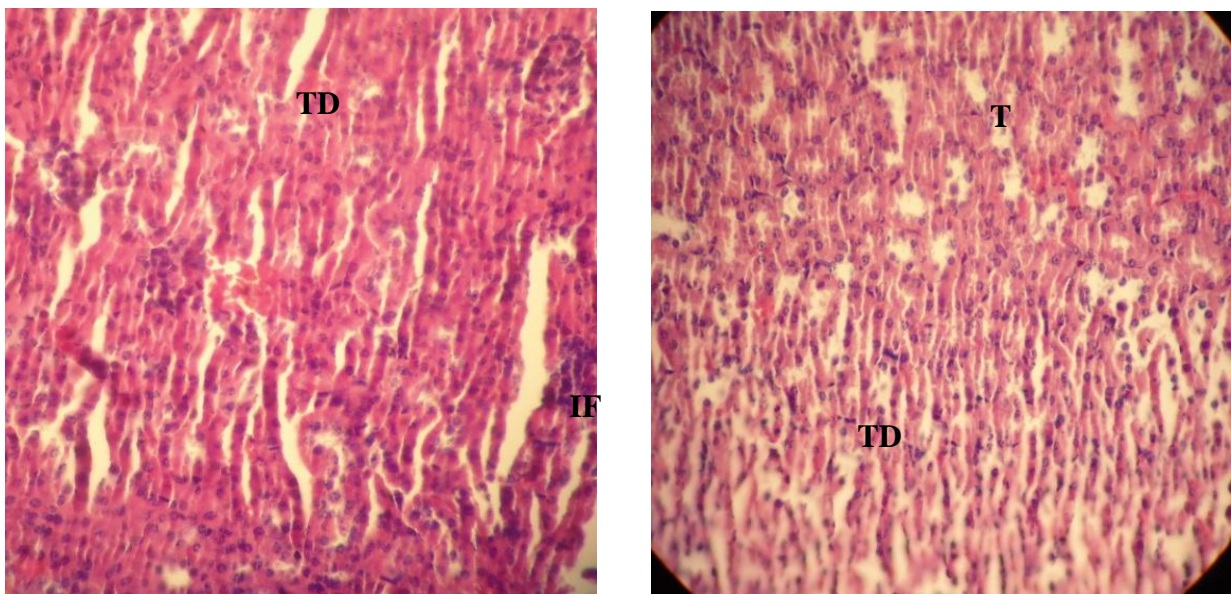


Figure 31 C: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l 'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par le jus de grenade (v/v) pendant 90 jours. (G x 400). infiltrat inflammatoire (IF), congestion vasculaire (CV), tubules dilatées (V). tubules (T).

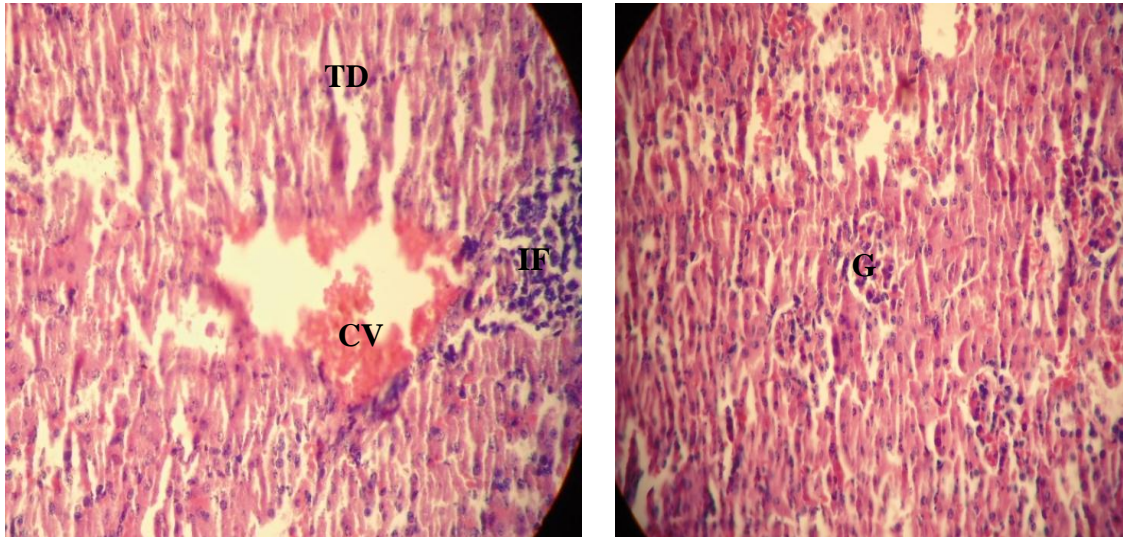


Figure 31 D: Etude microscopique du rein par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez souris intoxiquées par l'acétate de plomb (1000 ppm) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours (G x 400). infiltrat inflammatoire (IF), congestion vasculaire (CV), tubules dilatées (V), tubules (T), glomérule (G)

Discussion

Le plomb est une toxine environnementale omniprésente qui affecte plusieurs systèmes organiques, y compris le système nerveux, rénal, reproducteur et hématologique (Aykin-burns et Ercal, 2006).

Les résultats du suivi du poids corporel ont montré que le plomb induit une diminution du poids et une consommation significative faible d'eau chez les souris ayant reçu l'acétate de plomb par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Seddiki et *al.*, (2010) qui ont observé une réduction de la prise alimentaire chez les rats avec de l'acétate de plomb dilué à 250 et 500 mg / L pendant 90 jours.

Missoum et *al.*, (2010) ont constaté que les rats exposés à 1000 ppm d'acétate de plomb présentaient une augmentation lente du poids corporel par rapport aux rats témoins pendant 8 semaines et que la consommation d'eau diminuait chez les rats traités au plomb pendant l'expérience. Nos résultats évoquent que le plomb est anorexigène et qu'il agit sur les centres neuraux responsables de la régulation de la satiété et de la faim. L'effet anoréxique exercé par ce métal toxique justifie son implication dans le système de la transmission nerveuse (catécholaminergique, glutamatergique et sérotonine) (Fromentin, 2005).

Des preuves biochimiques, électrophysiologiques et pharmacologiques soutenant un rôle de la dysfonction cholinergique dans les troubles comportementales et cognitifs chez les sujets en bonne santé et chez les personnes souffrant d'un dysfonctionnement neurologique (Bartus et *al.*, 1982).

Le plomb a entraîné une augmentation de l'activité locomotrice; ces résultats concordent avec ceux obtenus par Seddik et *al.*, (2010); Hassan et Jassmin, (2010) et Kharoubi et *al.*, (2011). L'exposition au plomb peut entraîner des troubles cognitifs et moteurs, avec des altérations du comportement à long terme (Garza et *al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que le plomb pourrait interférer avec la neurotransmission catécholaminergique et en particulier dopaminergique (Djebli et *al.*, 2005).

A partir de cette étude, il a été possible de démontrer que le taux élevé de polyphénols présents dans le jus de grenade a permis de réduire l'hyperactivité locomotrice. Notre jus contient la lutéoline qui a probablement protégé les neurones dopaminergiques en réduisant les dommages oxydatifs, la neuroinflammation et l'activation microgliale ainsi qu'un potentiel neurotrophique amélioré (Chen et *al.*, 2008).

Résultats et Discussion

Dans le test de la chambre claire/obscur, la durée du temps passé dans les deux compartiments nous informe sur le degré d'anxiété, donc une augmentation de l'activité dans le compartiment blanc devrait refléter un effet anxiolytique, alors qu'une augmentation de l'activité dans le compartiment sombre devrait refléter un comportement anxieux (Maximino *al.*, 2010).

Le dysfonctionnement des neurones GABAergique, serotoninergique, dopaminergique a été impliqué dans la physiopathologie de l'anxiété (Nikolaus et *al.*, 2010).

De nombreux types de médicaments sont utilisés dans le traitement des troubles anxieux tels que les benzodiazépines et les antidépresseurs. Ces médicaments peuvent apporter un soulagement temporaire, mais ils s'accompagnent également des effets secondaires tels que les nausées, les étourdissements, les vertiges, les maux de tête, la sécheresse de la bouche, constipation, diarrhée, etc (Smith et Robinson, 2012).

En outre, des études récentes ont fourni des preuves substantielles que les extraits végétaux et leurs composants majeurs ou bioactifs incluant les alcaloïdes, flavonoïdes, glycosides et saponines ont des effets antioxydants prometteurs et des effets modulant des systèmes cholinergiques, GABAergiques, glutaminergiques, sérotoninergiques, catécholaminergiques et histaminergiques (Hsieh et *al.*, 2010).

L'effet anxiolytique du jus de grenade a été mesuré à travers le test de boîte claire / sombre, l'augmentation du temps passé dans le compartiment de lumière sont des indicateurs de diminution de l'anxiété chez la souris. Ainsi, dans le test de la boîte sombre/claire, l'augmentation du temps passé dans la boîte à lumière induit par les médicaments sont suggérés comme indice de l'activité anxiolytique (Bourin et Hascoet, 2003). De plus nos résultats sont contradictoires avec ceux de Kahloula et *al.*, (2013) qui ont rapporté que des rattes ayant ingérées le plomb pendant la gestation et l'allaitement passaient plus de temps dans le compartiment éclairé par rapport aux rattes témoins.

Nombreux médicaments à base de plantes sont susceptibles de traiter un large éventail de troubles anxieux sont classées comme «anxiolytiques» et ont généralement des effets sur le système GABA (Sarris, 2007). La suppression de ces troubles dans le test de la chambre noire/éclairée suggèrent que le jus et l'extrait d'écorce de grenade ont modulé le système GABA-ergique. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par Kumar et Maheshwari, (2008) qui a constaté que l'extrait éthanolique de grenade était associé à une diminution de

l'anxiété chez la souris. Abdulmalek et *al.*, (2015); suggèrent que le jus de *Punica granatum* possède un effet anxiolytique et augmente la curiosité.

Les polyphénols végétaux tels que les flavonoïdes se sont avérés conférer des avantages bénéfiques pour la santé. La lutéoline (3, 4, 5, 7-tétrahydroxyflavone), une sorte de flavonoïde, possédant des propriétés anti-oxydantes, anti-tumorales et anti-inflammatoires (Oh et *al.*, 2016) et neuroprotectrices (Oh et *al.*, 2016; Ren et *al.*, 2013; Zhang et *al.*, 2013). Ce flavonoïde naturel a été signalé comme ayant des effets antidépresseurs, antinociceptifs et anxiolytiques, qui impliquent peut-être les mécanismes de modulation de la signalisation GABA (Shen et *al.*, 2016). En effet, Coleta et *al.*, (2008) ont signalé que la lutéoline pouvait atteindre le cerveau et exercer des effets de type anxiolytique via l'activation GABAergique (Coleta et *al.*, 2008). Rappelons que cet acide phénolique a été identifié dans le chromatogramme du jus.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Kahloula et *al.*, (2013); qui ont rapporté que le plomb augmente significativement le temps d'immobilité dans le test de nage forcée (FST). Mantovani et *al.*, (1999); ont montré que dans le test de nage forcée, le plomb peut exercer son action inhibitrice directement ou indirectement du complexe récepteur NMDA. L'activité antidépressive est liée à la réduction du temps d'immobilité des médicaments (Wolak et *al.*, 2013). L'extrait d'écorce de grenade peut améliorer le temps d'immobilité en modulant le complexe NMDA -récepteur.

Flora et Seth, (2000), ont constaté que le plomb s'accumule dans toutes les régions du cerveau et particulièrement au niveau de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent fortement que les effets du plomb sur les récepteurs NMDA (NMDAR) pourraient être la base des déficits induits par le plomb dans la fonction cognitive (Nihei et *al.*, 2000).

Le dysfonctionnement du récepteur NMDA (NMDAR) semble jouer un rôle crucial dans plusieurs troubles majeurs du système nerveux, y compris les lésions cérébrales ischémiques, les maladies neurodégénératives chroniques, la douleur, la dépression et la schizophrénie. L'hyperactivité ou l'hypofonction des NMDAR pourraient contribuer à la physiopathologie de ces maladies (Zhou et Sheng, 2013).

Le test de nage forcée est une technique couramment employée pour suggérer un état dépressif chez les animaux, puisque certains aspects de la dépression humaine s'accordent avec l'immobilité comportementale des rats pendant la nage forcée (Porsolt et *al.*, 1977).

Résultats et Discussion

Le jus de grenade améliore l'état dépressif des souris empoisonnées par le plomb, probablement par modulation des fonctions NMDA. Ces modifications comprennent un temps d'immobilisation faible dans le test de nage forcée (Vieyra-Reyes et *al.*, 2008). Ainsi, l'effet antidépresseur du jus peut être dû à son contenu en flavonoïdes élevés. Un régime riche en flavonoïdes et en vitamines peut aider à réduire l'anxiété et la dépression (Mallick et Khan, 2015).

D'autre part, certains auteurs ont rapporté que la quercétine un flavonoïde qui a été détecté dans le chromatogramme du jus de grenade peut diminuer le niveau d'anxiété et de dépression (Aguirre-Hernández et *al.*, 2010) et a également démontré une relation entre les effets de la quercétine et les récepteurs GABA dans le système nerveux centrale (Goutman et Calvo, 2004).

Nos résultats démontrent clairement qu'une supplémentation quotidienne par le jus de grenade atténue de façon significative le niveau d'anxiété, la dépression et corrige l'hyperactivité locomotrice chez les souris exposées au plomb. alors que l'extrait méthanolique issu d'écorce de grenade s'est montré moins efficace dans l'évaluation des paramètres neurologiques.

La détermination du plomb par spectrophotomètre atomique a montré un niveau de plomb élevé dans le cerveau. La capacité du plomb à traverser la barrière hémato-encéphalique est due en grande partie à sa capacité à se substituer aux ions calcium. Dans le cerveau, les dommages induits par le plomb dans le cortex cérébral préfrontal, l'hippocampe et le cervelet peuvent entraîner divers troubles neurologiques, tels que des lésions cérébrales, un retard mental, des troubles du comportement, des lésions nerveuses et possiblement la maladie d'Alzheimer et Schizophrénie (Sanders et *al.*, 2009).

Dans cette étude, la teneur élevée en polyphénols dans le jus et l'écorce a diminué le plomb dans le cerveau et qui peut en partie expliquer son effet protecteur. Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques végétaux secondaires avec des propriétés antioxydantes et chélatantes significatives. Des groupes hydroxyles multiples confèrent à la molécule une activité antioxydante, chélatante et pro-oxydante substantielle (Heim et *al.*, 2002).

Résultats et Discussion

Les grenades contiennent des niveaux très élevés de substances polyphénoliques antioxydantes par rapport aux autres fruits et légumes. Les polyphénols se sont révélés neuroprotecteurs dans différents systèmes modèles (Hartman *et al.*, 2005).

La quercétine et l'hespéridine identifiées sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique et d'y exercer leurs effets neuroprotecteurs grâce leur lipophilie et leurs interactions avec les transporteurs d'efflux (Youdim *et al.*, 2003; Youdim *et al.*, 2004). Les tanins mis en évidence par les réactions de caractérisation dans le jus et dans l'écorce sont des polyphénols avec une excellente capacité de liaison avec les métaux. Pekdemir *et al.*, (2000) ont montré que l'acide tannique dans des conditions *in vitro* est un chélateur très efficace pour le plomb. Des tests sur des souris ont montré que dans des conditions *in vivo* l'acide tannique inhibe efficacement l'absorption du Pb. L'affinité de l'acide tannique pour les métaux lourds est suggérée comme une raison de cet effet protecteur (Peaslee et Einhellig, 1977).

Les transaminases sont des biomarqueurs de la fonction hépatique. En général, l'élévation des transaminases dans le sang est un indice de dommage des cellules parenchymateuses du foie (Gowda *et al.*, 2009). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Ibrahim *et al.*, (2012) et Hamdy et El-Tantawy, (2016) qui ont montré que l'ingestion du plomb stimulait fortement l'activité de l'AST et de l'ALT. Ces observations sont en accord avec une étude antérieure réalisée par Wardani *et al.*, (2017), qui ont rapporté que le plomb a un effet hépatotoxique. Ces auteurs ont conclu que le stress oxydatif jouerait un rôle important dans les lésions hépatiques induites par l'acétate de plomb

Le taux élevé de TGP et de TGO dans le sang indique une lésion hépatique et peut être expliquer par la fuite de ces enzymes du tissu vers le sang suite à une l'altération de la perméabilité membranaire ou de nécrose hépatocellulaire causée par le plomb (Deepmala *et al.*, 2013). Le traitement par le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade a protégé et stabilisé la membrane des cellules hépatiques et a limité la fuite de ces enzymes.

A ceci s'ajoute une hypercalcémie significative qui a été observée chez le groupe qui a reçu le plomb par rapport au groupe témoin. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Houari, (2015) qui a noté un taux de calcium sanguin significativement élevé chez des rats intoxiqués par le plomb durant 21 jours. Cette augmentation significative du calcium dans le sang induite par l'acétate de plomb peut être due à une altération de la fonction rénale ou à une action inhibitrice du plomb sur le transport des cations dans les tissus des rats (Staessen *et al.*, 1990).

Résultats et Discussion

La toxicité au plomb est multifactorielle et interrompt directement l'activation enzymatique, inhibe compétitivement l'absorption des traces minérales, se lie aux protéines sulfhydryl (interrompant la synthèse des protéines structurales), altère l'homéostasie du calcium et abaisse le niveau des réserves disponibles d'antioxydants sulfhydryl corps (Lyn, 2006; Anusuya et Kiran, 2012). Le traitement par le jus et l'écorce de *Punica granatum* n'a pas causé une altération du niveaux de Ca^{+2} comparativement au groupe témoin.

La toxicité au plomb affecte la structure histologique normale du cerveau et provoque des perturbations dans les fonctions normales exercées par elle. Clasen et *al.*, (1974) ont signalé un œdème cérébral, des modifications musculaires et une atrophie cérébelleuse focale impliquant des cellules granulaires et de Purkinje et une dégénérescence neuronale à la suite d'une encéphalopathie au plomb dans le cerveau du rat.

Des coupes transversales au niveau du cerveau réalisés par Sidhu et Nehru, (2004) ont montré une dégénérescence des neurones, une perturbation de l'arrangement normal des couches cellulaires, des cellules plus grandes avec de grands espaces vasculaires autour d'eux.

Plusieurs études ont révélé que les composés phénoliques des végétaux pourraient diminuer l'accumulation des métaux lourds dans les tissus (Hu et *al.*, 2008; Xia et *al.*, 2010; Amudha et Pari, 2011).

Dans ce contexte; les dommages cellulaires induits par le plomb, dans le travail actuel, peuvent être attribués à sa capacité à générer des espèces oxygénées réactives qui endommagent les tissus en augmentant la peroxydation lipidique et une diminution des enzymes antioxydants tels que la glutathion réductase, la glutathion-S-transférase, la superoxyde dismutase et la catalase, ainsi que des antioxydants non-enzymatiques tels que les groupes sulfhydryle totaux comme rapporté par El-Missiry, (2000).

La peroxydation lipidique et la rupture des lipides avec la formation de composés réactifs peuvent conduire à des changements dans la perméabilité et la fluidité de la bicouche lipidique membranaire et peuvent altérer considérablement l'intégrité cellulaire (Barrera, 2012).

Le plomb est connu pour produire des dommages oxydatifs dans le foie en provoquant la peroxydation des lipides membranaires, un processus délétère réalisé exclusivement par les radicaux libres (Paul et *al.*, 2013).

Résultats et Discussion

Nos résultats ont montré une augmentation des enzymes de la fonction hépatique confirmée par les lésions observées au niveau du foie par microscopie photonique. Ces enzymes sont habituellement élevées en cas d'hépatotoxicité aiguë ou de lésions hépatocellulaires légères, mais tendent à diminuer avec une intoxication prolongée due à des lésions hépatiques (Nwanjo et *al.*, 2006; Cornelius, 1979).

L'architecture du foie a été endommagée après 90 jours d'exposition à l'acétate de plomb. L'observation d'une section hépatique d'un rat ayant reçu 0,13% d'acétate de plomb dans l'eau potable pendant 4 semaines par Ahmed et *al.*, (2014) a montré une légère infiltration avec des cellules inflammatoires près de la veine centrale congestionnée et vacuolisation des hépatocytes. Nos résultats vont de pair avec Pal et *al.*, (2013) qui ont signalé que le plomb a causé un dysfonctionnement hépatique et une mort cellulaire dans le foie.

L'exposition au plomb produit une alternance histologique dans le foie, y compris la nécrose focale avec vacuolisation des hépatocytes, gonflement, infiltration leucocytaire, noyaux pyknotiques, dilatation de la veine centrale et des sinusoides (Sharma et *al.*, 2010). En général, l'infiltration cellulaire dans le tissu hépatique suggère en particulier une abondance des leucocytes et des lymphocytes qui sont une réponse importante des tissus face à tous les impacts nuisibles (Sharma et *al.*, 2011).

Nos extraits ont légèrement restauré la structure des hépatocytes avec une diminution des marqueurs de la fonction hépatique ce qui leur confère une activité hépatoprotectrice. Ceci confirme l'étude qui a été réalisée par Abdalla et *al.*, (2016) qui ont prouvé que l'extrait aqueux de grenade a une activité hépatoprotectrice et antioxydante car il a la capacité de réduire les dommages oxydatifs hépatiques. Dans une étude effectuée par Jamshidzadeha et *al.*, (2012) a montré que la consommation régulière du jus de grenade possède des activités biologiques variées et pourrait être potentiellement utile pour la prévention des maladies dégénératives chroniques du foie.

La grenade a un effet préventif contre les maladies humaines dû à ses ingrédients actifs comme les tanins, les polyphénols et les flavonoïdes (Hajimahmoodi et *al.*, 2013), ces composés se retrouvent en quantités importantes dans l'écorce, le jus et l'huile des graines des fruits de la grenade (Abdel Moneim et *al.*, 2013). Le jus de grenade qui a fait objet de notre étude peut réduire le stress oxydatif des macrophages, les radicaux libres et la peroxydation des lipides. De plus, il empêche la croissance cellulaire et induit l'apoptose, ce qui peut conduire à des effets anticancérigènes via les ellagitanins (Zarfeshany, et *al.*, 2014).

Résultats et Discussion

Plusieurs altérations rénales ont été observées dans les sections des reins des souris intoxiquées par le plomb. Les reins étant la principale voie d'excrétion du plomb, cet organe est particulièrement exposé à ses effets toxiques (Khan et *al.*, 2008). Les espèces réactives d'oxygène sont les initiateurs des dommages par oxydation des membranes (Sandhir et *al.*, 1994) ce qui entraîne une altération de la fonction membranaire et son intégrité structurale, la diminution de la fluidité, l'inactivation d'un certain nombre d'enzymes liées à la membrane (El-Beltagi et Mohamed, 2013)

Les souris ayant reçues le jus de grenade ont présenté une architecture tissulaire rénale améliorée par rapport aux intoxiquées et par rapport à celles qui ont été traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade. Ahmed et Eid-Ali, (2010) ont conclu que l'extrait de d'écorce de grenade est un agent néphro-préventif puissant et ceci est attribué à sa forte teneur en polyphénols.

Les résultats de la coloration hématoxyline et éosine du tissu rénal et hépatique de cette étude sont en accord avec les résultats de Aksu et *al.*, (2017) qui ont trouvé que le jus de grenade a réduit le stress oxydatif en diminuant la peroxydation lipidique, a amélioré les activités des enzymes antioxydantes et les dommages cellulaires induits par le plomb dans les tissus du rein et du foie chez le rat.

Plusieurs études précliniques ont démontré le rôle protecteur de la grenade dans la néphrotoxicité induite par le chlorure de mercure (Boroushaki et *al.*, 2014), la gentamicine (Cekmen et *al.*, 2013), le tétrachlorure de carbone (Abdel Moneim et El-Khadragy, 2013) et l'hépatotoxicité induite par l'arsenic (Shafik et El Batsh, 2016).

Dans une étude menée par Nirwane et *al.*, (2014) a montré que *P. granatum* possède une activité néphroprotectrice qui peut être attribuable à ses flavonoïdes (anthocyanidines), ayant un potentiel préventif dans le traitement des troubles rénaux.

ALUMINIUM

2.2 Aluminium

2.2.1 Evolution pondérale

La croissance pondérale des souris est montrée dans le tableau 13. Les souris intoxiquées par l'aluminium possède une évolution pondérale semblable à celle des souris intoxiquées par l'aluminium et traitées par le jus de grenade ($P > 0.05$). Les souris qui ont été traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade ont une évolution pondérale comparable à celle des témoins ($P > 0.05$).

Tableau 13. Effet de du chlorure d'aluminium sur le poids corporels durant 12 semaines d'expérimentation. Le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg). Le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. * $P < 0,05$.

	Evolution pondérale (g) / Lots expérimentaux			
	C	AL	AL-J	AL-E
Semaine 1	20,78 ± 1,31	17,23±0,60	17,5±0,53	18,83±0,53
Semaine 4	30,32 ± 2,74	26,95±3,30	28,64±2,91	28,4±2.91
Semaine 8	34,54 ± 2,87	31,48±2,63	31±0,58	33,44±0.58
Semaine 12	36,18 ± 3,09	31,57±2,46	32,22±0,94	33,68±0.94

2.2.2 Solution consommée

L'aluminium entraine significativement une diminution du volume d'eau consommée par rapport au témoins ($P < 0.05$). Le volume d'eau consommé par les souris traitées par les extraits de grenade est plus important que les souris qui ont reçu l'aluminium ($P > 0.05$) (Tableau 14).

Tableau 14. Effet de du chlorure d'aluminium sur la consommation de l'eau de boisson durant 12 semaines d'expérimentation. Le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg). Le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. * P < 0,05.

Solution consommée en ml / Lots expérimentaux			
C	AL	AL-J	AL-E
212,77±48,65	152.94±37,94*	164.39±32.43	171.84±25.4

2.2.3 Paramètres neurologiques étudiés

2.2.3.1 Test de comportement

2.2.3.1.1 Test de l'activité locomotrice

L'intoxication chronique par une dose de 500mg/kg du chlorure d'aluminium a augmenté de manière significative le nombre de carrés parcourus par les souris dans toutes les sessions comparativement au groupe témoin. Le traitement par le jus de grenade en même temps qu'une exposition à l'aluminium a protégé les souris des changements induits par ce dernier. La consommation quotidienne du jus de fruit a significativement amélioré l'activité locomotrice dans les trois dernières étapes. De même l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum* a amélioré significativement l'hyperactivité locomotrice provoquée par l'aluminium durant les trois premières phases (Figure 32).

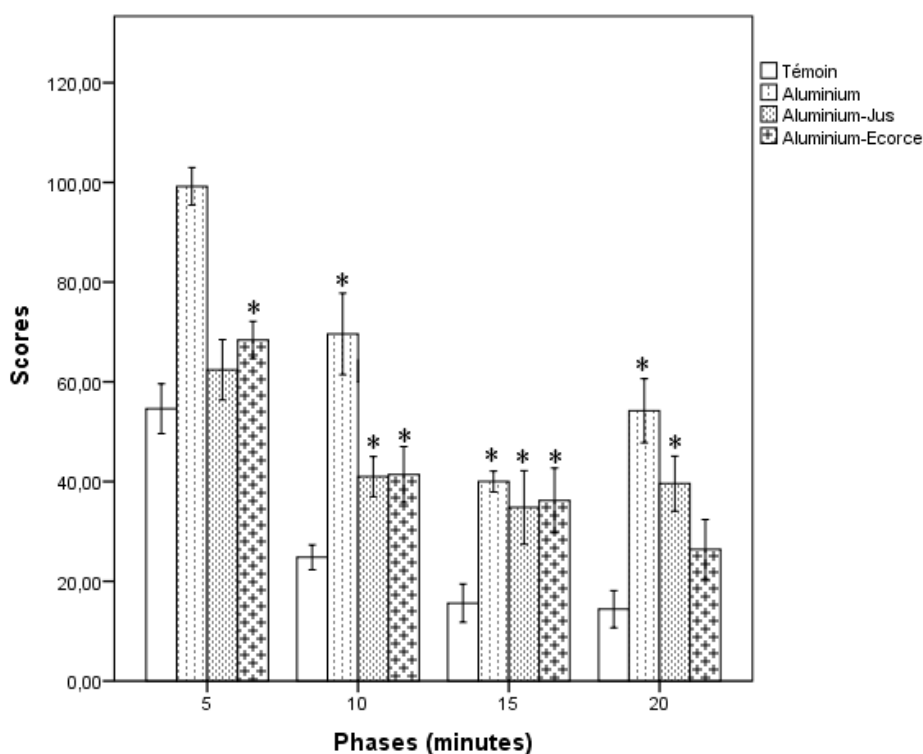


Figure 32: résultats de l'activité locomotrice chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0.05$.

2.2.3.1.2 Test de la nage forcée

Durant le test de Porsolt; le temps d'immobilité enregistré est plus faible chez les souris témoins et significativement plus élevé chez les souris empoisonnées par le chlorure d'aluminium $P < 0,05$. Les souris traitées par le jus de fruit ont enregistré un temps d'immobilité moins important que celui qui ont reçu l'extrait méthanolique de grenade ($P > 0,05$, figure 33).

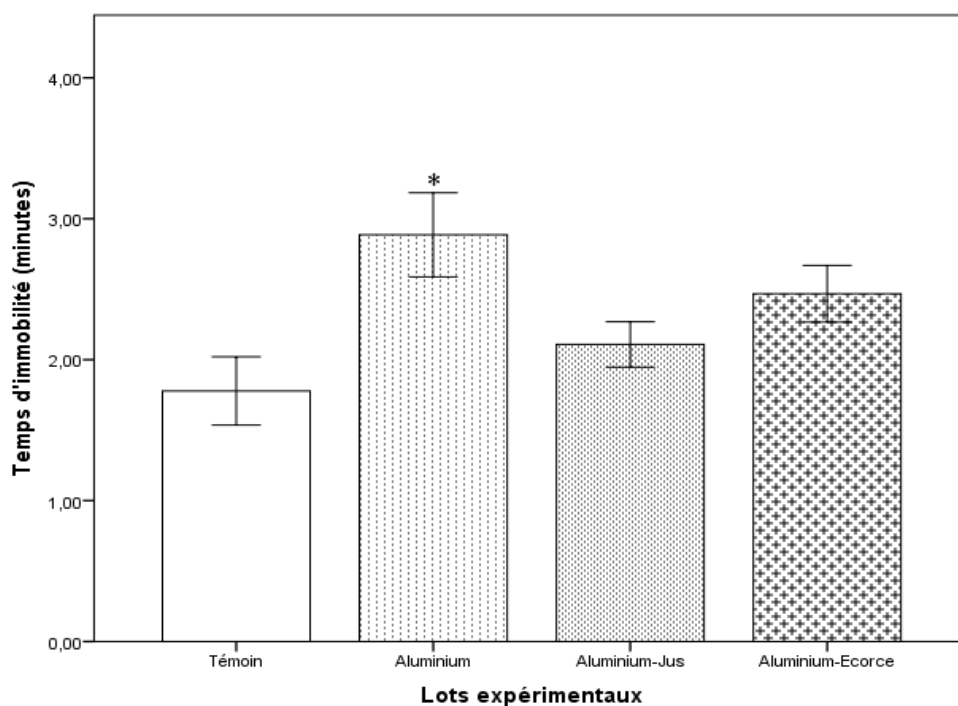


Figure 33: résultats de du test de Porsolt chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * P <0,05.

2.2.3.1.3 Test de la chambre noire/claire

Le temps de résidence dans le compartiment obscur est significativement plus important chez les souris intoxiquées par l'aluminium durant les trois dernières phases. Les souris ayant reçu le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade ont eu un comportement similaire et comparable aux souris témoins $P > 0.05$. Figure 34.

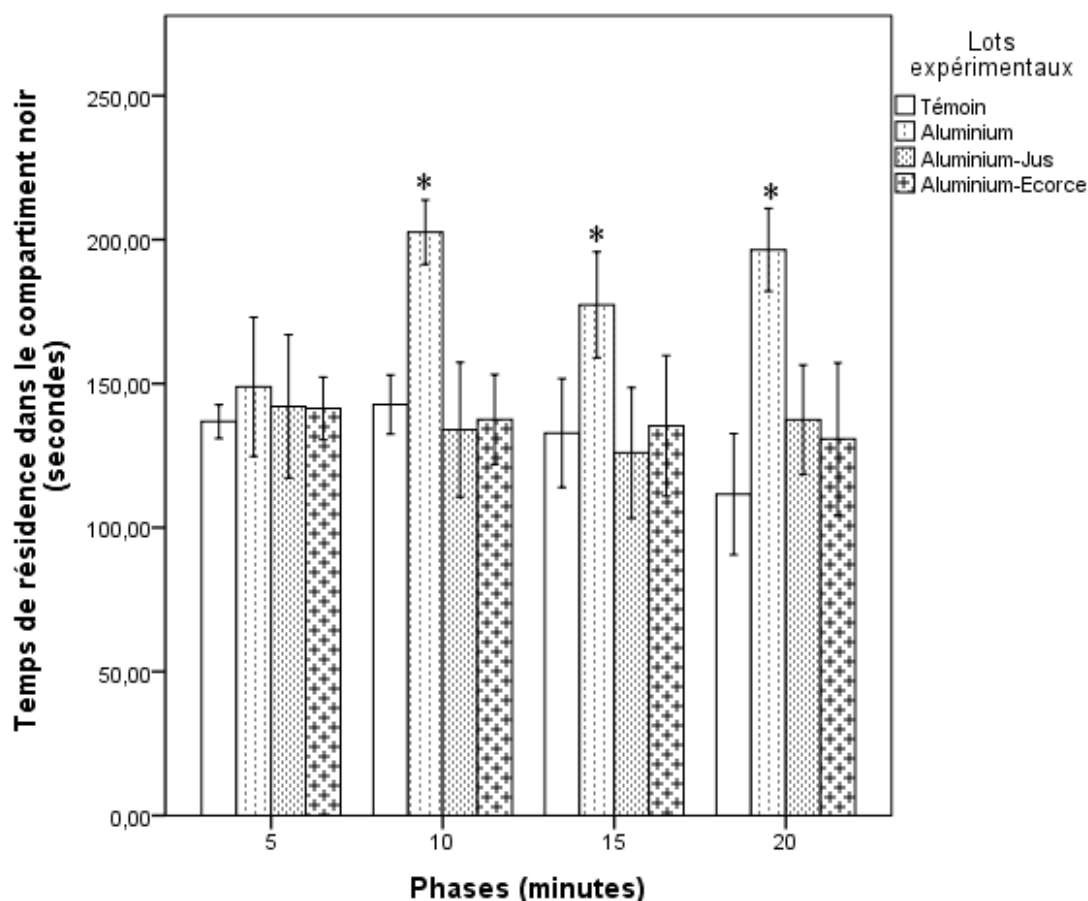


Figure 34: résultats du test chambre noire/clair chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * P < 0,05.

2.2.3.1.4 Test de labyrinthe en croix sur élevé

Le traitement par le jus de grenade a significativement augmenté le temps passé sur le bras ouvert par rapport au groupe témoin et intoxiqué ($P < 0,05$). Les souris recevant 500mg/kg de chlorure d'aluminium pendant 90 jours ont montré une préférence plus faible pour le bras ouvert. Nos données montrent également que le niveau d'anxiété était significativement réduit chez les souris empoisonnées recevant quotidiennement le jus de grenade. De même les souris ayant reçu une supplémentation journalière en extrait méthanolique d'écorce de grenade mais de manière non significative $P > 0,05$ (Figure 35).

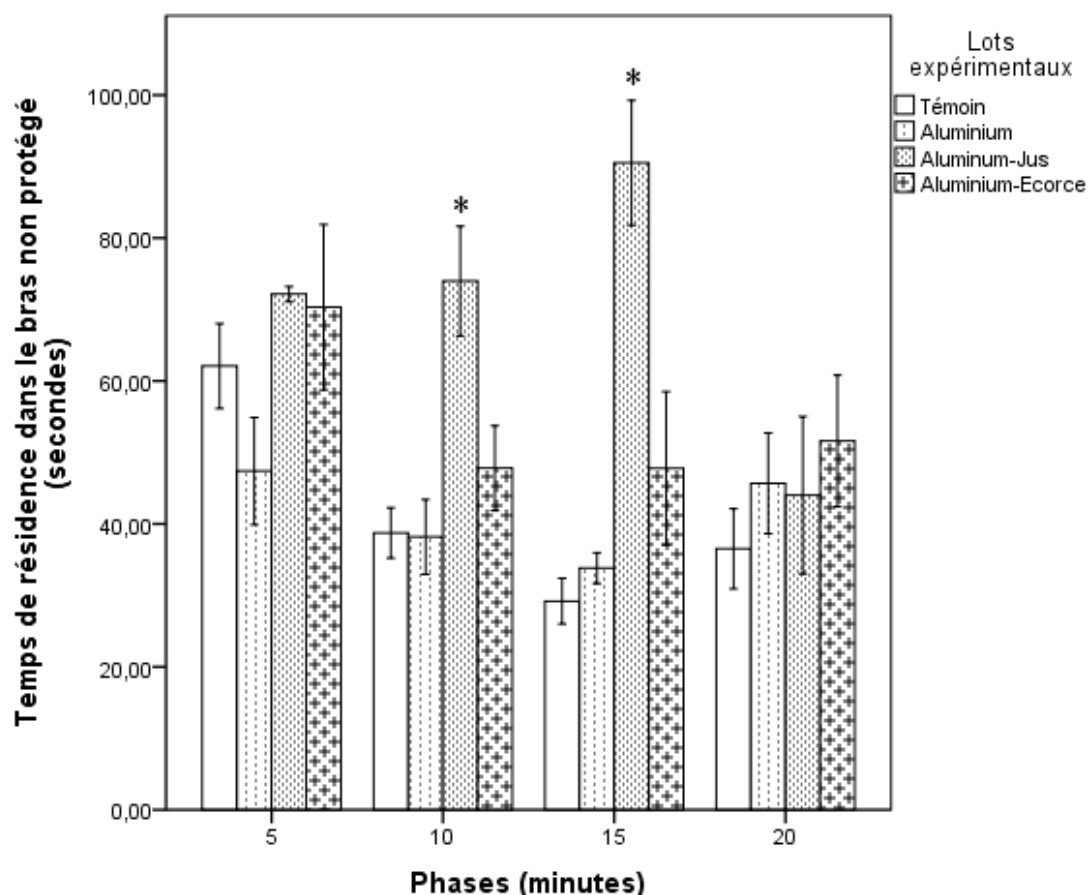


Figure 35: résultats du test de labyrinthe en croix sur élevé chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.2.3.1.5 Test de curiosité

Le jus de grenade a significativement augmenté le nombre d'immersion de la tête des souris par rapport celui des souris témoins durant la première étape. Le groupe témoin et les souris intoxiquées traitées avec le jus ont un nombre d'immersion de la tête presque identique dans les 2 dernières phases $P > 0,05$. Les souris empoisonnées par l'aluminium sont moins curieuses dans les 3 phases. Les souris intoxiquées traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de *Punica granatum* ont un nombre de trous explorés identique à celui des souris ayant reçu exclusivement l'aluminium. Le nombre de trous explorés est réduit dans les deux dernières étapes pour tous les groupes (Figure 36).

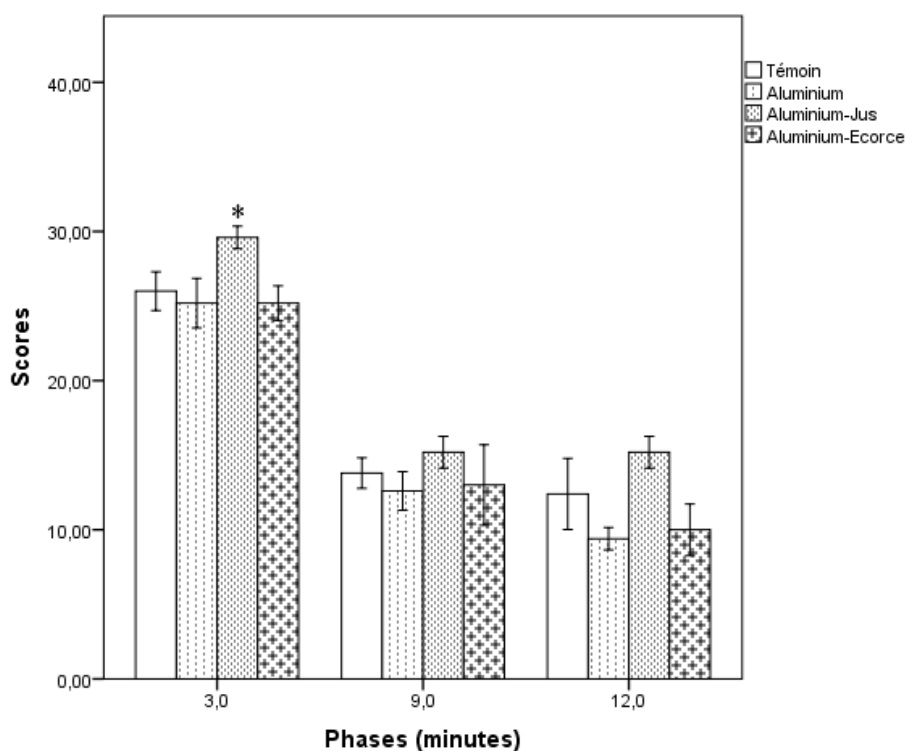


Figure 36: résultats du test de curiosité chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.2.3.2 Tests de mémoire

2.3.2.2.1 Test de labyrinthe de Morris

Le test du labyrinthe de Morris a été utilisé pour évaluer la capacité cognitive des souris. Les animaux intoxiqués par Al ont montré une augmentation significative ($P < 0,05$) du temps pour trouver la plateforme du premier jusqu'à 5^{ème} jour par rapport au groupe témoin et au groupe intoxiqué traité par le jus. L'apprentissage des souris empoisonnées qui ont reçu le jus de fruit et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade pendant les 5 jours passent moins de temps à trouver la plateforme (Figure 37A).

Chaque jour, le temps pour atteindre la plateforme rendue invisible par une eau opacifiée a été enregistré pour évaluer la performance de l'apprentissage. Les souris ont dû apprendre la position de la plateforme invisible. La présente étude montre que l'intoxication chronique par l'aluminium des souris a entraîné une diminution significative de la

Résultats et Discussion

performance d'apprentissage en comparaison avec le groupe témoin. D'autre part, l'administration chronique de jus de grenade pendant 90 jours après le sevrage améliore significativement les déficiences cognitives des souris exposées à Al. Les souris ayant pris un traitement d'extrait méthanolique d'écorce de grenade concomitant avec l'aluminium prennent moins de temps à trouver la plateforme invisible. Figure 37B.

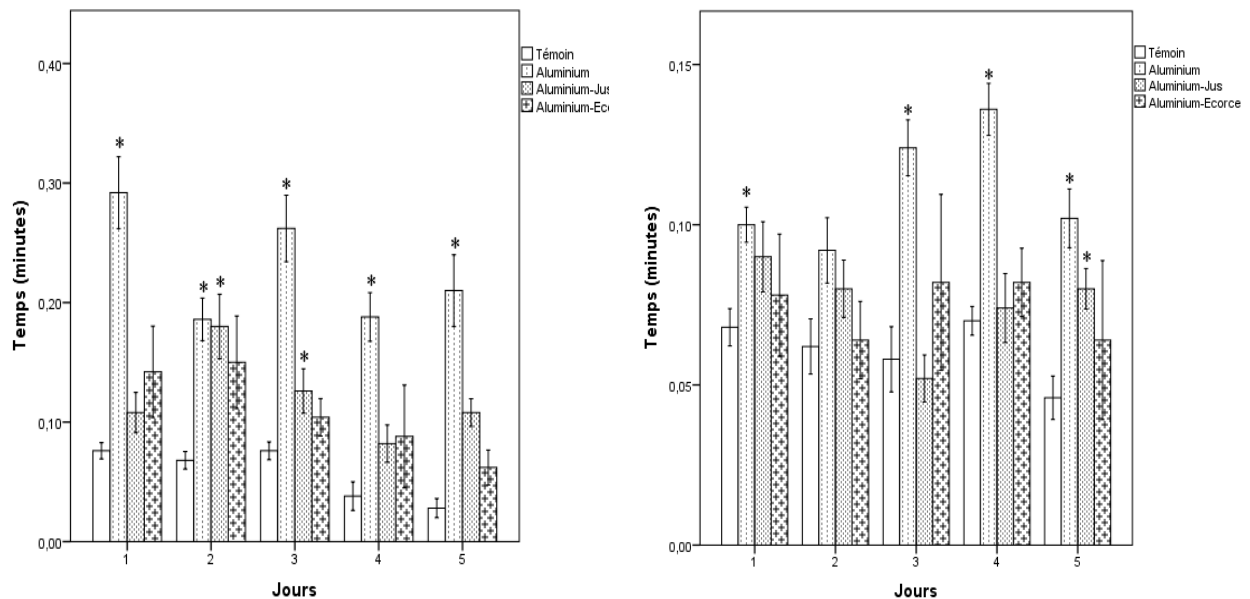


Figure 37: résultats du test de labyrinthe de Morris A) MST B) MSR chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * P < 0,05.

2.2.3.2.2 Test de labyrinthe en 8

Les résultats de mémoire spatiale de travail effectué par un labyrinthe en 8 sont donnés dans la figure 38. Le nombre de bras répétés durant les 5 jours d'apprentissage est important chez les souris intoxiquées par l'aluminium par rapport aux souris témoins. Pour les souris intoxiquées traitées par le jus de fruit le nombre de bras répétés a diminué le 2, 4 et le 5 jours. Les trois groupes expérimentaux ont enregistré un nombre de bras répétés faibles au 5 jours P > 0.05.

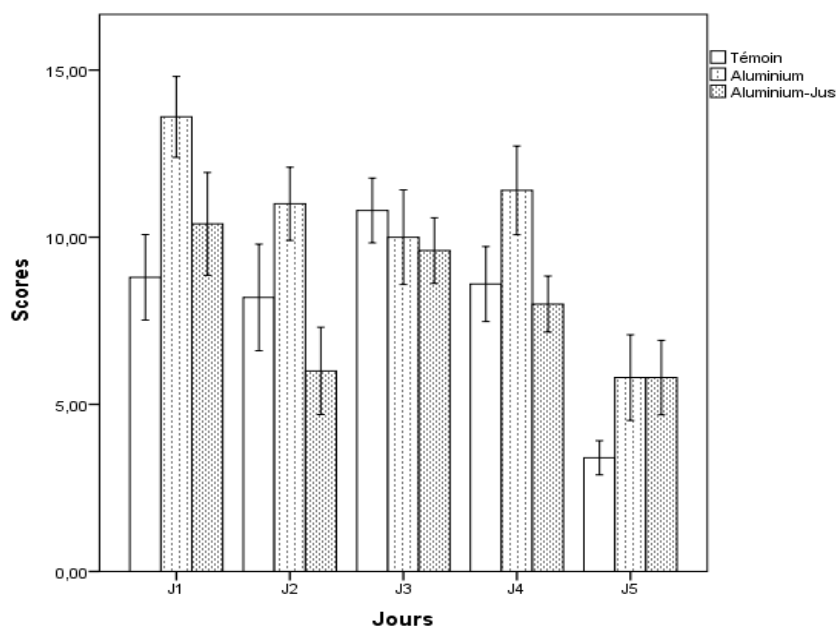


Figure 38: résultats du test de labyrinthe en 8 " Mémoire spatial de travail "chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade; les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) et celle des souris témoins pendant 90 jours. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences \pm SEM; * $P < 0,05$.

2.2.4 Paramètres biochimiques étudiés

2.2.4.1 Dosage de l'aluminium au niveau du cerveau

Après 90 jours d'expérimentation, les résultats montrent que les concentrations cérébrales en aluminium pour le groupe ayant reçu l'aluminium étaient significativement plus élevées que le groupe témoin et le groupe de souris intoxiquées traitées par le jus ce qui confirme que l'aluminium traverse la barrière hémato encéphalique et se concentre au niveau du cerveau. Le jus de grenade diminue significativement le taux d'aluminium dans cet organe ($P < 0,05$) Figure 39.

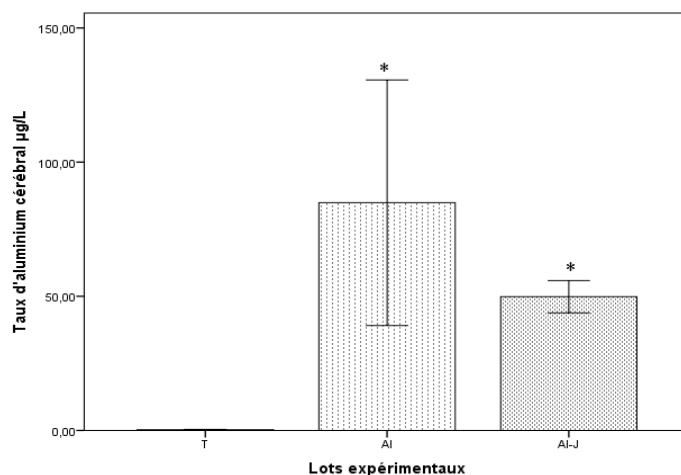


Figure 39: Taux d'aluminium dans le cerveau des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg); le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade.

2.2.4.2 Dosage TGP, TGO, cholestérol et du calcium dans le sang

Le dosage des transaminases TGO et TGP a montré que la fonction hépatique a été altérée suite a une intoxication chronique par l'aluminium chez le groupe AI (TGO; $432,5 \pm 84,14$ U/l; TGP; $220 \pm 125,86$ U/l) par rapport aux souris témoins ($338 \pm 12,73$ U/l; $73,5 \pm 13,43$ U/l). L'administration quotidienne du jus et d'écorce de grenade a permis de diminuer l'activité des transaminases TGP et TGO par rapport aux souris intoxiquées $P > 0,05$ (Tableau 15).

Un taux de cholestérol élevé a été enregistré chez les souris intoxiquées par l'aluminium; ces dernières ont montré les poids les plus faibles durant les 12 semaines d'expérimentation. Notons que les groupes intoxiqués traités ont montré un taux de cholestérol comparable $P > 0,05$ (Tableau 15).

Le dosage du calcium dans le sang a montré une hypocalcémie significative ($79,85 \pm 0,92$) par rapport aux souris témoins ($95,85 \pm 2,9$) $P < 0,05$. Une supplémentation quotidienne en jus et en écorce de grenade a permis de maintenir une taux de calcémie proche des normes (Tableau 15).

Tableau 15: Taux de TGP, TGO, cholestérol et du calcium dans le sang

	Lot (T)	Lot (Al)	Lot (Al-J)	Lot (Al-E)
TGO U/l	338 ± 12.73	432,5 ± 84,14	407,5 ± 24,74	402,5 ± 17,68
TGP U/l	73.5 ± 13.43	220 ± 125,86	79,5 ± 27,58	94 ± 7,07
Chol g/l	0.93 ± 0.02	1,66 ± 0,06*	1.16 ± 0.06*	1,24 ± 0,19
Calcium mg/l	95.85 ± 2.9	79,85 ± 0.92 *	90,3 ± 3.68	103.9 ± 4.38

2.2.5 Etude histologique

2.2.5.1 Tissu nerveux

L'examen histologique du système nerveux a montré un niveau élevé de dégénérescence neuronale et de vacuolisation dans le cortex et l'hippocampe après exposition à l'aluminium dans le groupe intoxiqué par rapport au groupe témoin et traité par le jus. Ce groupe a également révélé un infiltrat inflammatoire et une diminution de la densité cellulaire (Figure 40B). Les dommages neuronaux chez les souris traitées avec le jus de grenade sont peu observés. Aucun signe d'infiltration inflammatoire ou de nécrose dans l'hippocampe et le cortex cérébral des souris intoxiquées traitées par ce jus de fruit n'a été observé par la coloration H & E (Figure 40C). Dans le groupe témoin, la section a été trouvée intacte et aucune perte neuronale n'a été observée (Figure 40A). Pour les souris intoxiquées par l'aluminium et traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade ont montré une structure cellulaire moins améliorée étant donné que la dégénérescence neurale et vascularisation sont importantes et répandues au niveau du cortex cérébral alors que la structure cellulaire de l'hippocampe était mieux conservée et aucun infiltrat inflammatoire n'a été observé (Figure 40 D).

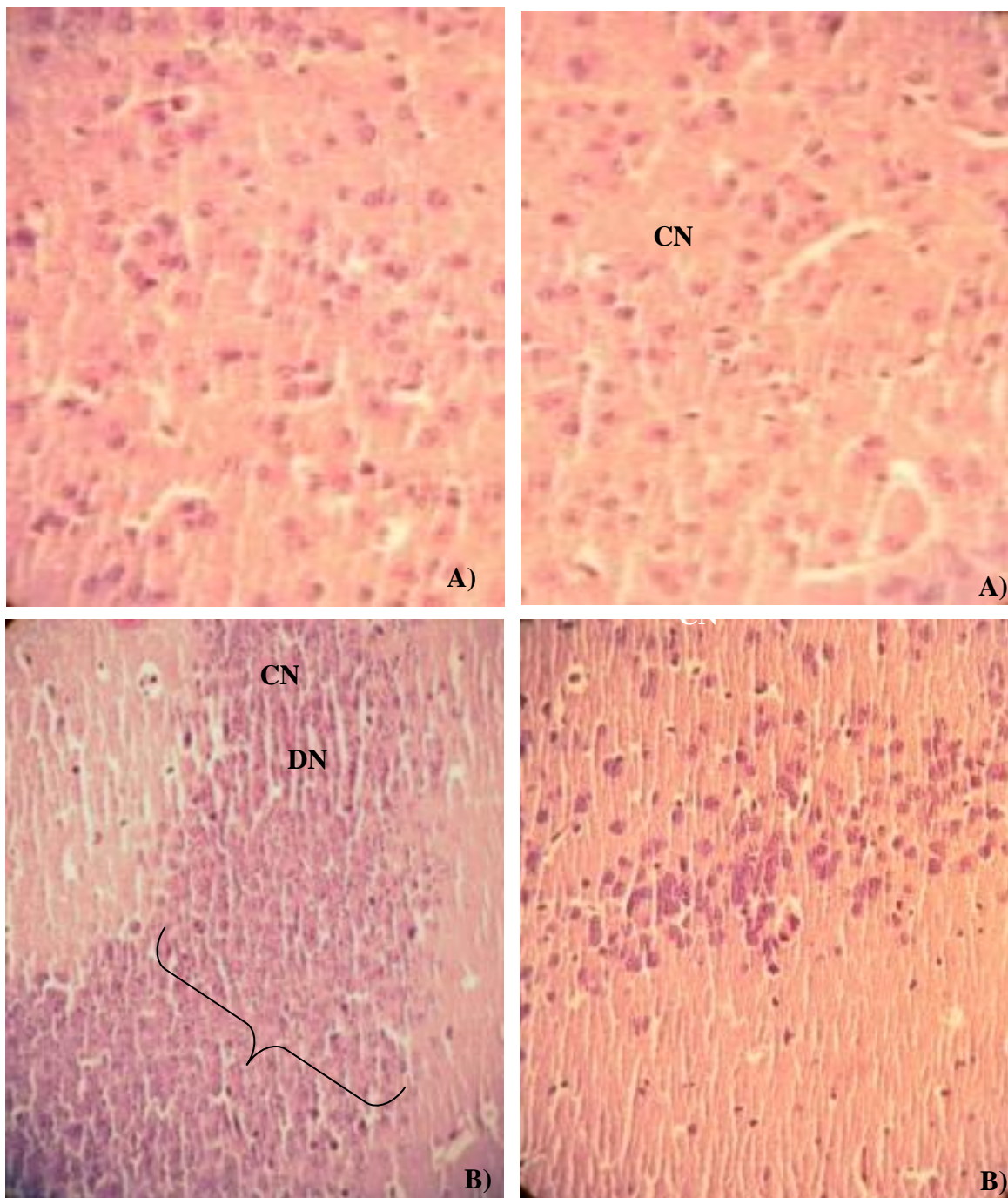


Figure 40A: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez le groupe des souris témoins après 90 jours (G x 400). cellule normale (CN), densité normale (DN)

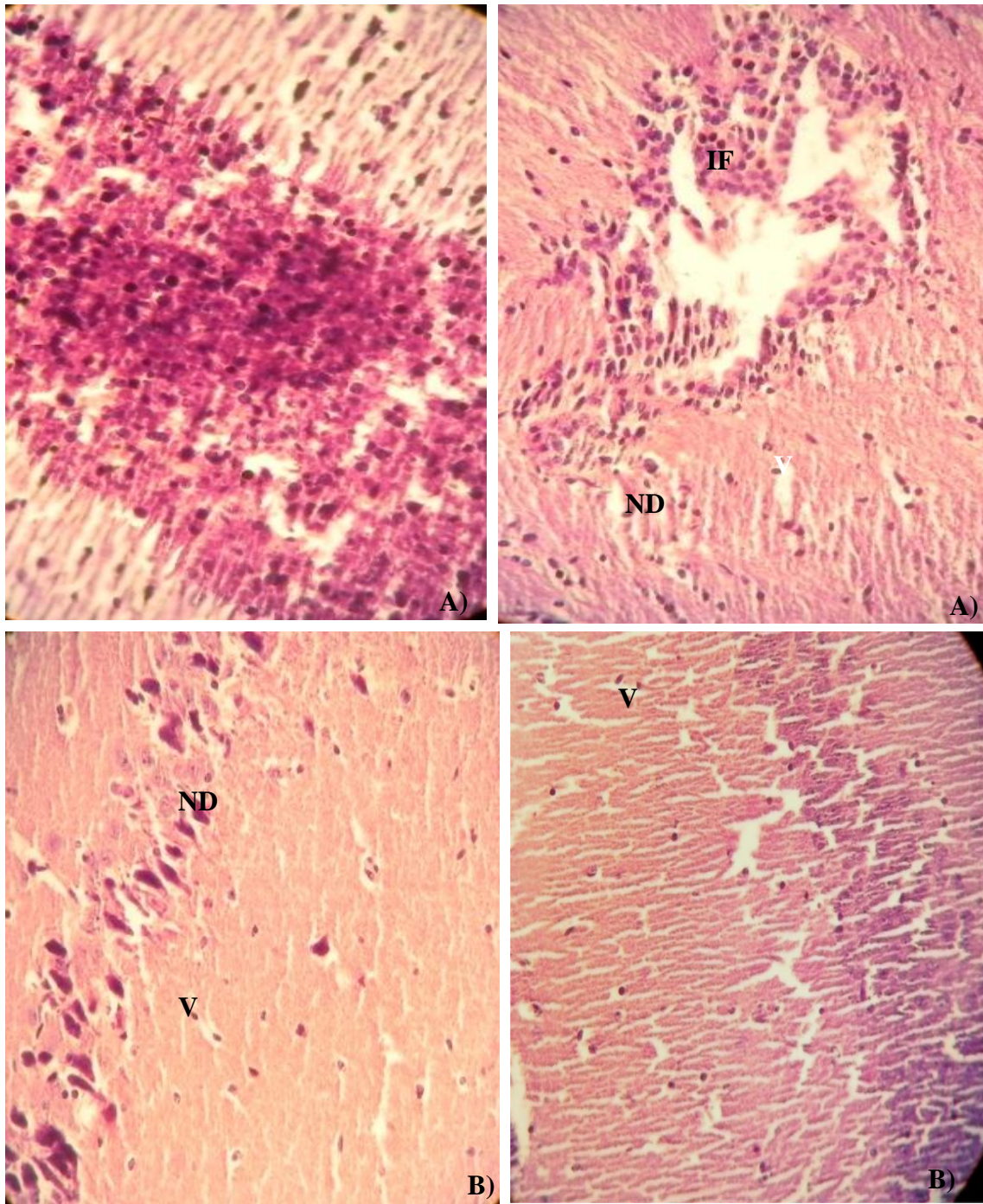


Figure 40B: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) pendant 90 jours. (G x 400). cellule normale (CN), la nécrose (N), l'infiltrat inflammatoire (IF), la dégénérescence neuronale (DN); vacuolisation (V), dépôts amyloïdes (DA).

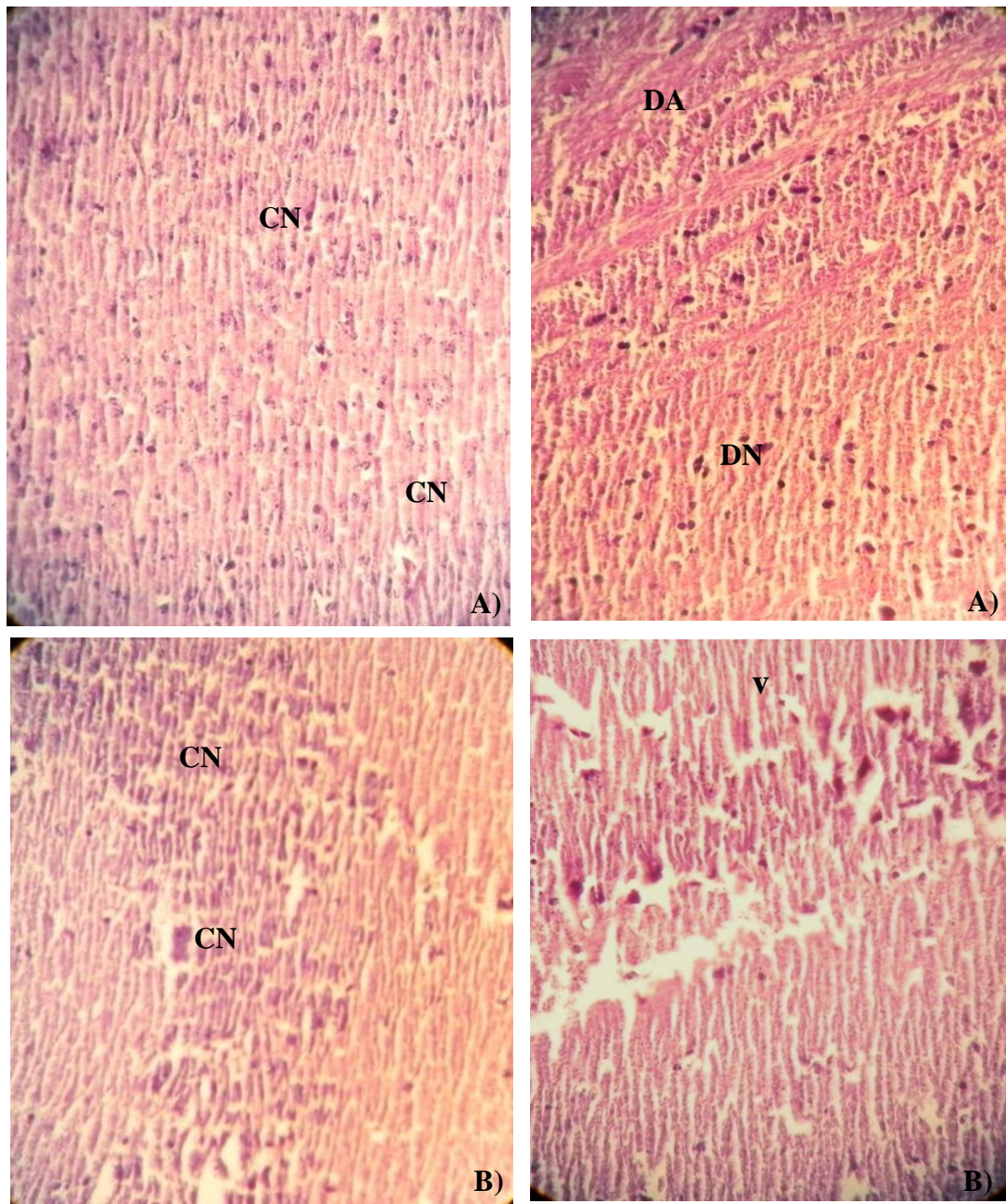


Figure 40C: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez le groupe des souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade pendant 90 jours. (G x 400). cellule normale (CN), la dégénérescence neuronale (DN); vacuolisation (V), dépôts amyloïdes (DA).

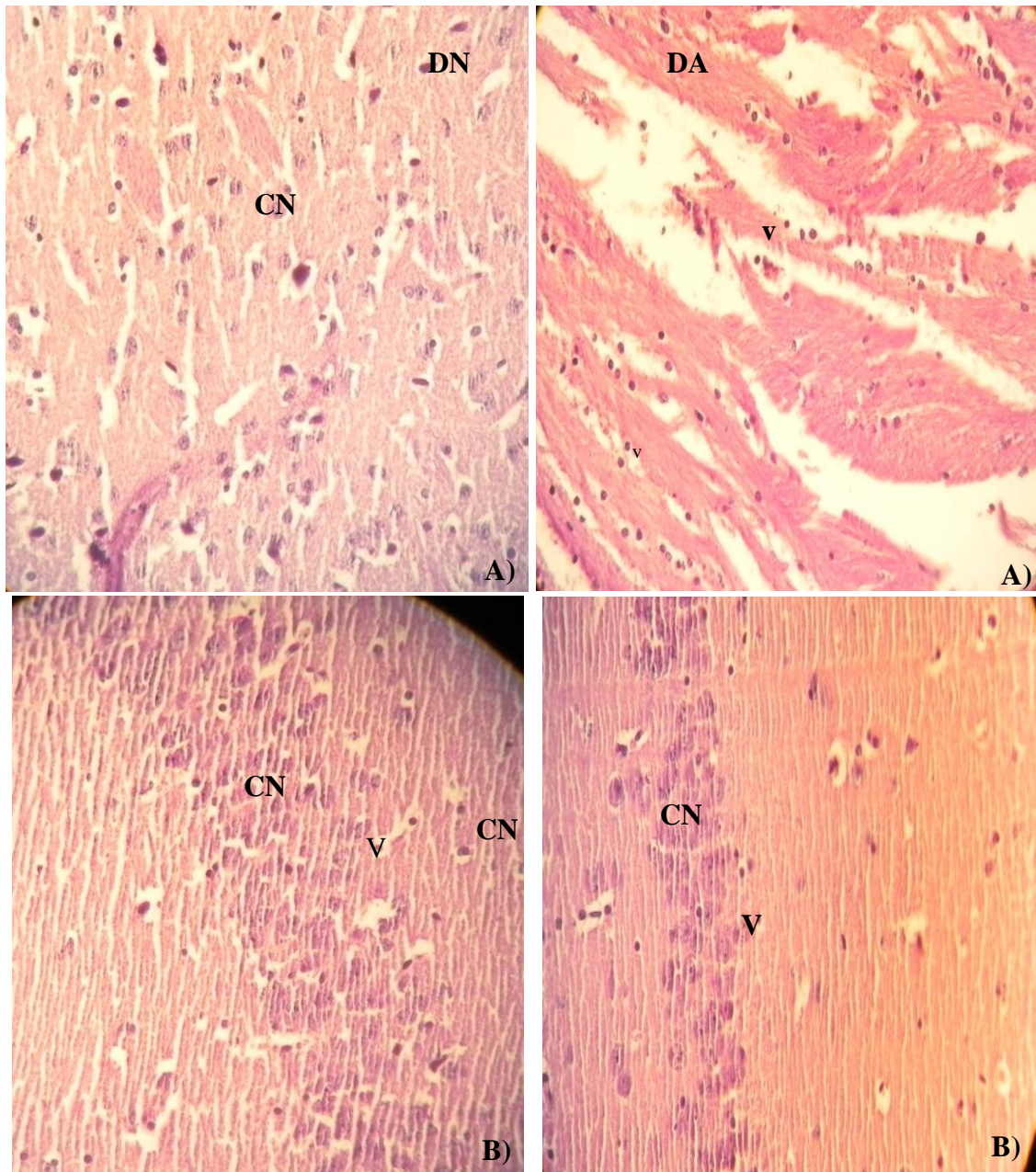


Figure 40D: Etude microscopique du cortex cérébral (A) et de l'hippocampe (B) par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) chez les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours. (G x 400). cellule normale (CN), la dégénérescence neuronale (DN); vacuolisation (V), dépôts amyloïdes (DA).

2.2.5.2 Tissu hépatique

L'architecture hépatique des souris est montrée dans la figure 41. Comme il a été signalé pour l'intoxication au plomb, l'aluminium a provoqué des lésions hépatocytaires avec présence de sinusoides dilatés, ballonnements, des congestions veineuses et des infiltrats inflammatoires moins marqués que le plomb (Figure 41B). Le jus de grenade a permis de conserver une structure cellulaire proche des souris témoins avec absence des infiltrats inflammatoires (Figure 41C). Le nombre de sinusoides chez les souris ayant reçues l'extrait méthanolique d'écorce de grenades sont plus importants que ceux ayant reçues le jus de ce même fruit (Figure 41B).

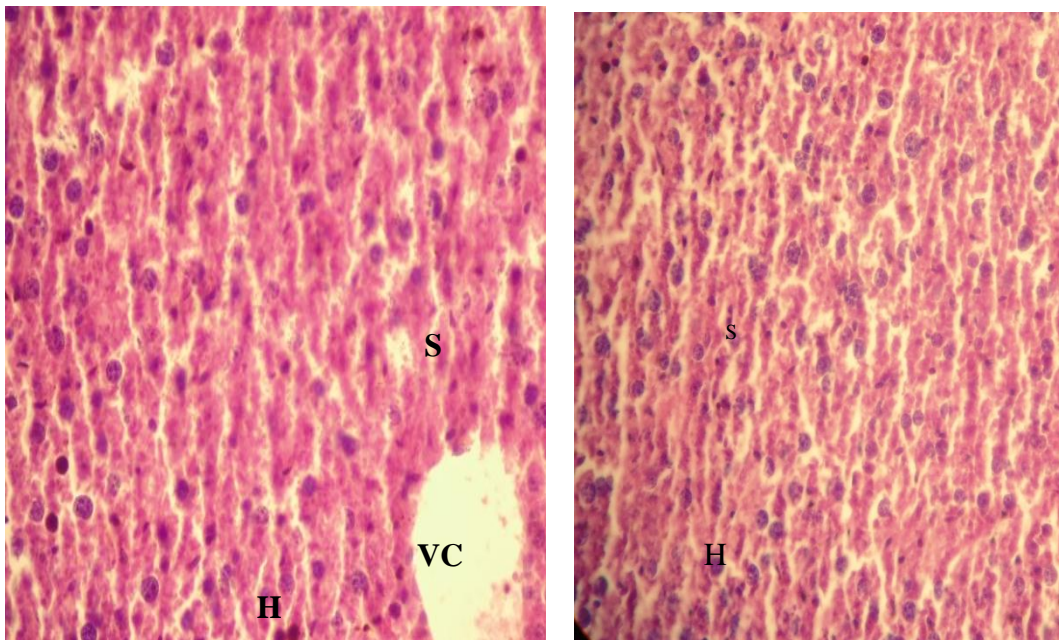


Figure 41A: Etude microscopique du foie par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez le groupe des souris témoins pendant 90 jours. (G x 400). Hépatocyte (H), veine centrolobulaire (VC), sinusoides (S).

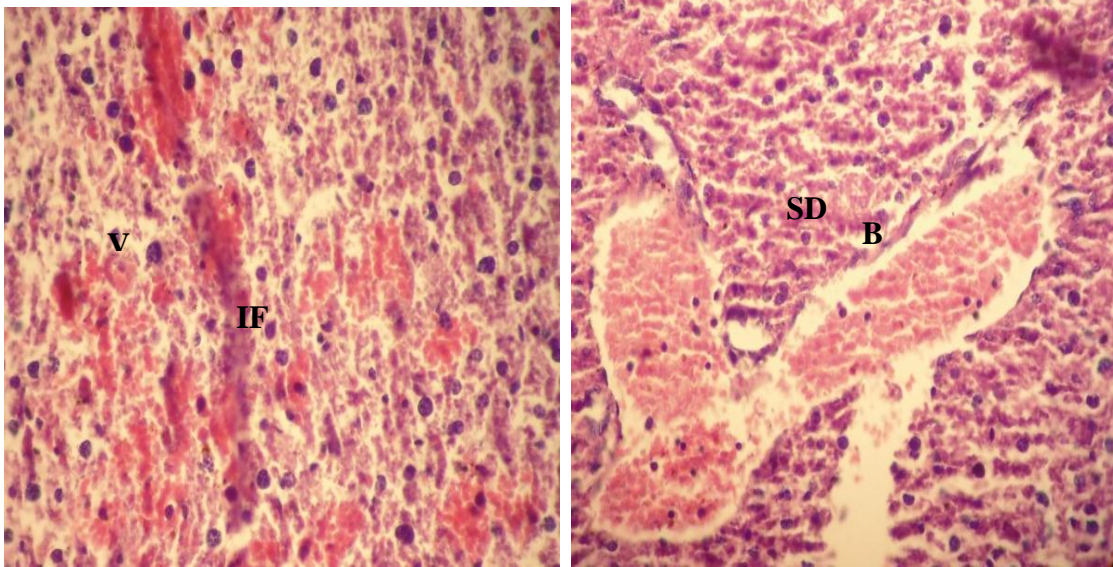


Figure 41B: Etude microscopique du foie par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaire (VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Veine centrolobulaire dilaté (VCD), Ballonisation (B), infiltrat inflammatoire (IF), Congestion vasculaire (CV), Vacuolisation (V),

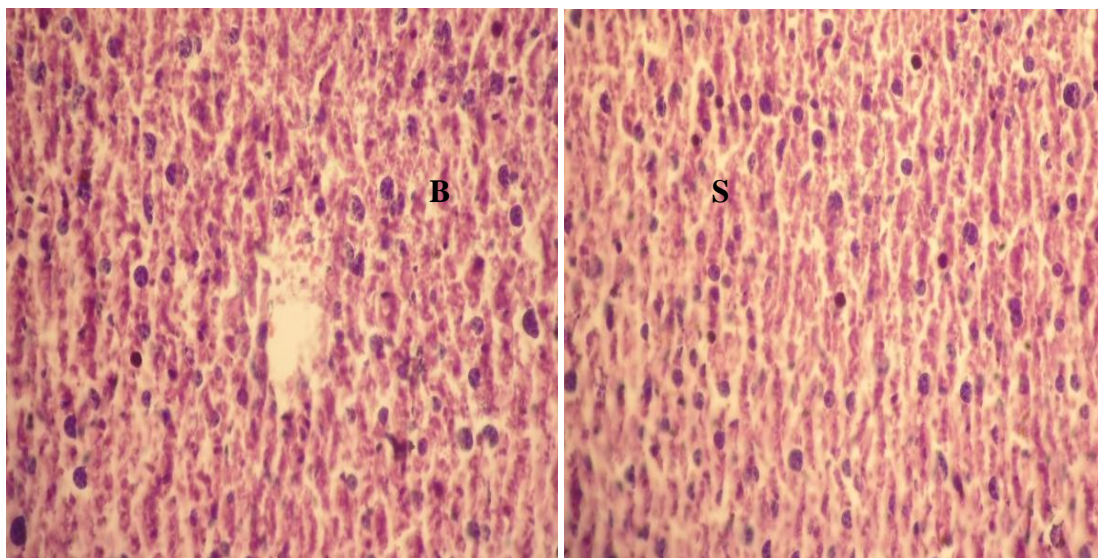


Figure 41C: Etude microscopique du foie par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade (v/v) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaire(VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Ballonisation (B), Vacuolisation (V),

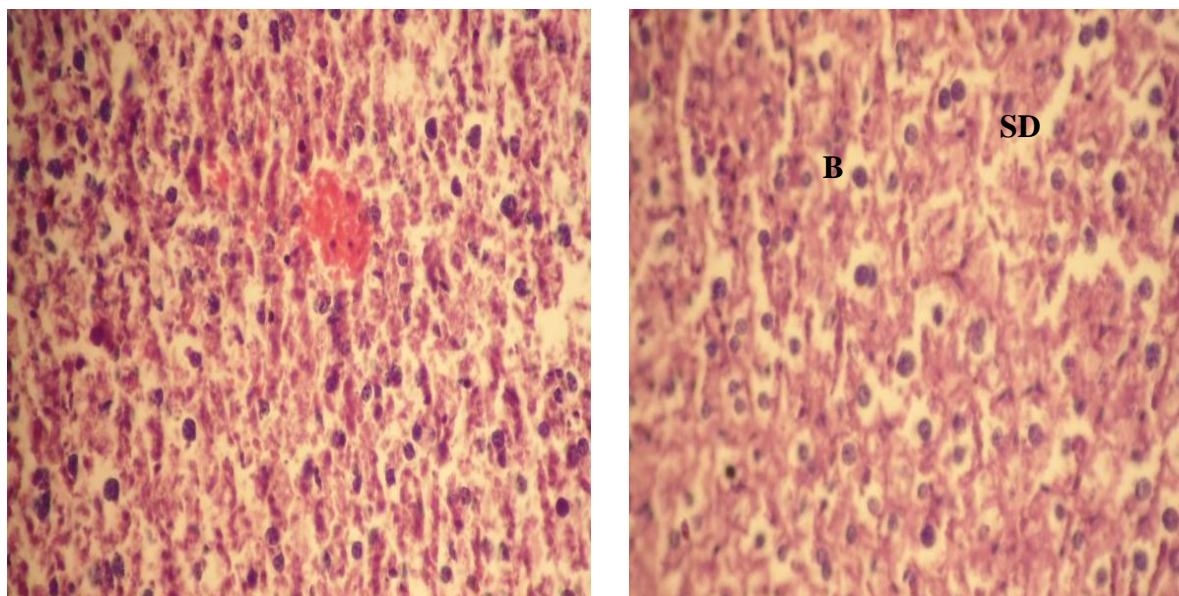


Figure 41D: Etude microscopique du foie par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par le chlorure d'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours (G x 400). Hépatocyte (H), Veine centrolobulaire (VC), Sinusoides (S), Sinusoides dilatés (SD), Ballonisation (B), Vacuolisation (V),

2.2.5.3 Tissu rénal

Les souris témoins montrent des glomérules et des tubules normaux. Les reins du lot intoxiqué par l'aluminium présentent une dilation des tubules rénaux, infiltrat inflammatoire, congestions veineuse (Figure 42B). Le traitement par le jus de grenade a préservé le tissu rénal avec peu de lésion tissulaire avec absence de foyers inflammatoires (Figure 42C). Pour les tissus rénaux des souris ayant reçu l'extrait méthanolique d'écorce de ce même fruit observé au microscope (Gr x 400) ont montré une structure cellulaire assez bien conservée avec présence d'un seul filtrat inflammatoire (Figure 42C).

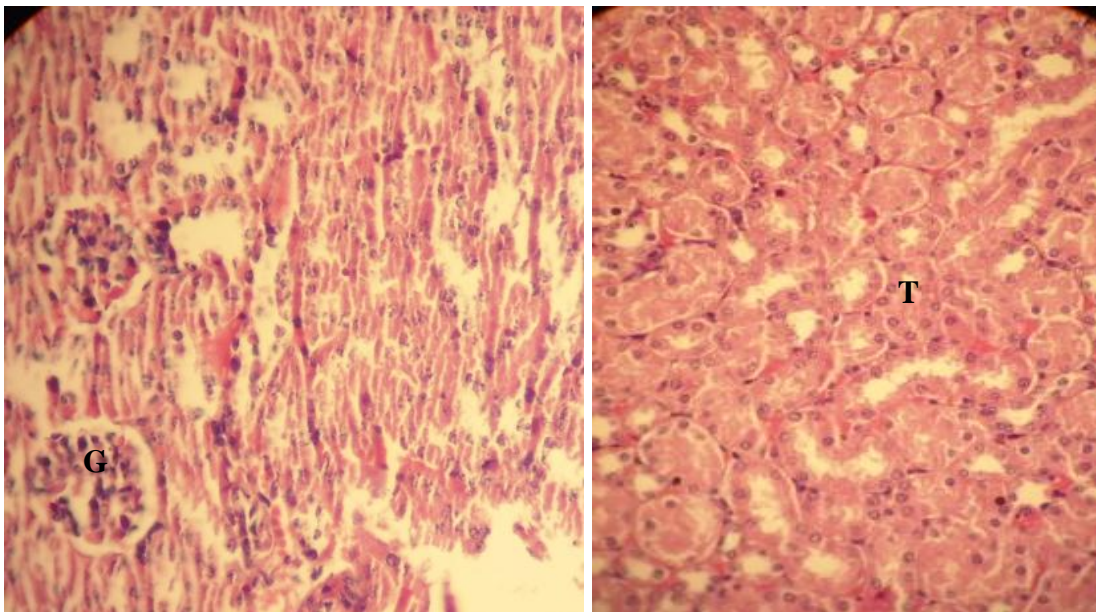


Figure 42A: Etude microscopique du rein par coloration de l'hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris témoins (G x 400). glomérule (G); Tubule (T).

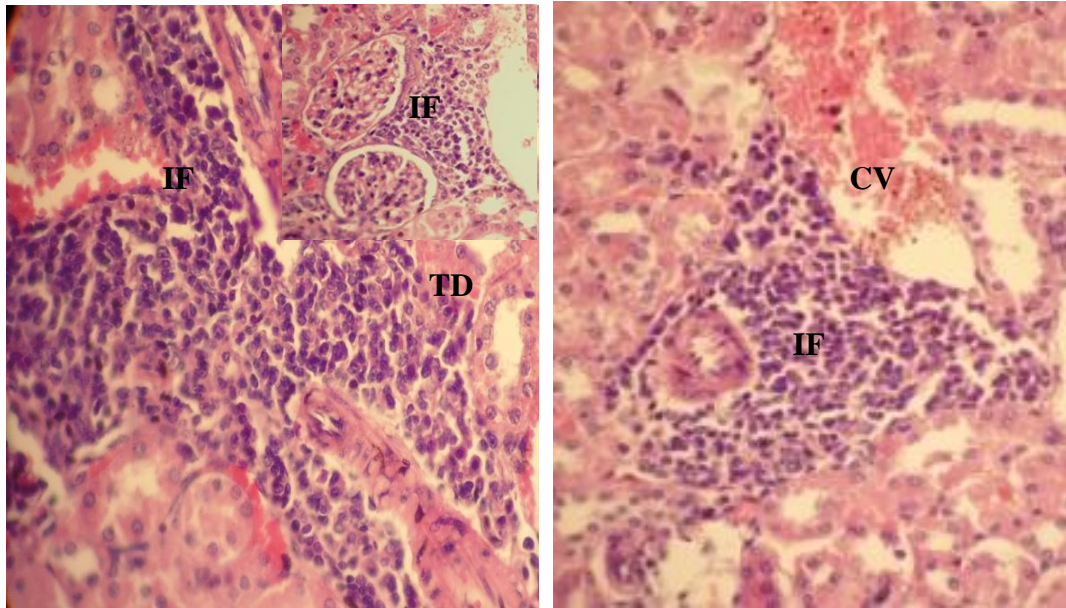


Figure 42B: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) pendant 90 jours (G x 400).). infiltrat inflammatoire (IF), congestion vasculaires (CV), tubules dilatées (V).

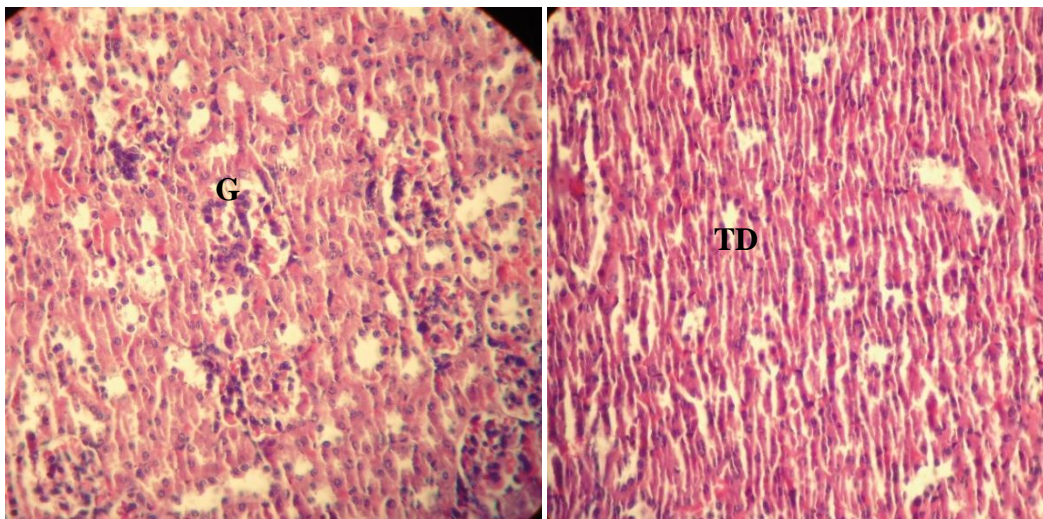


Figure 42C: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par le jus de grenade (v/v) pendant 90 jours (G x 400). tubules dilatées (V), tubules (T), glomérule (G)

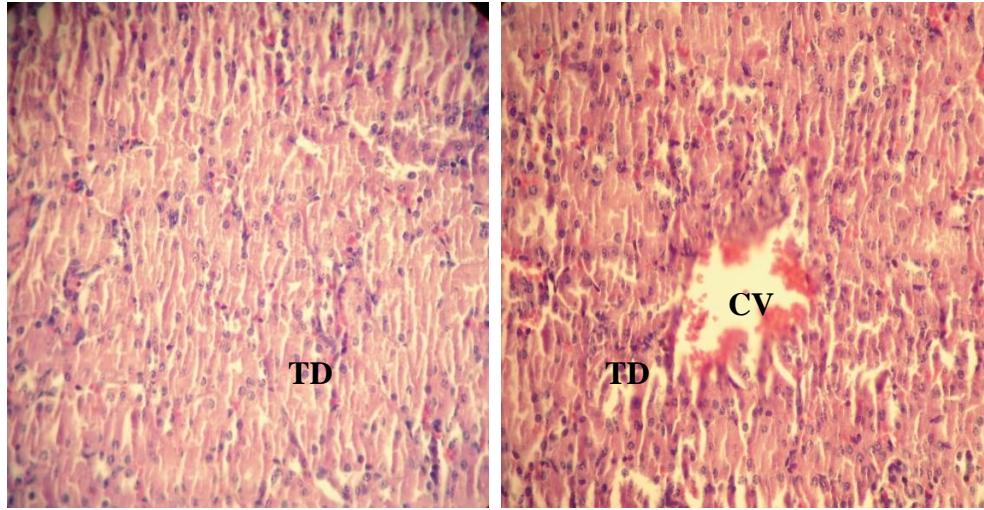


Figure 42D: Etude microscopique du rein par coloration de l' hématoxyline et de l'éosine (HE) chez les souris intoxiquées par le chlorure l'aluminium (500mg/Kg) traitées par l'extrait méthanolique d'écorce de grenade (500mg/kg) pendant 90 jours (G x 400). infiltrat inflammatoire (IF), congestion vasculaire (CV), tubules dilatées (V), tubules (T), glomérule (G)

Discussion

L'aluminium est le métal le plus largement distribué dans l'environnement et est largement utilisé dans la vie quotidienne qui permet une exposition facile à l'homme. L'exposition chronique à l'aluminium est associée à des changements comportementaux, neuropathologiques et neurochimiques. Parmi eux, les déficits d'apprentissage et les fonctions comportementales sont les plus évidents (Kumar et Gill, 2009).

Une diminution significative du poids corporel a été observée chez les souris traitées à l'aluminium comparativement au groupe témoin (Bihaqi et *al.*, 2009). Buraimoh et Ojo, (2014) ont conclu que l'exposition à des doses croissantes de chlorure d'aluminium (475 à 1,900 mg/kg) entraîne une perte significative du poids chez les rats Wistar. Une réduction de la consommation d'eau et des aliments consommés et des diarrhées transitoires ont abouti à une diminution de la masse corporelle finale des rats recevant du une dose de 80 mg/l de chlorure d'aluminium pendant 3 mois (Kowalczyk et *al.*, 2004).

Le traitement par les extraits de grenade pendant l'exposition à l'aluminium a protégé les souris contre les changements induits par l'aluminium. La consommation quotidienne de jus de fruits a significativement amélioré l'activité locomotrice au cours des 15 dernières minutes de ce test. Nos résultats ne sont pas en accord avec un grand nombre de recherches qui ont montré que l'exposition à l'aluminium avec des concentrations différentes conduit à une hypokinésie (Harsha et *al.*, 2013; Taïr et *al.*, 2016; Cao et *al.*, 2017). L'exposition à l'aluminium entraîne des altérations significatives de certaines fonctions motrices et une augmentation de l'apoptose des motoneurones (Shaw et Petrik, 2009).

Dans cette étude; l'exposition chronique à l'aluminium a causé une hyperactivité locomotrice, une anxiété, la dépression et a diminué la mémoire, l'apprentissage et la curiosité certainement par un dysfonctionnement de la neurotransmission et le comportement relié. En effet, Amador et *al.*, (2001) ont rapporté que l'aluminium interfère avec la neurotransmission cholinergiques. glutamatergiques (Platt et *al.*, 1994) et gamma-aminobutyrique (Cordeiro et *al.*, 2003).

Ceci confirme l'étude selon laquelle l'exposition à l'aluminium provoque des déficits moteurs et une dégénérescence des neurones moteurs (Shaw et Petrik, 2009). La grenade a amélioré le comportement affectif et moteur chez les souris exposées à des niveaux cytotoxiques de rayonnements protoniques (Dulcich et *al.*, 2013).

En plus du dysfonctionnement moteur; une augmentation du temps d'immobilité a été observée chez les animaux exposés à Al (Bhalla *et al.*, 2010). Cette constatation a été rapportée par Rebai et Djebli, (2008), qui ont trouvé que l'exposition à 50 mg / kg d'AlCl₃ pendant 3 mois augmentait le temps d'immobilité des souris traitées. L'activité antidépressive est liée au temps d'immobilité dans le test de nage forcée. En effet, Lin *et al.*, (2015) ont trouvé que la réduction du temps d'immobilité est un indicateur de l'amélioration de l'état dépressif indiquant la modulation de la neurotransmission sérotoninergique. Le jus de grenade améliore l'état dépressif des souris empoisonnées par l'aluminium en réduisant le temps d'immobilité dans le test de nage forcée.

La réduction de la durée de l'immobilité représente un effet antidépresseur (Taiwo Adefunmilayo *et al.*, 2012). HPLC-DAD a révélé la présence de la vanilline un acide phénolique qui augmente le niveau de la sérotonine et de la dopamine dans le tissu cérébral ce qui améliore les comportements dépressifs chez les rats en créant le bonheur et en modulant les émotions dans le trouble dépressif majeur (Xu *et al.*, 2015). On a signalé que la vanilline présentait des propriétés protectrices significatives du cerveau en réduisant les taux de peroxydation lipidique et l'oxyde nitrique et en augmentant les activités des enzymes antioxydantes (Makni *et al.*, 2012)

La pathophysiologie des troubles anxieux est encore en cours d'étude, bien que des données actuelles indiquent que la neurobiologie implique des anomalies de la transmission sérotoninergique, noradrénergique, glutamatergique et GABA-ergique (Sarris *et al.*, 2011; Nutt *et al.*, 2002). Dans la présente étude, l'activité anxiolytique a été examinée en utilisant le labyrinthe plus élevé (EPM) chez la souris. Un agent anxiolytique augmente le temps passé dans le bras ouvert de l'EPM. Des effets anxiolytiques par un mécanisme GABAergique de la lutéoline ont été rapportés après administration orale et intrapéritonéale chez la souris, ce qui suggère qu'elle peut traverser la barrière hémato-encéphalique (Coleta *et al.*, 2008).

La planche à trous est actuellement utilisée comme un test de néophilie dans de nombreux domaines de la pharmacologie comportementale et que certains aspects du système dopaminergique sont impliqués dans le trempage de la tête (Kliethermes et Crabbe, 2006). Le comportement exploratoire correspondant à l'immersion de la tête dans un trou, peut être freiné par la néophobie qui peut être aggravée par la peur du vide. Au cours de cette exploration, les vibrisses des souris sont en contact avec les bords des trous, ce qui pourrait être rassurant par rapport à la peur du vide. En débit de ces conditions, les animaux anxieux

ont de la difficulté à explorer les trous, tandis que les animaux non anxieux arbitrent entre ces influences contradictoires en continuant les explorations des trous (do-Rego et *al.*, 2006).

Ces observations corroborent l'hypothèse selon laquelle une diminution du nombre et de la durée d'immersion de la tête dans la planche à trou représente un état anxiogène des animaux (Takeda et *al.*, 1998). Dans ce test, les souris intoxiquées ont démontré un faible nombre de plongé de tête qui correspond à une manifestation d'anxiété. En outre, cette diminution du nombre de tête immergée a été inversée par le jus de grenade. Cette constatation confirme le travaux d'Abdulmalek et *al.*, (2015); qui ont prouvé que le jus de grenade possède un effet anxiolytique et augmentent la curiosité.

Le labyrinthe de Morris (MWM) et le labyrinthe à 8 bras ont été conçu pour l'étude de l'apprentissage spatial et de la mémoire de l'hippocampe chez les rongeurs. La performance dans le MWM dépend de plusieurs éléments, allant de l'attention, l'apprentissage et la mémoire, à la vision et la coordination motrice (Vandam et *al.*, 2005). L'hippocampe joue un rôle central dans la consolidation de la mémoire, un processus de conversion de la mémoire à court terme en mémoire stockée de manière durable et conservée dans le cerveau des mammifères (Wittenberg et Tsien, 2002).

Les systèmes de récepteurs NMDA en général, et la potentialisation à long terme à médiation par le glutamate (LTP) en particulier, peuvent jouer un rôle crucial dans le processus d'apprentissage et de formation de la mémoire. Les récepteurs NMDA dans le cerveau ont été impliqués et ont montré qu'ils jouent un rôle crucial dans divers types d'apprentissage (Xu et *al.*, 2001). Dans une étude, on a montré que le blocage NMDA provoqué par la nicotine altère la mémoire de travail et de référence (Levin et *al.*, 1998). On a démontré que ces récepteurs étaient impliqués dans l'apprentissage spatial (Christopher et *al.*, 2015; Shimizu et *al.*, 2000, Tsien et *al.*, 1996), la mémoire de travail et de référence (Levin et *al.*, 1998).

Dans notre étude, la mémoire et les capacités d'apprentissage des souris ont été considérablement altérées après une période de 90 jours d'exposition à l'aluminium dans les deux tests de mémoire utilisées. Ces résultats indiquent que AlCl₃ conduit à des déficits d'apprentissage et de mémoire (Coa et *al.*, 2016). Nos résultats confirment ceux obtenus Sethi et *al.*, (2008), qui ont démontré que l'administration d'AlCl₃ (50 mg/kg/jour) dans de l'eau potable pendant 6 mois nuit à l'apprentissage spatial et aux capacités de mémorisation des rats jeunes et âgés.

Résultats et Discussion

De plus, Taïr et *al.*, (2016) ont rapporté que Al a provoqué des perturbations significatives de la mémoire à court et à long terme, une diminution de l'activité locomotrice, une inhibition significative de l'activité acétylcholinestérase dans le cerveau et une déplétion significative des enzymes antioxydantes et du glutathion chez le rat.

Une diminution du taux de la dopamine et de la sérotonine a été observée en relation avec une détérioration de l'apprentissage et de la mémoire chez des souris traitées par l'aluminium (Bhala et *al.*, 2010).

Le jus de grenade a produit une réduction significative du temps que les souris ont eu besoin pour arriver à la plate-forme cachée et visible ce qui a confirmé un niveau plus élevé d'acquisition et de mémoire du groupe intoxiqué traité par rapport aux souris intoxiquées. Cette constatation confirme la réduction des dommages dans le cerveau dans le groupe traité comparativement au groupe intoxiqué. Cependant le comportement des souris n'était pas significatif dans le test de labyrinthe à 8 bras.

De nombreuses études ont démontré que les composés polyphénoliques naturels présentent des effets neuroprotecteurs en piégeant les radicaux libres et en augmentant la capacité antioxydante contre divers types d'agressions neurotoxiques *in vitro* et *in vivo* (Choi, 2012). Les composés polyphénoliques des fruits et des légumes sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et de se localiser dans diverses régions du cerveau importantes pour l'apprentissage et la mémoire. Ces composés peuvent délivrer leurs capacités antioxydantes et modificatrices de signalisation centralement (Andres-Lacueva, 2005).

Les grenades contiennent des niveaux élevés de polyphénols par rapport à d'autres fruits et légumes (Kelawala et Ananthanarayan, 2004). Les aliments riches en flavonoïdes peuvent améliorer l'apprentissage, la mémoire et les performances cognitives (Rendeiro et *al.*, 2013; Rendeiro et *al.*, 2015; Spencer, 2009; Bhullar et Rupasinghe, 2013). Plus récemment, la neuromodulation et les actions neuroprotectrices ont également été suggérées (Socci et *al.*, 2017).

Dans cette lumière, nos résultats ont montré que la supplémentation alimentaire avec du jus de grenade atténuait considérablement les déficits d'apprentissage et de mémoire, améliorait la coordination motrice et réduisait l'anxiété (Subash et *al.*, 2015).

La rutine, un des flavonoïdes identifié, a de nombreux effets bénéfiques sur la santé. L'altération de la mémoire spatiale induite par les toxiques et les dommages des cellules

pyramidales de l'hippocampe ont été corrigés chez les rats lorsqu'ils étaient nourris avec un régime supplémenté en rutine (Koda et *al.*, 2008). Ces mêmes auteurs ont montré que la rutine a un effet protecteur sur le dysfonctionnement de la mémoire induit par le triméthylétain (TMT) chez le rat (Koda et *al.*, 2009).

Hespéridine, un autre flavonoïde en raison de sa nature lipophile; peut traverser facilement la barrière hémato-encéphalique et permet la neuroprotection (Thenmozhi et *al.*, 2015). Des études *in vitro* ont confirmé la liaison l'hespéridine avec Al, formant un complexe hesperidine-Al (Kuntic et *al.*, 2011). Au niveau central, le système cholinergique joue un rôle important dans la mémoire et les fonctions cognitives (Barker et Warburton, 2009). Il a été conclu que l'hespéridine peut inverser la perte de mémoire causée par l'intoxication de l'aluminium en atténuant l'activité de l'AChE et la voie amyloïdogène (Thenmozhi et *al.*, 2015).

De plus, Anwar et *al.*, (2012), ont rapporté également que l'acide caféique améliore la mémoire et interfère avec la signalisation cholinergique. En tant que composé naturel et prometteur, l'acide caféique est considéré comme potentiellement thérapeutique dans les troubles impliquant le système cholinergique (Anwar et *al.*, 2012).

En effet, l'acide caféique a également été signalé pour inhiber l'activité AChE dans le cerveau de rat et atténuer la démence induite par le chlorure d'aluminium chez les rats (Khan et *al.*, 2013).

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer les processus par lesquels l'aluminium peut traverser la barrière hémato-encéphalique, l'accès au tissu cérébral et de s'y accumuler (Yokel, 2012) confirmé par notre étude GFAA qui a révélé un contenu hautement significatif d'Al dans le cerveau du groupe intoxiqué. Des concentrations élevées en aluminium dans les neurones dégénératifs lors de l'exposition à des niveaux élevés d'aluminium et conduit à une dégénérescence neurofibrillaire (Bharathi et *al.*, 2006).

Cependant, les effets protecteurs du jus de *Punica granatum* chez les souris intoxiquées par AlCl₃ observées dans la présente étude étaient dus à la présence des composés de polyphénols dans le jus de grenade qui a la capacité de réduire l'absorption d'Al et finalement de diminuer son accumulation dans le cerveau et d'induire un stress oxydatif et des lésions cérébrales.

Résultats et Discussion

En outre, les flavonoïdes sont des chélateurs d'ions métalliques efficaces et forment des produits stables avec des ions béryllium, aluminium, fer et zinc (Pavun et *al.*, 2012). De plus, l'acide tannique (TEA) est un chélateur très efficace pour les métaux (Karamać et *al.*, 2009; Gülçin et *al.*, 2013) ce dernier a été identifié dans le chromatogramme du jus.

L'administration de l'aluminium a significativement augmenté la fuite des transaminases TGO ou ASAT ($P < 0,05$) et TGP ou ALAT ($P > 0,05$) dans la circulation sanguine. Alors que le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade réduisent la fuite d'ALT et d'AST dans le sang. Bhadauria, (2012) a également rapporté une élévation de ces enzymes chez des rats exposés à une administration orale d' $AlCl_3$. Les enzymes hépatiques TGO et TGP sont généralement soulevées en cas d'hépatotoxicité ou de lésions hépatocellulaires.

Les données actuellement suggèrent que l'Al exerce un effet hépatotoxique, car l'augmentation d'ALT et AST suggère des lésions hépatiques suite à une perturbation des membranes (Shati et Alamri, 2010).

Par conséquent, il y aura une décharge de cette enzyme des cellules vers le flux sanguin. L'augmentation de l'activité de TGP est connue seulement dans l'empoisonnement par les métaux lourds, l'hépatose toxique et la dystrophie musculaire (Abdel Moneim et *al.*, 2011).

Nos résultats concordent avec ceux de Abdel Moneim et *al.*, (2013) qui ont noté une chute des enzymes TGP et TGO suite à un traitement par 200 mg/kg d'extrait méthanolique issu d'écorce de grenade après une exposition des rats à une dose de 34 mg/kg de chlorure d'aluminium pendant 7 jours. Selon Ashoush et *al.*, (2013), la teneur élevée en polyphénols dans la poudre d'écorce de grenade a balayé les radicaux libres produits par CCL_4 ce qui a atténué les perturbations des paramètres biochimiques et a un potentiel protecteur des dommages du foie.

Le cholestérol, un autre paramètre biochimique a été dosé dans le sang et qui a été trouvé élevé par rapport aux souris témoins et qui a été accompagnée d'une diminution du poids des souris intoxiquées par l'aluminium, pourrait être attribuée à une mobilisation accrue des graisses provenant des tissus adipeux.

Notre étude a montré que la consommation du jus et de l'extrait méthanolique d'écorce de grenade par les souris exposées au chlorure d'aluminium réduit le niveau du cholestérol. Il

a été rapporté que les différentes parties de la grenade (*Punica granatum* L) sont connues comme un réservoir de composés bioactifs avec des activités biologiques potentielles (Sadeghipour et al., 2014; Sreekumar et al., 2014).

Esmailzadeh et al., (2006) ont montré une réduction significative du taux de cholestérol après une consommation quotidienne du jus concentré de grenade par des patients diabétiques atteints de dyslipidémie.

Des concentrations variables d'un extrait hydroalcoolique de grenade ont diminué le taux sérique en cholestérol, de triglycérides, de LDL, d'ALT, d'AST et d'AP, tout en augmentant le taux sérique du HDL chez les rats nourris avec forte teneur en lipide (Sadeghipour et al., 2014). Cependant d'autres paramètres biochimiques doivent être évalués pour confirmer nos résultats.

Une hypocalcémie a été constaté après le dosage du calcium chez les souris ayant reçu uniquement l'aluminium. Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus avec Mestaghanmi et al., (2002) qui ont constaté une augmentation du calcium suite à des injections de différentes doses (50, 100 et 200 mg/kg/j) lors de la gestation des rattes. L'élévation du calcium sérique pendant la période de toxicité de l'aluminium suggèrent que l'ostéomalacie induite par l'aluminium conduit à la mobilisation du calcium à partir du tissu osseux (Cannata et al., 1983).

Nos résultats histopathologiques sont en corrélation avec ceux de Bihagi et al., (2009) qui ont constaté que $AlCl_3$ provoque des lésions tissulaires dans le cortex cérébral, y compris la dégénérescence neuronale comme l'hémorragie des cellules fantômes et vacuolisation cytoplasmique. Il a été démontré que les effets toxiques de l'Al sur le cerveau des souris ont confirmé un dommage dans l'hippocampe et le cortex, y compris la dégénérescence neurofibrillaire due à l'accumulation d'Al dans ces régions (Rebai et Djebli, 2008).

L'administration du jus de grenade à des souris traitées au chlorure d'aluminium a montré une bonne restauration histopathologique par rapport aux souris traitées avec de l'aluminium et qui était plus efficace que l'extrait méthanolique d'écorce de grenade, ce qui dépeint son action protectrice. La modulation des paramètres neurologiques, biochimiques et de l'histopathologie inaltérée du tissu cérébral, peuvent être attribués à la propriété antioxydante des extraits de grenade qui est la base de la propriété neuroprotectrice (Harsha et Anilakumar, 2013).

Résultats et Discussion

Il a été démontré que les fruits de grenade contiennent des quantités importantes d'antioxydant et une grande quantité de polyphénols et de nutriments qui jouent un rôle précieux dans l'alimentation quotidienne (Trigueros et *al.*, 2014; Malviya et *al.*, 2014; Neveen et *al.*, 2012). Ces actions biologiques ont été principalement attribuées à des composés phénoliques essentiels, tels que les anthocyanines et les ellagitannins (Mena et *al.*, 2011b). On a montré aussi que les polyphénols alimentaires stimulent la neurogenèse dans l'hippocampe et ont un effet significatif sur le déclin des fonctions cognitives (Valente et *al.*, 2009).

Il a été démontré qu'une supplémentation alimentaire des souris gestantes soumises à une lésion cérébrale hypoxique-ischémique avec le jus de grenade a entraîné une diminution marquée de la perte de tissu cérébral chez des souris néonatales (Loren et *al.*, 2005). Plusieurs études ont indiqué que l'extrait de grenade avait des effets neuroprotecteurs contre la maladie d'Alzheimer et la dépression (Subash et *al.*, 2012; Naveen et *al.*, 2013).

La plupart des lésions observées dans les sections du foie des souris intoxiquées par l'aluminium pendant 12 semaines ont été signalées par El-Sayed et *al.*, (2011) qui ont rapporté que les tissus hépatiques des souris ayant reçu AlCl₃ ont révélé des lésions étendues caractérisées par une perte de l'architecture normale du tissu parenchymateux, des sinusoides et des vaisseaux sanguins congestionnés, l'infiltration des cellules inflammatoires, la dégénérescence cellulaire avec pycnose nucléaire et la présence de zones nécrotiques.

Nos résultats ont montré que le jus de grenade améliore les altérations des paramètres biochimiques et présente un effet protecteur du tissu hépatique. Ceci est en accord avec les résultats de Shafik et El-Batsh, (2016) qui ont rapporté que les activités AST, ALT ont été déclinées après un traitement avec *Punica granatum* chez des rats intoxiqués par l'arsenic. Le jus de grenade atténue les dommages oxydatifs dans le tissu hépatique (Bouasla et *al.*, 2016).

De même l'extrait méthanolique issu d'une macération successive à polarité croissante de la poudre d'écorce de grenade a restauré l'architecture du foie. De plus, il a été prouvé que les extraits d'écorce et des graines de grenade ont des effets protecteurs contre la fibrose hépatique induite par des produits chimiques (Wei et *al.*, 2015). Ces effets bénéfiques peuvent être liés à des activités anti-apoptotiques et antioxydantes (Abdel Moneim et *al.*, 2013).

La teneur élevée en flavonoïdes dans le jus de grenade augmente la résistance au stress oxydatif et protègent les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres. Ceci est

Résultats et Discussion

cohérent avec les résultats de Faria et *al.*, (2007) qui ont signalé que le jus de grenade améliorerait le stress oxydatif.

Les actions néphrotoxiques de l'aluminium proviennent de son accumulation dans les reins, avec la dégénérescence résultante des cellules tubulaires rénales. Il a été suggéré que Al génère des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent la détérioration oxydative des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN (Kutlubay et *al.*, 2007).

Les reins de souris traitées avec AlCl₃ présentaient des glomérules rétrécis, une congestion intraglomérulaire, une hyperplasie mésangiale et une oblitération des fentes de filtration. Une perte de microvillosités apicales, une dégénérescence des mitochondries et un réticulum endoplasmique rugueux élargi ont également été observés dans les tubes contournés proximaux de ces animaux (Al Kahtani et *al.* 2010).

Nos résultats concordent avec Al Dera, (2016) qui a montré une détérioration significative de la fonction rénale et de son architecture après une exposition à l'AlCl₃ accompagnée d'une augmentation du stress oxydatif rénal et de l'inflammation, ce qui suggère une forte activité prooxydante de l'AlCl₃.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Un déclin des capacités cognitives et des fonctions motrices peuvent être liées au vieillissement, à des états pathologiques, et à la neurotoxicité par les métaux lourds. Ces derniers sont des facteurs impliqués dans le stress oxydatif et responsables de la neurotoxicité.

De nos jours, la préservation des fonctions mentales et la thérapie des troubles neurologiques par les polyphénols ont acquis une grande importance, ces substances soutiennent une amélioration des performances neurologiques, la promotion de la survie neuronale et à la réduction de la perte neuronale.

La recherche scientifique a montré que les aliments naturels en plus de leurs effets nutritionnels ont des activités médicinales importantes. La consommation d'aliments fonctionnels peut prévenir un certain nombre de maladies, et la connaissance de ces avantages étant diffusée à la population pourrait encourager la consommation de ces aliments en raison de leurs avantages pour la santé.

Dans ce contexte, notre choix a été fait sur la grenade un fruit qui a été cité dans le coran et largement utilisé dans l'histoire. Ce fruit a montré des activités biologiques dans plusieurs domaines différents et peut être considéré comme un détoxifiant naturel pour améliorer la qualité de vie et aider à la prévention de la toxicité par les métaux lourds.

L'objectif principal de cette étude était de montrer le risque lié à une intoxication par le plomb et à l'aluminium en utilisant plusieurs approches neurocomportementales, biochimiques et histologiques ainsi que d'évaluer l'effet protecteur du jus et de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade à rétablir les perturbations et les dommages causés par ces deux métaux.

L'analyse qualitative du jus et de l'extrait méthanolique de l'écorce de *Punica granatum* a mis en évidence la présence des alcaloïdes, des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des anthocyanes (avec absence des anthocyanes dans l'extrait méthanolique) et les sucres. Le dosage quantitatif des métabolites secondaires dans ces deux extraits a montré une quantité importante des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins totaux.

L'HPLC-DAD du jus de grenade nous permis de détecter une composition riche en molécules bioactives; dix acides phénoliques (acide gallique, acide caféique, vanilline, acide isovanillique, acide ferulique, acide syringique, acide o-anisique, acide 3-hydroxy-4-

methoxycinnamique, acide m-anisique et acide trans-cinnamique), sept flavonoïdes (rutine, prunine, luteoline, quercetine, apigenine, isorhamnetine, hesperidine) et un tanin (acide tannique).

Nos résultats ont montré que l'exposition chronique au plomb (1000 ppm) et à l'aluminium (500 mg/kg) entraîne une chute du poids avec une diminution la consommation de l'eau de boisson ce qui suggère que ces deux métaux ont un effet anorexigène.

Les résultats des paramètres neurologiques (test de l'activité locomotrice, test de la boîte noire /claire et le test de la nage forcée, test de curiosité et le test de labyrinthe en croix) montrent que le plomb et l'aluminium provoquent une hyperactivité locomotrice avec installation d'un état de dépression et d'anxiété, ces troubles sont la conséquence de la perturbation des voies de transmissions sérotoninergiques, GABAérgique, cholinergiques qui sont impliqués dans le contrôle de ces comportements.

De plus les tests de mémoire (test de labyrinthe à 8 bras et de la piscine de Morris) dévoilent que l'aluminium provoque une déficience des capacités cognitives marquée par une altération de la performance d'apprentissage et de mémoire qui serait peut être liée à une perturbation des récepteurs NMDA, des altérations dopaminergiques qui sont impliqués dans l'apprentissage.

Une quantité importante de plomb et de l'aluminium ont été enregistrés au niveau du cerveau ce qui indique que ces deux métaux sont capables de traverser la barrière hématoencéphalique et de s'y concentrer et d'y exercer leurs effets toxiques.

D'autres paramètres biochimiques ont été perturbés marqués par une augmentation des marqueurs de la fonction hépatique TGP TGO qui peut être expliquer par la fuite de ces enzymes du tissu vers le sang suite à une l'altération de la perméabilité membranaire ou de nécrose hépatocellulaire. Un taux élevé de cholestérol a été enregistré lors de l'intoxication par l'aluminium.

Une hypercalcémie a été signalée lors de l'intoxication par le plomb et une hypocalcémie chez les intoxiqués par l'aluminium ce qui implique que ces deux métaux altère l'homéostasie du calcium.

Ces perturbations neurocomportementales et biochimiques sont confirmées sur le plan histologique. En effet, l'aluminium et le plomb ont diminué la densité cellulaire dans le

cerveau et ont provoqué la dégénérescence neuronale; la vacuolisation cytoplasmique, la congestion des vaisseaux sanguins, la nécrose et l'infiltrat inflammatoire.

L'étude histologique au niveau foie a montré des lésions hépatocytaires avec présence de sinusoides dilatés, ballonnements, des congestions veineuses et des infiltrats inflammatoires moins marqués que le plomb. Les reins présentent une dilation des tubules rénaux, des infiltrats inflammatoires et des congestions.

Le jus et l'extrait méthanolique d'écorce de grenade ont pu corriger les dommages et les perturbations causés par le plomb et l'aluminium avec une bonne évolution pondérale et une consommation d'eau de boisson. Pour les paramètres neurocomportementaux, ces deux extraits ont corrigé l'hyperactivité locomotrice et ont montré des effets anxiolytiques et antidépresseurs marqués et ont amélioré les déficiences cognitives par modulation des systèmes dopaminergiques, serotoninergiques et cholinergiques.

Sur le plan histologique, le jus entraîne une restauration de la structure histologique du cerveau et de l'hippocampe et une légère régénération rénale et hépatocytaires confirmés sur le plan biochimique. Notons aussi que ce dernier était plus efficace que l'extrait méthanolique cela peut attribuer à la composition différente en molécules bioactives. Ces effets bénéfiques de la grenade à réduire la neurotoxicité explique son effet neuroprotecteur.

Il serait important de compléter cette étude par :

1. Un dosage de la dopamine, sérotonine, acétylcholine
2. Un dosage des biomarqueurs du stress oxydant (MDA) et des enzymes antioxydantes (GPX, GST, CAT)
3. Un dosage large des paramètres biochimiques pour confirmer la fonction hépatorénale
4. Un dosage par HPLC de l'extrait méthanolique
5. Une étude génotoxique pour cerner l'effet de ces métaux à l'échelle moléculaire
6. Utilisation de l'immunohistochimie
7. Tester des plantes médicinales endémiques vue la richesse de notre flore.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdalla O, Elboshy M, Risha E, Mohammed F H, Abu GW. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Pomegranate Against Thioacetamide Toxicity in Rats. *Annals of Veterinary and Animal Science* 2016;(3):1.
- Abdel Moneim AE, Othman MS, Mohmoud SM, El-Deib KM.. Pomegranate peel attenuates aluminum-induced hepatorenal toxicity. *Toxicol Mech Methods* 2013;23(8):624-33.
- Abdel Moneim AE, El-Khadragy MF. The potential effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats, *J. Physiol Biochem* 2013;69:359–370.
- Abdel Moneim AE. Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain rats. *J Med Plant Res* 2012a;6:195–9.
- Abdel-Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S. The Redox Status in Rats Treated with Flaxseed Oil and Lead-Induced Hepatotoxicity. *Biological Trace Element Research*. 2011;143(1):457–467.
- Abdulmalek S, Suliman M, Omer O. Possible Neuroprotective Role of Pomegranate Juice in Aluminum Chloride Induced Alzheimer's Like Disease in Mice. *J Alzheimers Dis Parkinsonism* 2015;5:188.
- Abu-Taweel GM, Ajarem JS, Ahmad M. Neurobehavioral toxic effects of perinatal oral exposure to aluminum on the developmental motor reflexes, learning, memory and brain neurotransmitters of mice offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012;101:49–56.
- Agrawal SK, Ayyash L, Gourley CS, Levy J, Faber K, Hughes CL Jr. Evaluation of the developmental neuroendocrine and reproductive toxicology of aluminium. *Food Chem Toxicol* 1996;34:49- 53.
- Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME, Martínez AL, et al., “HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *J.Ethnopharmacol* 2010;127:91-97.
- Ahmed M. Hegazy S, Usama A. Fouad. Evaluation of Lead Hepatotoxicity; Histological, Histochemical and Ultrastructural Study 2014;2(3):9.
- Ahmed MM, Eid Ali S. Protective effect of pomegranate peel ethanol extract against ferric nitrilotriacetate induced renal oxidative damage in rats. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2010;7(2) & 8(1):35-43.
- Ahyayauch H, Sansar W, Rendón-Ramírez A, Goñi FM, Bennouna M, Gamrani H. Effects of chronic and acute lead treatments on the biophysical properties of erythrocyte

Références bibliographiques

- membranes, and a comparison with model membranes. *FEBS Open Bio* 2013; 3: 212–217.
- Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (Pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol* 2005;96: 171–176.
- Akter S, Sarker A, Hossain MD. Antidiarrhoeal activity of rind of *Punica granatum*. *Int Curr Pharmaceut J* 2013;2(5):101-104.
- Al Dera HS. Protective effect of resveratrol against aluminum chloride induced nephrotoxicity in rats *Saudi Med J* 2016;37(4):369–378.
- Al Dera HS. Protective effect of resveratrol against aluminum chloride induced nephrotoxicity in rats *Saudi Med J* 2016;37(4): 369–378.
- Al Kahtani MA. Renal Damage Mediated by Oxidative Stress in Mice Treated with Aluminium Chloride: Protective Effects of Taurine. *Journal of Biological Sciences* 2010;10:584-595
- Albrechet-Souza L, Oliveira AR, De Luca MC, Tomazini FM, Santos NR, Brandao ML. A comparative study with two types of elevated plus maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2005;29:571–579.
- Al-Hashem FH. Camel's milk protects against aluminum chloride-induced toxicity in the liver and kidney of white albino rats. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2009;5:98-109.
- Ali HM. Influence of Pomegranate *Punica granatum* as Phytochemical Rich Components on Yoghurt Drink Characteristics. *Middle East J Appl Sci* 2016;6(1):23 -26.
- Alighourchi H, Barzegar M, Abbasi S. “Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their variation after cold storage and pasteurization,” *European Food Research and Technology* 2007; 227(3):881–887.
- Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM, Abdel Moneim AE. Protective effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on testes against carbon tetrachloride intoxication in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014;**14**:164
- Alqayim MAJ. Propolis cardio protective role from the impact of aluminum chloride in female rabbits. *Bas J Vet Res* 2015;14 (2).
- Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci* 2016; 8(3): 72–79.

Références bibliographiques

- Al-Zoreky NS: Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol* 2009;134:244–248.
- Amador FC, Santos MS, Oliveira CR. Lipid peroxidation and aluminium effects on the cholinergic system in nerve terminals. *Neurotox Res* 2001;3(3):223–233.
- Amjad S, Umesalma S, Protective effect of *Centella asiatica* against aluminium-induced neurotoxicity in cerebral cortex, striatum hypothalamus and hippocampus of rat brain histopathological, and biochemical approach. *J Mol Biomark Diagn* 2015;6:1–7.
- Amudha K, Pari L. Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chemico-Biol Interact* 2011;193:57–64.
- Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 2005;8:111-20
- Anusuya MR, Kiran B. Evaluation of Effects of Different Concentrations of Lead, Alcohol and Vitamin E on Protein Carbonyl Content of Brain Tissue in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012; 2 (04): 70-73.
- Anwar J, Spanevello RM, Thome G, Stefanello N, Schmatz R, Gutierrez J, et al. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats, *Pharmacol Biochem Behav* 2012;103:386–394.
- Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res* 2008;33(12):241626.
- Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, et al. Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease : A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res* 2008;33:2416–2426.
- Aruna P, Venkataramanamma D, Singh AK, Singh RP. Health Benefits of Punicic Acid: A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety* 2016;15: 16–27.
- Ashoush IS, El-Batawy OI, El-Shourbagy GA. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Sciences* 2013; 58(1):27-32.
- Baht RV, Moy GG. Monitoring and assessment of dietary exposure to chemical contaminants. WHO: Geneva 1997;132-149.
- Bailey KR, Crawley JN. Chapter 5:Anxiety-Related Behaviors in Mice. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition.2009

Références bibliographiques

- Bancroft JD, Layton C. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques . Chapitre 10. The hematoxylin and eosin. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone of El Sevier 2013:173-186.
- Barker GRI, Warburton CE. Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. Learn Mem 2009;16:8–11.
- Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris Water Maze to Assess Spatial Learning and Memory in Weanling Mice. PLoS One. 2015;10(4): -0124521.
- Barr RJ, Alpern KS, Jay S. Histiocytic reaction associated with topical aluminum chloride (Drysol reaction). J Dermatol Surg Oncol 1993;19:1017–1021.
- Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. ISRN Oncol 2012;137289.
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 1982;217:408-14.
- Bashir M. Jarrar, Noory T. Taib. Histological and histochemical alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. Saudi J Biol Sci. 2012; 19(2): 203–210.
- Basiri S, Shekarforoush SS, Aminlari M, Akbari S. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage, LWT- Food Science and Technology 2014.
- Cerdaä B, Ceroä JJ, Tomaä s-barberaä FA, Espiän JC. Repeated Oral Administration of High Doses of the Pomegranate Ellagitannin Punicalagin to Rats for 37 Days Is Not Toxic. J. Agric. Food Chem 2003;51: 3493–3501
- Bernardo JF, Edwards MR, Barnett B. Toxicity, aluminum. 2010; eMedicine.
- Bhadauria M. Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats. Food Chem Toxicol 2012;50:2487-95.
- Bhalla P, Garg ML, Dhawan DK. Protective role of lithium during aluminum-induced neurotoxicity. Neurochemistry International 2010;56:256–262.
- Bhandari PR. Pomegranate (*Punica granatum* L). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. The International Journal of Nutrition Pharmacology Neurological Diseases 2012;2(3):171-184.
- Bhandary SK, Kumari NS , Bhat VS, Sharmila KP, Bekal MP. Preliminary phytochemical screening of various extracts of punica granatum peel, whole fruit and seeds. NUJHS 2012;2(4).

Références bibliographiques

- Bharathi Shamasundar NM, Sathyanarayana Rao TS, Dhanunjaya Naidu M, Ravid R, Rao KS. 2006. A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model. *Brain Res Rev* 2006;52:275–292.
- Bhullar KS, Rupasinghe HP. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2013;891748.
- Bihaqi SW, Sharma M, Singh AP, Tiwari M. Neuroprotective role of *Convolvulus pluricaulis* on aluminum induced neurotoxicity in rat brain. *J Ethnopharmacol* 2009;124(3):409-15.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 2012;5(1): 9–19.
- Bishayee A, Darvesh AS. Pomegranate-Derived Constituents as Inducers of Cell Death: Implications in Cancer Prevention and Therapy. *Natural compounds as inducers of cell death* 2012;33-47
- Black, J. *Microbiology: Principles and exploration* (8th ed.). John Wiley & Sons. 2012;68P
- Blumstein LK, Crawley JN. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 1983;18(1):37–40.
- Boissier JR, Simon P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. *Thérapie* 1962;17:1225-1232.
- Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. 2006; 79-82. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- Boroushaki MT, Mollazadeh H, Rajabian A, Dolati K, Hoseini A, Paseban M, Farzadnia M. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride induced nephrotoxicity in rat, *Renal Failure* 2014;36:1581–1586.
- Bouasla A, Bouasla I, Boumendjel A, Abdennour C, El Feki A, Messarah M. Prophylactic effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on sodium fluoride-induced oxidative damage in liver and erythrocytes of rats Prophylactic effects of pomegranate (*Punica granatum*) juice on sodium fluoride-induced oxidative damage in liver and erythrocytes of rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2016;12:94(7):709-18.
- Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463(1–3)55–65.

Références bibliographiques

- Bradberry S, Vale A. A comparison of sodium calcium edetate (edetate calcium disodium) and succimer (DMSA) in the treatment of inorganic lead poisoning. *Clinical Toxicology* 2009;47:841–858
- Braithwaite A, Smith FJ. *Chromatographic Methods*. 5ème Ed Kluwer Academic Publishers.London 1999;548P.
- Brown R, Morgan L, Bhattacharya S, et al. Potentiel aluminum exposure from parenteral nutrition in patient with acute kidney injury. *Ann Pharmacother* 2008;42(10):1410-1415.
- Buraimoh AA, Ojo SA. Effects of Aluminium chloride exposure on the body weight of Wistar rats. *Ann. Bio Sci* 2014;2(2):66-73.
- Çam M, Hisil Y, Durmaz G. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem* 2009;112(3):721-726.
- Campos-Esparza M R, Torres-Ramos MA. Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 2010; 1:10(4):269-77.
- Cannata J. Bright BJD, Junior BJ, Feli GS, Beasta G. Effect of aofe aluminum overload on calcium and parathyroid-hormone metabolism. *Lancet* 1983;500-503.
- Cao Z, Wang F, Xiua C, et al. *Hypericum perforatum* Extract Attenuates Behavioral, Biochemical, and Neurochemical Abnormalities in Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease Rats. *Biomed Pharmacother* 2017;91:931–937
- Cao Z, Yang X, Zhang H, Wang H, Huang W, Xu F, Zhuang C, Wang X, Li Y. Aluminum chloride induces neuroinflammation, loss of neuronal dendritic spine and cognition impairment in developing rat. *Chemosphere* 2016;151:289-295.
- Carballo S, Rodriguez G, Krueger C, Dreher M, Reed J. Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *J Funct Foods* 2009;1(3):3249.
- Carter M, Shieh J. Chapter 6 - Visualizing Neural Structure. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)* 2015;145–166
- Cekmen M, Otunctemur A, Ozbek E, Cakir S, Dursun M, Polat EC, Somay A, Ozbay N. Pomegranate extract attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats by reducing oxidative stress. *Renal Failure* 2013;35:268–274.
- Charles DJ. Pomegranate. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. 2012: 477-487.

Références bibliographiques

- Chary-Valckenaere I, Fener P, Jouzeau J-Y, Netter P, Payan E, Floquet J, Burnel D, Kessler M, Pourel J, Gaucher A. Experimental articular toxicity of aluminum compounds in vivo. *J Rheumatol* 1994;21:1542–1547.
- Chaudhari SM, Kalyani Y, Patel KY, Sachin L, Badole. *Punica granatum* (Pomegranate Fruit) In Cancer Treatment. *Polyphenols in Human Health and Disease* 2014;2:1393–1400.
- Chen H, Jin Z, Wang X, Xu X, Deng L, Zhao J. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *J Neurochem* 2008;448:175-179.
- Cheng D, Zhu C, Cao J, Jiang W. The protective effects of polyphenols from jujube peel (*Ziziphus Jujube* Mill) on isoproterenol-induced myocardial ischemia and aluminum-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2012;50(5):1302-8
- Chia-Jung L, Lih-Geeng C, Wen-Li L, Ching-Chiung W. Anti-inflammatory effects of *Punica granatum* linne in vitro and in vivo. *Food Chem* 2010;118:315–322.
- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ. Antioxidant properties of polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 2012;144-53.
- Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, de Lima TCM, da Cunha AP. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behavioural Brain Research* 2008;189(1):75-82.
- Cordeiro JM, Silva VS, Oliveira CR, Gonçalves PP. Aluminum-induced impairment of Ca²⁺ modulatory action on GABA transport in brain cortex nerve terminals. *J. Inorg. Biochem* 2003;97(1):132–142.
- Cornelius CE. Biochemical evaluation of hepatic function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1979;15:25–9.
- Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13:167–70.
- Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1981;15(5) :695–699.
- Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *J Signal Transduct.* 2012: 646354.
- Day JP, Barker J, King RV, Miller J, et al. Biological chemistry of aluminium studied using Al and accelerator mass spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 1994;B92:463-468.

Références bibliographiques

- De Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro L, Napoli J. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide* 2007;17(1):50-4.
- De Pascual-teresa S, Garcia-alonso M, Rivas-gonzalo JC, Santos-buelga C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem* 2004;84:13–18
- Deepmala J, Deepak M, Srivastav S, Sangeeta S, Kumar SA, Kumar SS. Protective effect of combined therapy with dithiothreitol, zinc and selenium protects acute mercury induced oxidative injury in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2013;27(3):249-56.
- Devi CB, Reddy GH, Prasanthi RP, Chetty CS, Reddy GR. Developmental lead exposure alters mitochondrial monoamine oxidase and synaptosomal catecholamine levels in rat brain. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23:375–81.
- Diallo D, Sanogo R, Yasambou H, Traoré A, Coulibaly K, Maiza A. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C R Chimie* 2004;7:1073-1080.
- Diarra MN. Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : *Spilanthes oleracea* Jacq. (Asteraceae). Thèse de Doctorat. 2003;78.
- Djebli N, Slimani M, Aoues A. Effect of lead exposure on dopaminergic transmission in the rat brain. *J Toxicol* 2005;207:363-68.
- Dkhil MA, Moneim AE, Al-Quraishy S. *Indigofera oblongifolia* Ameliorates Lead Acetate-Induced Testicular Oxidative Damage and Apoptosis in a Rat Model. *Biol Trace Elem Res* 2016;173(2):354-61
- Domingo JL, Mercedes Gómez, M. Teresa Colomina Josep L. Domingo, Mercedes Gómez, M. Teresa Colomina. Risks of aluminium exposure during pregnancy. *Contributions to Science* 2000;1(4):479-487.
- Do-Rego JC, Alice F, Le Maître VE, Deniel A , Stela MK, Leroux-Nicollet RI, Costentin J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. *Behavioural Brain Research* 2006;169:282–288.
- Dulcich M, Hartman RE. Pomegranate supplementation improves affective and motor behavior in mice after radiation exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013:940830.
- Duruibe JO, Ogwuegbu MOC, Ekwurugwu JN. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* 2007; 2:112-18.

Références bibliographiques

- El Kar C, Mtimet N, Ferchichi A, Bouajila J. Relationships between Fruit Acceptability and Health-Case of Seven Pomegranate (*Punica granatum* L.) Juices. Food and Nutrition Sciences 2013;4:119-130.
- EL-BELTAGI HS, MOHAMED HI. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. Not Bot Horti Agrobo 2013;41(1):44-57
- El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. J Trace Elem Med Biol 2004;18:113–121.
- Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y, Nasri N, Ferchichi A. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower, Journal of Medicinal Plants Research 2012;6(32):4724–4730.
- El-Missiry MA. Prophylactic effect of melatonin on lead induced inhibition of heme biosynthesis and deterioration of antioxidant system in male rats. J Biochem Mol Toxicol 2000;14:57-62.
- El-Sayed WM, Al-Kahtani MA, Abdel-Moneim AM. Prophylactic and therapeutic effects of taurine against aluminum-induced acute hepatotoxicity in mice. Journal of Hazardous Materials 2011;192:880–886
- Elserougy S, Mahdy-Abdallah H, Farouk Hafez S, Beshir S. Impact of aluminum exposure on lung. Toxicol Ind Health 2015;31(1):73-8.
- El-Tantawy WH. Antioxidant effects of Spirulina supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. J Tradit Complement Med 2016;6(4):327–331.
- Eren G, Cukurova Z, Hergunsel O. Chapter 25 - Oxidative Stress and the Lung in Diabetes: The Use of Pomegranate Juice. Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants 2014:237–245
- Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Cholesterol-Lowering Effect of Concentrated Pomegranate Juice Consumption in Type II Diabetic Patients with Hyperlipidemia. Int J Vitam Nutr Res 2006;76 (3):147–151
- Exley C. Aluminum in antiperspirants: more than just skin deep. Am J Med 2004a;17:969–970
- Exley C. The pro-oxidant activity of aluminum. Free Radic Biol Med 2004b;36:380-387.
- Exley C. What is the risk of aluminium as a neurotoxin? Expert Rev Neurother 2014;4 (6): 589-591
- Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. Eur J Nutr 2007;46: 271-278.

Références bibliographiques

- Farkhondeh T, Samarghandian S, Sadighara P. Lead exposure and asthma: an overview of observational and experimental studies. *Toxin Reviews* 2014;6-10
- Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates . *Interdiscip Toxicol* 2012 ;5(2): 47–58.
- Flora GJ, Seth PK. Alterations in some membrane properties in rat brain following exposure to lead. *Cytobios* 2000;103:103-9.
- Fromentin A, Tomé GD, Larue-Achagiotis C. Influence du stress sur le choix alimentaire et du gain de poids. Congrès de la SFN (Société Française de Nutrition), Marseille, France.2005
- Fuster-Muñoz E, Roche E, Funes L, Martínez-Peinado P, Sempere JM, Vicente-Salar N. Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. *Nutr* 2016; 32:539-45.
- Ganrot PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ Health Perspect* 1986;65:363–441
- Garcia MTA, Gonzalez ELM. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: Involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Fd Chem Toxicol* 2008;46:2089–2095
- Gargouri M, Hamed H, Akrouti A, Christian M, Ksouri R, El Feki A. Immunomodulatory and antioxidant protective effect of *Sarcocornia perennis* L. (swampfire) in lead intoxicated rat. *Toxicol Mech Methods*. 2017;27(9):697-706.
- Garza A, Vega R, Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor* 2006;12(3):57-65.
- Ghorbel I, Elwej A, Chaabane M, Jamoussi K, Zeghal N. Protective effect of selenium against aluminium chloride induced cardiotoxicity in rats. *Pharm Biomed Res* 2017; 3(2): 19-25.
- Godwin HA. The biological chemistry of lead. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:223–227.
- Gomez-Pinilla F, Nguyen TTJ. Natural Mood Foods: The Actions of Polyphenols Against Psychiatric and Cognitive Disorders. *Nutr Neurosci* 2012;15:127-133.
- Gonçalves P, Silva VS. Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity? *Journal of Inorganic Biochemistry* 2007;101:1291–1338
- Gong Q, Wu Q, Huang XN, et al. Protective Effects of Ginkgo biloba Leaf Extract on Aluminum-Induced Brain Dysfunction in Rats. *Life Sci* 2005;77:140 – 148.
- Gourier-Fréry C, Fréry N. Aluminium. *EMC-Toxicologie Pathologie* 2004;1:79–95.

Références bibliographiques

- Gülçin I, Huyut Z, El mastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* 2010; 3(1):43-53.
- Gulson BL, Pounds JG, Mushak P, Thomas BJ, Gray B, Korsch MJ. Estimation of cumulative lead releases (lead flux) from the maternal skeleton during pregnancy and lactation. *J Lab Clin Med* 1999;134:631–640.
- Gupta, V, Gill, K.D. Influence of ethanol on lead distribution and biochemical changes in rats exposed to lead. *Alcohol*;2000; 20(1):9-17.
- Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine* 2000, 15, 29(10), 927-45.
- Hajimahmoodi M, Moghaddam G, Ranjbar AM, Khazani H, Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B. Total Phenolic, Flavonoids, Tannin Content and Antioxidant Power of Some Iranian Pomegranate Flower Cultivars (*Punica granatum* L.). *American Journal of Plant Sciences* 2013;(4):1815-1820.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active 976 oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free 977 Radical Biol Med* 1994; 16:845–850.
- Hanley MJ, Masse G, Harmatz JS, Court MH, Greenblatt DJ. Pomegranate juice and pomegranate extract do not impair oral clearance of flurbiprofen in human volunteers: divergence from in vitro results. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(5):651-7
- Harsha SN, Anilakumar KR. Protection against aluminium neurotoxicity: A repertoire of lettuce antioxidants. *Biomedicine & Aging Pathology* 2013;3:179–184
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadarian M et al. Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006;24:506-515.
- Hassan A, Jassim HM. Effect of treating lactating rats with lead acetate and its interaction with vitamin E or C on neurobehavior, development and some biochemical parameters in their pups. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2010;24(1):45-52.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572–584.
- Hernández F, Melgarejo P, Tomás-Barberán FA, Artés F, 1999. Evolution of juice anthocyanins during ripening of new selected pomegranate (*Punica granatum*) clones. *Eur Food Res Technol* 1999; 210:39–42
- Hidaka M, Okumura M, Fujita K, Ogikubo T, Yamasaki K, Iwakiri T, Setoguchi N, Arimori K. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos* 2005;33(5):644-8

Références bibliographiques

- Hmid I , Elothmani D, Hanine H, Oukabli A, Mehinagic E. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* 2013
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;54:(1):21–30.
- Holcombe JA, Borges DL. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2010.
- Hsieh MT, Peng WH, Wu CR, Ng KY, Cheng CL, Xu HX. Review on Experimental Research of Herbal Medicines with Anti-Amnesic Activity. *Planta Med* 2010;76:203–217.
- Ibrahim MN, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012;41-46
- Ibrahim NM, Eweis EA, El-Beltagi HS, Abdel-Mobdy YE. Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(1): 41–46.
- Ighodaro OM, Omole JO, Ebuehi OA, Salawu FN. Aluminium-induced liver and testicular damage: effects of *Piliostigma thonningii* methanolic leaf extract. *Nig Q J Hosp Med* 2012 ;22(3):158-63.
- Imaizumi M, Miyazaki S, Onodera K. Effects of xanthine derivatives in a light/dark test in mice and contribution of adenosine receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994;16:639 – 644.
- Ismail, T., P. Sestili, et al. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol* 2012;143(2): 397-405.
- Ittel TH. Determinants of gastrointestinal absorption and distribution of aluminium in health and uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:17–24.
- Jamshidzadeha A, Abbasianb M, Mehrabadi AR, Hossein Niknahad. Hepatoprotective Effect of Pomegranate (*Punica Granatum*) Fruit Juice and Seed Extracts against CCL4-Induced Toxicity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012: 8(3):181-187.
- Jeffery EH, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger JL. Systemic aluminum toxicity: effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. *J Toxicol Environ Health* 1996 30;48(6) :649-65.
- Joseph CLM, Havstad S, Ownby DR, Peterson EL, Maliarik M, McCabe MJ, Jr, Barone C, Johnson CC. Blood Lead Level and Risk of Asthma. *Environ Health Perspect* 2005; 113(7): 900–904.

Références bibliographiques

- Julkunen-Titto R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry* 1985;33: 213-217.
- Junko M, Yoko OH, Hideyuki YB, Hiroyuki YC. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol* 2004;92:93-101.
- Kahloula, K., Slimani, M., Adli, D.H., Rachdi, S., Boumediene, D. Neuro beneficial effects of *Pimpinella anisum* against lead exposure. *Int J Green Pharm* 2013;7:18-24.
- Kaneko N, Sugioka T, Sakurai H. Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: insight into cellular damage caused by oxidative stress. *J Inorg Biochem* 2007;101:967–975.
- Karamać M. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by Tannin Constituents of Selected Edible Nuts . *Int J Mol Sci.* 2009; 10(12):5485–5497.
- Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, Nakayama T. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum-adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. *Vaccine.* 2014;53:2(27):3393-401.
- Kaur A, Gill KD. Possible peripheral markers for chronic aluminum toxicity in Wistar rats. *Toxicol Ind Health* 2006;22:39–46.
- Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol* 2006 a;44(7):984–993
- Kaur G, Zoobi J, Mohammad A, Sarwar A. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2006;44: 984-993
- Kaur, A., Joshi, K., Minz, R.W., Gill, K.D. Neurofilament phosphorylation and disruption: a possible mechanism of chronic aluminium toxicity in Wistar rats. *Toxicology* 2006 b; 219:1-10.
- Kawahara M, Kato-Negishi M. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses, *Int J Alzheimer's Dis* 2011:1–17
- Kelawala NS, Ananthanarayan L. Antioxidant activity of selected foodstuffs. *Int J Food Sci Nutr.* 2004;55(6):511-6.

Références bibliographiques

- Kennedy OD. Polyphenols and the Human Brain: Plant “Secondary Metabolite” Ecologic Roles and Endogenous Signaling Functions Drive Benefits^{1,2}. *Adv Nutr* 2014;5: 515–533.
- Khan KA, Kumar N, Nayak PG et al. Impact of caffeic acid on aluminium chloride-induced dementia in rats. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:1745–1752.
- Khan N, Afaq F, Kweon MH, Kim K, Mukhtar H. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. *Cancer Res* 2007;67(7):3475–3482
- Khan N, Naqvi A, Perveen K, Rafique M. Lead induced nephrotoxicity with special Reference to proximal tubule in albino rats. *Pakistan Journal of Pharmacology* 2008; 25(1): 29-35.
- Kharoubi O, Slimani M, Aoues A. Neuroprotective effect of wormwood against lead exposure. *Journal of Emergencies Trauma and Shock I* 2011;4:1.
- Kharoubi O, Slimani M, Aoues A. Neuroprotective effect of wormwood against lead exposure. *J Emerg Trauma Shock*. 2011; 4(1): 82–88.
- Khazdair MR, Boskabady MH, Afshari R, Dadpour B, Behforouz A, Javidi M, Abbasnezhad A, Moradi V, Tabatabaie SS. Respiratory Symptoms and Pulmonary Function Testes in Lead Exposed Workers. *Iran Red Crescent Med J* 2012;14(11):737–742.
- Kliethermes CL, Crabbe JC. Pharmacological and genetic influences on hole-board behaviors in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav* 2006;85:57–65.
- Koda T, Kuroda Y, Imai H. Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutr Res* 28:629–634.
- Koda T, Kuroda Y, Imai H. Rutin Supplementation in the Diet has Protective Effects Against Toxicant-Induced Hippocampal Injury by Suppression of Microglial Activation and Pro-Inflammatory Cytokines. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:523–531
- Kongerud J, Grønnesby JK, Magnus P. Respiratory symptoms and lung function of aluminum potroom workers. *Scand J Work Environ Health* 1990;16(4):270-7.
- Kowalczyk E, Kopff A, Kędziora J, Błaszczuk J, Kopff M, Niedworok J, Fijałkowski P. Effect of Long-Term Aluminium Chloride Intoxication on Selected Biochemical Parameters and Oxidative- -Antioxidative Balance in Experimental Animals. *Polish Journal of Environmental Studies* 2004;13(1):41-43.
- Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V. Human health risk assessment for aluminium,

Références bibliographiques

- aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007;10(1):1–269.
- Kumar MV, Henley AK, Nelson CJ, Indumati O, Prabhakara Rao Y, Rajanna S, Rajanna B. Protective effect of *Allium sativum* (garlic) aqueous extract against lead-induced oxidative stress in the rat brain, liver, and kidney. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017; 24(2):1544-1552
- Kumar S, Maheshwari KK, Singh V. Central nervous system activity of acute administration of ethanol extract of *Punica granatum* L. seeds in mice. *Indian J Exp Biol* 2008;46:811-816.
- Kumar V, Gill KD. Aluminum neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Arch Toxicol* 2009;83:965–978
- Kuntic V, Filipovic I, Vujic Z. Effects of rutin and hesperidin and their Al(III) and Cu(II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. *Molecules* 2011;16:1378–1388
- Kutlubay R, Oguz EO, Guven C, Can B, Sinik Z, Tuncay O. Histological and ultrastructural evidence for protective effects on aluminium-induced kidney damage by intraperitoneal administration of α -tocopherol. *Int J Toxicol* 2007;26:95-101
- Lakshmi BVS, Sudhakar M, Anisha M. Neuroprotective Role of Hydroalcoholic Extract of *Vitis vinifera* Against Aluminium-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Neurotoxicology* 2015;41:73–79.
- Lansky EP, Newman R A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;109: 177-206.
- IEiba A, Hu H, Zheng A, Kales SN. A safe strategy to decrease fetal lead exposure in a woman with chronic intoxication. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23(8):932–934.
- Levin ED, Bettegowda C, Weaver T, Christopher NC. Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial arm maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;61(3):335–340
- Li HE, XU Honggao, LIU Xuan, et al. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant capacities by HPLC–ABTS+ assay. *Food Research International* 2011;44 (5):1161-1167.
- Lin SH, Chou ML, Chen WC, et al. A Medicinal Herb, *Melissa officinalis* L. Ameliorates Depressive-Like Behavior of Rats in the Forced Swimming Test via Regulating the Serotonergic Neurotransmitter. *J Ethnopharmacol* 2015;4(175):266-72

Références bibliographiques

- Liu KS, Hao JH, Zeng Y, Dai FC, Gu PQ. Neurotoxicity and Biomarkers of Lead Exposure: a Review. Chinese Medical Sciences Journal 2013; 28 (3) 178-188
- Loren DJ, Seeram NP, Schulman RN, Holtzman DM. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic–ischemic brain injury. *Pediatr Res* 2005;57:858–64
- Lyn P. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Alternative Medicine Review* 2006; 11(2):114-127.
- Maheswari SL, Murali RV, R.Balaji R. Aluminium induced cholinotoxicity in zebra fish brain - A sequel of oxidative stress. *International Journal of Advanced Research* 2014;2:(2):322-335.
- Makni M, Chtourou Y, Garoui EM, Boudawara T, Fetoui H. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and DNA damage in rats: protective role of vanillin. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:844–852.
- Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, et al. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14813-14818.
- Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle* 2006 ;5:371-373
- Mallick N, Khan R A. Behavioral effects of *Citrus Paradisi* in rats. *Metabolic Brain Disease* 2015;30 (5).
- Malviya S, Arvind, Alok Jha, Hettiarachchy N. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *J Food Sci Technol* 2014;51(12): 4132–4137.
- Mantovani M, Matteussi AS, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of lead in adult mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999;32(12):1555-60.
- Rodríguez-Roque MJ, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Methods for Determining the Antioxidant Capacity of Food Constituents. *Fruit and Vegetable Phytochemicals* 2017; 803-8016
- Markewberry WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer’s disease. *Free Radic Biol Med* 1994;23:134–147.
- Marquez Martin A, de la Puerta Vazquez R, Fernandez-Arche A, RuizGutierrez V. Supressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radical Research* 2006;40:295–302.

Références bibliographiques

- Mason LH, Harp JP, Han DY. Pb neurotoxicity: neuropsychological effects of lead toxicity. *Biomed Res Int* 2014; Article ID 840547:8.
- Matthaiou CM, Goutzourelas N, Stagos ND, Sarafoglou E, Jamurtas A, Koulocheri SD, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Kouretas D. Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food and Chemical Toxicology* 2014;73:1–6.
- Maximino C, Marques de Brito T, Dias CA, Gouveia A Jr, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc* **2010**: 5(2):209-16.
- Maya S, Prakash T, Das Madhu K, Goli D. Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016;83:746–754
- Meerts IA, Verspeek-Rip CM, Buskens CA, Keizer HG, Bassaganya Riera J, Jouni ZE, van Huygevoort AH, van Otterdijk FM, van de Waart EJ. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol* 2009;47(6): 1085–1092.
- Mena P, García-Viguera C, Navarro-Rico J, Moreno DA, Bartual J, Saura D. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum L*) cultivars grown in Spain. *J Sci Food Agric* 2011b;91:1893–1906.
- Mena P, Girones-Vilaplana A, Moreno DA, García-Viguera C. Pomegranate fruit for health promotion: myths and realities. *Funct Plant Sci Biotechnol* 2011a;5:33–42.
- Mestaghanmi H, El amrani S, Dauça M, Saile R. Effects of aluminium chloride on some essential elements in pregnant rats and their offspring. *Actes Inst Agron Vet (Maroc)* 2002;22(4):227-234.
- Mirdehghan SH, Rahemi M. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum L*) fruit. *Scientia Horticulturae* 2007;111: 120–127.
- Missoun F, Slimani M, Aoues A. Toxic effect of lead on kidney function in rat Wistar. *African Journal of Biochemistry Research* 2010;4(2):21-27.
- Mohamed NE, Abd El-Moneim AE. Ginkgo biloba extract alleviates oxidative stress and some neurotransmitters changes induced by aluminum chloride in rats. *Nutrition* 2017;35:93-99
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 1984;11:47-60.
- Murray RL. Alanine aminotransferase. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company 1984a;1088-90.

Références bibliographiques

- Murray RL. Aspartate aminotransferase. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. Clinical chemistry : Theory, Analysis and Correlation. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984b:1112-1116.
- Nagata M, Hidaka M, Sekiya H, Kawano Y, Yamasaki K, Okumura M, Arimori K. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and tolbutamide pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos* 2007;35(2):302-5
- Naito HK. Cholesterol. In: Kaplan LA and Pesce AJ. Eds. Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation. St Louis. Toronto. Princeton : The C. V. Mosby Company ; 1984 ;1194-11206
- Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Lead Exposure and Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Environ Health Perspect.* 2007;115(3): 472–482.
- Naveen S, Siddalingaswamy M, Singsit D, Khanum F. Antidepressive effect of polyphenols and omega-3 fatty acid from pomegranate peel and flax seed in mice exposed to chronic mild stress. *Psychiatry Clin Neurosci* 2013;67:501-508.
- Neal AP, Guilarte TR. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicol Res (Camb)* 2013; 1; 2(2): 99–114.
- Nehru B, Anand P. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains, *J. Trace Elem Med Biol* 2005;19: 203–208
- Nemsadze K, Sanikidze T, Ratiani L, Gabunia L, Sharashenidze T. Mechanisms of lead-induced poisoning. *Georgian Med News.* 2009;(172-173):92-6.
- Nihei MK, Desmond NL, Mcglothan JL, Kuhlmann AC, Guilarte TR. N-methyl-D-aspartatereceptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience* 2000;99:233-42.
- Nikolaus S, Antke C, Beu M, Müller HW. Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders--results from in vivo imaging studies. *Rev Neurosci.* 2010; 21(2):119-39.
- Nirwane AM, Gupta PV, Patil RA. Therapeutic Implications of Punica Granatum Seeds on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *Austin J Pharmacol Ther* 2014;2 (8):5
- Nolan CV, Shaikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. *Toxicology* 1992;73(2):127-46.
- Nuncio-Jáuregui N, Calín-Sánchez A, Carbonell-Barrachina A, Hernández Fca. Changes in quality parameters, proline, antioxidant activity and color of pomegranate (*Punica*

Références bibliographiques

- granatum* L.) as affected by fruit position within tree, cultivar and ripening stage. *Scientia Horticulturae* 2014;165: 181–189.
- Nutt DJ, Ballenger JC, Sheehan D, Wittchen HU. Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol* 2002;5:315–325.
- Nwanjo H, Oze G, Okafor M. Biochemical Evaluation Of Hepatic Dysfunction As A Result Of Halofantrine Toxicity In Wistar Rats. *The Internet Journal of Third World Medicine* 2006;4(2).
- Nwokocha CR, Owu DU, Ufearo CS, Iwuala MO. Comparative study on the efficacy of *Garcinia kola* in reducing some heavy metal accumulation in liver of Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2011;135:488–91.
- Obioha UE, Suru SM, Ola-Mudathir KF, Faremi TY. Hepatoprotective potentials of onion and garlic extracts on cadmium-induced oxidative damage in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2009;129:143–56.
- Ochmanski W, Barabasz W. Aluminium-occurrence and toxicity for organisms. *Przeglad Lekarski* 200;57: 665–668.
- Oh Y S. Bioactive Compounds and Their Neuroprotective Effects in Diabetic Complications. *Nutrients.* 2016;8(8): 472.
- Omoregie EH; Folashade KO; Ibrahim I; Nkiruka OP; Sabo AM; Okwute, Koma OS; Ibumeh OJ. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Punica granatum* L. (fruit bark and leaves). *New York Science Journal* 2010;3(12):91-98.
- Osińska E, Kanoniuk D, Kusiak A. Aluminum hemotoxicity mechanisms.. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med.* 2004;59(1):411-6.
- Padma R, Parvathy NG, Renjith V, Rahate KP. Quantitative estimation of tannins, phenols and antioxidant activity of methanolic extract of *Imperata cylindrica*. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 2013; 4 (1):73-77 .
- Pal PB, SinhaK, Sil PC. Mangiferin, a Natural Xanthone, Protects Murine Liver in Pb (II) Induced Hepatic Damage and Cell Death via MAP Kinase, NFkB and Mitochondria Dependent Pathways. *PLoS One* 2013;8. Article ID: -56894.
- Patel C, Dadhaniy P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46:2728-2735
- Paul S, Ghosh D, Ghosh AK, Mitra E, Dey M, Chattopadhyay A D Bandyopadhyay D. Lead induces oxidative stress in rat heart and liver tissue homogenates: an in vitro study. *Journal of Cell and Tissue Research* 2013;13(3):3829-3837.

Références bibliographiques

- Pavun LA, Dimitricmarkovic JM, Durdevic PT, Jelikic-Stankov MD, Dikanovic DB, Ciric AR, Malesev DL. Development and validation of a fluorometric method for the determination of hesperidin in human plasma and pharmaceutical forms. *J Serb Chem Soc* 2012;77:1625–1640.
- Pearce JM. Burton's line in lead poisoning. *Eur Neurol* 2007;57:118-9.
- Peaslee MH, Einhellig FA. 1977. Protective effect of tannic acid in mice receiving dietary lead. *Experientia* 1977;33:1206.
- Pekdemir T, Tokunaga S, Ishigami Y, Kyung-Jin H. Removal of cadmium or lead from polluted water by biological amphiphiles. *Journal of Surfactants and Detergents* 2000; 3:43–46.
- Penley SC, Gaudet CM, Threlkeld SW. Use of an Eight-arm Radial Water Maze to Assess Working and Reference Memory Following Neonatal Brain Injury. *J Vis Exp* 2013; (82): 50940.
- Pérez-vicente A, Gil-Izquierdo A, García-Viguera C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(8): 2308-2312.
- Pineton de Chambrun G, Body-Malapel M, Frey-Wagner I, Djouina M, Deknuydt F, Atrott K, Esquerre N, Altare F, Neut C, Arrieta MC, Kanneganti T-D, Rogler G, Colombel J-F, Cortot A, Desreumaux P, Vignal C. Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunol* 2014; 7(3): 589–601.
- Pitot CH, Dragan PY. Casarett and Doull's toxicology. 5th ed. New York: McGraw Hill; Chemical carcinogenesis 1996; 201–260.
- Platt B, Haas H, Busselberg D. Aluminum reduces glutamate-activated currents of rat hippocampal neurones. *Neuroreport* 1994;5(17):2329–2332.
- Polshettiwar SA, Ganjiwale RO, Wadher SJ, Yeol PG. Spectrophotometric estimation of total tannins in some ayurvedic eye drops. *Ind. J Pharmaceutical Sciences* 2007; 69 (4): 574-76.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730–732.
- Pounds JG, Long, GJ, and Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ. Health Perspect* 1991;91:17–32

Références bibliographiques

- Poyrazoglu E, Gökmen V, Nevzat A. Organic Acids and Phenolic Compounds in Pomegranates (*Punica granatum* L) Grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal* 2002;15: 567–575.
- Prakash D, Gopinath K, Sudhandiran G. Fisetin Enhances Behavioral Performances and Attenuates Reactive Gliosis and Inflammation During Aluminum Chloride-Induced Neurotoxicity. *Neuromol Med* 2013;15:192–208.
- Priyanka S, Rao JK, Sushma JN. Therapeutic Effect of Melatonin Against Aluminum-Induced Neurotoxicity in Cerebellum of Albino Mice. *Toxicol Environ Chem* 2012;94(7): 1422-1432.
- Raafat K, Samy W. Amelioration of Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy by *Punica granatum* L. Extract and Its Spray Dried Biopolymeric Dispersions. *Evid Based Complement Alternat Med*. Hindawi Publishing Corporation. 2014.
- Rastogi SK. Renal effects of environmental and occupational lead exposure. *Indian J Occup Environ Med* 2008;12:103–106.
- Rebai O, Djebli NE. Chronic exposure to aluminum chloride in mice: exploratory behaviors and spatial learning. *Adv Biol Res* 2008;2:26–33
- Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D: Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and Phenolic acids from *punica granatum* L. *Planta Med* 2007;73(5):461–467.
- Ren G, Kong J, Jia N, Shang X. Luteolin attenuates neuronal apoptosis in the hippocampi of diabetic encephalopathy rats. *Neural Regen Res* 2013;8:1071–1080.
- Rendeiro C, Rhodes JS, Spencer JPE. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochemistry International* 2015;89:126-139.
- Rendeiro C, Vauzour D, Rattray M, Waffo-Téguo P, Mérillon JM, Butler LT, Williams CM, Spencer JPE. Dietary Levels of Pure Flavonoids Improve Spatial Memory Performance and Increase Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *PLoS One*. 2013; 8(5): 63535.
- Rhodes A. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques Chapitre 4. Fixation of tissues. Churchill Livingstone of El Sevier 2013:69-93
- Rivera M, Aposhian HV, Fernando Q. Lead chelates of meso- and racemic dimercaptosuccinic acid. *J Inorg Biochem* 1989;37:283–293.
- Robert A. Yokel. The Pharmacokinetics and Toxicology of Aluminum in the Brain. *Current Inorganic Chemistry* 2012; 2:54-63

Références bibliographiques

- Roberts E. Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol Aging* 1986;7:561–567
- Saad H, Bouhtoury CE, Pizzi A, Rode K, Charrier B, Ayed N. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Ind Crop Prod* 2012;40:239–246.
- Sabri FZ, Belarbi M, Sabri S, Muneer M, Alsayadi S. Phytochemical Screening and identification of some compounds from Mallow. *Journal of Natural Product & Plant Resources* 2012;2 (4):512.
- Sadeghi A, Bideskan AE, Alipour F, Fazel A, Haghiri H. The Effect of Ascorbic Acid and Garlic Administration on Lead-Induced Neural Damage in Rat Offspring's Hippocampus. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(2):157–164.
- Sadeghipour A, Eidi M, Kavgani AI, Ghahramani R, Shahabzadeh S, Anissian A. Lipid Lowering Effect of *Punica granatum* L. Peel in High Lipid Diet Fed Male Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014; 432650.
- Sáenz JCB, Villagra OR, Trias JF. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res* 2006;169:57–65.
- Saleh HA, Abdel El-Aziz GS, Mustafa HN, Saleh AHA, Mal AO, Deifalla AHS, Abo Rass M. Protective effect of garlic extract against maternal and fetal cerebellar damage induced by lead administration during pregnancy in rats. *Folia Morphologica* 2017.
- Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: Reviews on Environmental Health, 2009; 24(1):15–45.
- Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou PB. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. *Rev Environ Health.* 2009; 24(1): 15–45.
- Sandhir R, Julka D, Gill KD. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implication on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol* 1994;74: 66-71.
- Sarris J. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: a systematic review. *Phytother Res* 2007;21(8):703-716.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol* 1999;66 :11-17.
- Seddik L, Bah TM, Aoues A, Benderdour M, Slimani M. Dried leaf extract protects against lead-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Eur J Sci Res* 2010;42:139-151.

Références bibliographiques

- Seeram P, LEE R, HEBER D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta* 2004;348(1):63-68.
- Sethi P, Jyoti A, Singh R. Aluminum-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 2008; 29:1069–79.
- Shafik NM and EL Batsh MM, Protective effects of combined selenium and Punica granatum treatment on some inflammatory and oxidative stress markers in arsenic-induced hepatotoxicity in rats, *Biol Trace Elem. Res* 2016;169:121–128.
- Sharma A, Sharma V, Kansal L. Amelioration of lead-induced hepatotoxicity by *Allium sativum* extracts in Swiss albino mice. *Libyan J Med* 2010; 5: 10.4176/091107.
- Sharma J, Maity A. Pomegranate Phytochemicals: Nutraceutical and Therapeutic Values. *Fruit, Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 2010;4 (2):56-76.
- Sharma R, Barber I, Panwar K, Purohit A. Postnatal development of stomach in Swiss mice induced by lead acetate. *Int J of Pharma Sci and Res* 2013;4(11): 4410-4415.
- Sharma V, Pandey D. Protective Role of *Tinospora Cordifolia* against Lead-induced Hepatotoxicity *Toxicol Intern* 2010;17(1):12-17.
- Sharma VK « Morris water maze – A versatile cognitive. tool” *J Biosci Tech* 2009;1 (1):15-19.
- Shati AA, Alamri SA. Role of saffron (*Crocus sativus* L.) and honey syrup on aluminum-induced hepatotoxicity. *Saudi Med J* 2010;31(10):1106-13.
- Shaw CA, Petrik MS. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2009;103:1555–1562.
- Shen ML, Wang CH, Chen RY, Zhou N, Kao ST, Wu DC. Luteolin inhibits GABAA receptors in HEK cells and brain slices. *Sci Rep* 2016;13;6:27695
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 2000;290:1170–1174
- Shirley DG, Lote CJ. Renal handling of aluminium. *Nephron Physiol* 2005; 101:99-103.
- Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity *ex vivo* and IL-1beta-induced PGE₂ production in human chondrocytes *in vitro*. *J Inflamm* 2008; 5:9.
- Silas W. Smith. The Role of Chelation in the Treatment of Other Metal Poisonings. *J Med Toxicol* 2013; 9(4): 355–369.

Références bibliographiques

- Smith M, Robinson L, Segal J. 2012. Anxiety medication. Retrieved from: http://www.helpguide.org/mental/anxiety_medication_drugs_treatment.htm.
- Socci V, Tempesta D, Desideri G, De Gennaro L, Ferrara M. Enhancing Human Cognition with Cocoa Flavonoids. *Front Nutr* 2017; 4:19.
- Soltaninejad K, Kebriaeezadeh A, Minaiee B, Ostad SN, Hosseini R, Azizi E, Abdollahi M. Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:417–423
- Spencer JP. The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev* 2009;38:1152–1161.
- Spencer LT, John D. Bancroft. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Chapitre 6. Tissue processing. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone of El Sevier 2013;105-123
- Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *Biomed Res Int* 2014; 686921.
- Staessen JA, Yeoman WB, Fletcher AE. Blood lead concentration, renal function and blood pressure in London civil servants. *Br J Ind Med* 1990;47: 442-447.
- Strużyńska L, Walski M, Gadamski R, Dabrowska-Bouta B, Urszula Rafałowska. Lead-induced abnormalities in blood-brain barrier permeability in experimental chronic toxicity. *Molecular and Chemical Neuropathology* 1997;31(3):207–224
- Subash S, Braidy N, Essa MM, Zayana A, Ragini V, Al-Adawi S, Al-Asmi A, Guillemin GJ. Long-term (15 mo) dietary supplementation with pomegranates from Oman attenuates cognitive and behavioral deficits in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Nutrition* 2015;31:223–229.
- Subash S, Essa MM, Al-Asmi A, Al-Adawi S, Vaishnav R, Braidy N, Manivasagam T, Guillemin GJ. Pomegranate from Oman alleviates the brain oxidative damage in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Tradit Complement Med* 2014; 4:232-238
- Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants *Food Chem* 2007;102: 938–995.
- Syed D, Malik A, Hadi N, Schmitt C, Afaq F, Mukhtar H. Chapter 7- Molecular Mechanisms of Chemoprevention of Cancer by Pomegranate. *Pomegranates Ancient Roots to Modern Medicine* 2006:117-131

Références bibliographiques

- Tabaraki R, Heidarizadi E, Benvidi A. Optimization of ultrasonicassisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep Purif Technol* 2012;98:16–23.
- Tair K, Kharoubi O, Tair OA, et al. Aluminium-Induced Acute Neurotoxicity in Rats: Treatment with Aqueous Extract of *Arthrophytum* (*Hammada scoparia*). *J Acute Dis* 2016; 5(6): 470–482.
- Taiwo -Adefunmilayo E, Leite Franco B, Lucena Greice M, Barros M, Silveira D, Silva Monica V, Ferreira Vania M. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: influence of administration and gender. *Indian J Pharmacol* 2012;44:189–192
- Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology* 1998;350:21–29.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* 2012;101:133–64.
- Testud F. *Pathologie toxique en milieu de travail*», éd. ESKA, Paris. 1998; 447P.
- Thenmozhi A J, Raja TR, Janakiraman U, Manivasagam T. Neuroprotective effect of hesperidin on aluminium chloride induced Alzheimer's disease in Wistar rats. *Neurochem Res* 2015;40(4):767-76
- Trigueros L, Wojdyło A, Sendra E. Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L) yogurt. *J Agric Food Chem* 2014 ;9:62 (27) :64:17-25.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996;87:1327–1338.
- Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C. Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 938475.
- Tüzmen MN, Yücel NC, Kalburcu T, et al. Effects of Curcumin and Tannic Acid on the Aluminum- and Lead-Induced Oxidative Neurotoxicity and Alterations in NMDA Receptors. *Toxicol Mech Meth* 2015;25:120-127.
- Valente T, Hidalgo J, Bolea I et al. A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease* 2009;18(4):849–865.

Références bibliographiques

- Valverde M, Trejo C, Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA–metal interaction? *Mutagenesis* 2001;16:265–270
- VanDam D, Lenders G, De Deyn PP. Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains. *Neurobiology of Learning and Memory* 2005; 85:164–172.
- Varadarajan P, Rathinaswamy G, Asirvatham D. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of Rheo discolor. *Ethnobotanical Leaflet* 2008;12:841–845.
- Vauzour D, Vafeiadou, K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr* 2008; 3:11526.
- Vauzour D. 2012. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. PMID: 22701758.
- Verity MA. Nervous system. In: Goyer RA, Klaassen CD, Waalkes MP, editors. *Metal Toxicology*. San Diego, Calif, USA: Academic Press 1995;199–226.
- Vicinanza, R, Zhang, HENNING Y, Susanne M, David Heber. Pomegranate juice metabolites, ellagic acid and urolithin a, synergistically inhibit androgen-independent prostate cancer cell growth via distinct effects on cell cycle control and apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: Article ID 247504. 12P.
- Vieyra-Reyes P, Mineur YS, Picciotto MR, Túnez I, Vidaltamayo R, Drucker-Colín, R. Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Res Bull* 2008;77:13–18.
- Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J. Preventive and Prophylactic Mechanisms of Action of Pomegranate Bioactive Constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013:Article ID 789764:18P
- Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Pérez-Alvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:635–654.
- Wald E. Le Grenadier (*Punica granatum*) : Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes . Thèse de doctorat 2009;158P.
- Walton JR. Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;29:255–273

Références bibliographiques

- Wang N, She Y, Zhu Y, Zhao H, Shao B, Sun H, Hu C, Yanfei Li. Effects of Subchronic Aluminum Exposure on the Reproductive Function in Female Rats. *Biol Trace Elem Res* 2012;145:382–387
- Wani A L, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol* 2015;8(2): 55–64.
- Wardani G, Farida N, Andayani R, Kuntoro M, Sudjarwo SA. The Potency of Red Seaweed (*Eucheuma cottonii*) Extracts as Hepatoprotector on Lead Acetate-induced Hepatotoxicity in Mice. *Pharmacognosy Res* 2017;9(3):282–286.
- Wei WL, Fang RT, Yang YH, Bi XY, Ren GX, Luo AL, Zhao M, Zan WJ. Protective effects of extracts from Pomegranate peels and seeds on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015;15:389
- White LD, Cory-Slechta DA, Gilbert ME, Tiffany-Castiglioni E, Zawia NH, Virgolini M, Rossi-George A, Lasley SM, Qian YC, Basha MR. New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 225:1–27.
- Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, Momoli F, Krewski D. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit. Rev. Toxicol* 2014;44 (1):1-80.
- William J. Howat, Beverley A. Wilson. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 2014;70(1):12–19.
- Wilson MA, Johnston MV, Goldstein GW, Blue ME. Neonatal lead exposure impairs development of rodent barrel field cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5540–5545.
- Winder C. Lead, reproduction and development. *Neurotoxicology*. Summer-Fall. 14 1993;(2-3):303-17.
- Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neuroscience* 2002;25:501–505.
- Wolak M, Siwek A, Szewczyk B, Poleszak E, Pilc A, Popik P, Nowak G. Involvement of NMDA and AMPA receptors in the antidepressant-like activity of antidepressant drugs in the forced swim test. *Barrera* 2013;65(4):991-7.
- Wolf PL, Williams D, Tsudaka T, Acosta L. *Methods and Techniques in Clinical Chemistry*. John Wiley & Sons, USA. 1972;132–196:375–383.
- Xia D, Yu X, Liao S, Shao Q, Mou H, Ma W. Protective effect of Smilax glabra extract against lead-induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol* 2010;130:414–420.

Références bibliographiques

- Xu J, Xu H, Liu Y, He H, Li G. Vanillin-induced amelioration of depression-like behaviors in rats by modulating monoamine neurotransmitters in the brain. *Psychiatry Res* 2015;225:509–514.
- Xu X, Russell T, Bazner J, Hamilton J. NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Res* 2001;889:274–277.
- Yokel RA, Hicks CL, Florence RL. Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese. *Food Chem Toxicol* 2008;46:2261–2266
- Yokel RA, McNamara PJ. Aluminium Toxicokinetics: *Pharmacology & Toxicology* 2001; 88:159–167.
- Yokel RA, McNamara PJ. Aluminum bioavailability and disposition in adult and immature rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 77: 344-352.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, et al. Interaction Between Flavonoids and the Blood-Brain Barrier: in Vitro Studies. *J. Neurochem* 2003;85:180–92.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med* 2004;36:592–604.
- Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 100.
- Zatta P, Kilyen M, Kiss T. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res Bull* 2002;59:41-45
- Zhang J, Zhan B, Yao X, Gao Y, Shong J: Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. Against genital herpes virus in vitro. *Zhong Yao Tong Bao* 1995; 20:556–558.
- Zhang K, Zhou Q. Toxic effects of Al-based coagulants on *Brassica chinensis* and *Raphanus sativus* growing in acid and neutral conditions. *Environmental Toxicology* 2005;20: 179-187.
- Zhang YC, Gan FF, Shelar SB, Ng KY, Chew EH. Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem. Toxicol* 2013;59, 272–280.

1- Publication

Pomegranate juice attenuates neurotoxicity and histopathological changes of the nervous system induced by aluminum in mice.

L. Gadouche, N. Djebli et K. Zerrouki

Phytothérapie 16(3): 133 - 141. DOI: <https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0016>

2- Congrès nationaux et internationaux

Communication affichée :

1- 1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS2016) *De la Plante aux médicaments*

Thème : Protective effect of pomegranate juice against aluminum intoxication in mice

2- The International Conference on Toxicology and Health ICTH2016 (Guelma 2016)

Thème : Neurobehavioral effects of aluminum in mice.

3- 28^{ème} Congrès annuel international de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB). (Tunisie 2017)

Thème : Pomegranate juice improves histopathological changes of brain induced by aluminum (experimental studies in mice).

4- 1^{er} Séminaire national phytothérapie et Santé (Blida 2017)

Thème : Pomegranate juice attenuates histopathological changes of the nervous system induced by lead (experimental studies in mice).

Communication orale :

1- The International Conference on Health Sciences and Medical Technologies.

Ichsmt16 (Tlemcen 2016)

Thème : Effect of pomegranate juice on neurobehavioral alterations induced by lead in mice.

2- Journées Scientifiques sur les Biotechnologies de la Reproduction des Animaux (Chlef 2018).

Thème : Potentiel pharmacologique des polyphénols sur l'apprentissage et la mémoire altérés par les métaux lourds

3- 29^{ème} Forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB (Sousse 2018).

Thème: Protective effect of pomegranate bark extract against aluminum-induced cognitive impairments.