

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Tébessa
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie

Intitulé :

**Etude sur le stress oxydatif induit par les nanoparticules
d'oxyde de nickel et l'effet protecteur de l'écorce de
grenade et du rétama**

Présenté Par :

Touaitia Akila

MEKHAZANIA Oumaima

Devant le jury

Mm. ZEGHIB Assia	MCA	Université de Tébessa	Présidente
Mr. DJABRI Belgacem	PROF	Université de Tébessa	Rapporteur
Mm. GUEDRI Kamilia	MCA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de Soutenance : 06/06/2021

Note..... Mention.....

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Résumé

Les nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO-NPs) ont attiré une attention croissante en raison de leur capacité potentielle à pénétrer dans plusieurs systèmes cellulaires humains en suscitant un effet toxique. Par ailleurs, l'utilisation des plantes médicinales comme source intéressante de composés chimiques naturels est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet protecteur des extraits méthanoliques de l'écorce de grenade (EMG) et de *Retama spherocarpa* (EMRs) contre le stress oxydatif induit par les NiO-NPs chez la souris.

Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 31 souris répartis en huit lots de quatre souris chacun sauf les témoins (3 souris). Les lots ont été confectionnés selon que les souris soient traités par les NPs-NiO (10 mg/kg) ou par les extraits EMG (500 mg/kg) et EMRs (250 mg/kg) seuls ou en combinaisons. Le traitement des souris a été effectué par gavage sur une durée de 30 jours. Les paramètres biochimiques (taux tissulaire de protéines, de lipides et de glucides) et de stress oxydatif (Taux de MDA et de GSH et activités enzymatiques de GST, GPx et CAT) ont été analysés au niveau rénal chez les souris des différents groupes traités.

Nos résultats montrent des changements notables des paramètres biochimiques avec une augmentation significative ($p > 0,01$) du taux rénal des glucides, des lipides et des protéines chez les souris traités par les NPs-NiO par rapport aux témoins. Par ailleurs, n'avons noté de variations significatives des paramètres biochimiques chez les souris traitées par l'EMG ou par l'EMRs ou par les deux en comparaison avec les témoins ($p > 0,05$). Les résultats obtenus révèlent des signes d'un stress oxydatif chez le lot intoxiqué par les NPs-NiO avec une augmentation du MDA rénal et du niveau de GSH ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique rénal de la GPx et GST ($p > 0,01$) avec une diminution de taux de la CAT. Le traitement par EMG et EMRs améliore les paramètres biochimiques et ceux du stress oxydatif en comparaison avec le lot traité par les NPs-NiO, avec une protection des organes contre l'attaque oxydative radicalaire induite par les NPs-NiO.

En conclusion, cette étude montre que les traitements par EMG et EMRs induit un effet bénéfique contre la toxicité de NPs-NiO au niveau rénal.

Mots clés : Stress Oxydatif, nanoparticules d'oxyde de Nickel, extrait méthanolique, Ecorce de grenade, *Retama sphaerocarpa*, Souris, les paramètres biochimiques, rein.

Abstract

Nickel oxide nanoparticles (NiO-NPs) attracted a growing attention owing to their potential capacity to be penetrated several human cell systems by provoking a toxic effect. On the other hand, the use of medicinal plants as interesting source of natural chemical compounds is the form of medicine most spread across the world today. The aim of this work is to study the protective effect of methanolic extract by the bark of grenade (MEG) and *Retama spherocarpa* (MERs) against the stress oxydatif led by NiO-NPs to the mouse.

It is about an experimental study led to the laboratory on 31 mice divided in eight lots of four mice each except for the group witness where there were 3 only. Lots were made depending on whether mice are treated by NPs-NiO (10 mg / kg) or by extracts MEG (500 mg / kg) and MERs (250 mg / kg) alone or in combinations. The treatment of mice was performed by force-feeding on a length of 30 days. Biochemical parameters (rate tissulaire of proteins, lipids and carbohydrates) and of stress oxydatif (Rate of MDA and GSH and activities enzymatiques of GST, GPx and CAT) being analysed on kidneys of mice in the different treated groups.

Our results show notable changes of biochemical parameters with a significant increase ($P > 0.01$) of the renal rate of carbohydrates, lipids and proteins in mice treated by NPs-NiO in comparison with the witnesses. Moreover, we didn't note a significant variations of biochemical parameters in mice treated by MEG or by MERs or by two compared with the witnesses ($p > 0,05$). Acquired results reveal signs of a stress oxydatif to the lot poisoned by NPs-NiO with a significant increase ($P > 0.01$) of renal MDA and renal level of GSH as well as of the enzymatique activity of GPx, and GST with a significant reduction in rate of the CAT. The treatment by MEG and MERs ameliorates biochemical parameters and oxydatif stress compared with the lot treated by NPs-NiO, with a protection of organs counters the oxydatif radicalaire attack led by NPs-NiO. In conclusion, this study shows that treatments with MEG and MERs induce a beneficial effect against the toxicity of NPs-NiO at the kidney level.

Keywords: Oxydatif Stress, nanoparticles of oxide of Nickel, methanolic extract, bark of grenade, *Retama sphaerocarpa*, Mouse, biochemical parameters, kidney.

الملخص

جذبت الجسيمات النانوية لأكسيد النيكل (NiO-NPs) اهتماما متزايدا بسبب قدرتها المحتملة على اختراق العديد من الأنظمة الخلوية البشرية ذات التأثير السام. من ناحية أخرى ، فإن استخدام النباتات الطبية كمصدر مثير للاهتمام للمواد الكيميائية الطبيعية هو اليوم الشكل الأكثر انتشارا للطب في جميع أنحاء العالم. والهدف من هذا العمل هو دراسة الأثر الوقائي لمستخلص الميثانول من لحاء الرمان (EMG) و الرتم (*Retama spherocarpa*) (EMRs) ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن NiO-NPs في الفئران.

الدراسة التجريبية اجريت في المختبر على 31 فأرا مقسمة الى ثمانى مجموعات كل مجموعة مكونة من أربعة فئران باستثناء المجموعة الشاهدة المكونة من 3 فئران فقط. تم تكوين المجموعات اعتمادا على إذا ما كانت الفئران قد عولجت بـ NiO-NPs (10 ملغم /كجم) أو بواسطة مستخلصات EMG (500 ملغم / كجم) ومستخلصات (250 EMRs ملغم / كجم) وحدها أو مختلطة. تم علاج الفئران بواسطة التناول القسري عبر الفم لمدة 30 يوما. تم تحليل المعايير البيوكيميائية (معدل الأنسجة للبروتين والدهون والكربوهيدرات) والإجهاد التأكسدي (مستويات MDA و GSH والأنشطة الإنزيمية لـ GST و GPx و CAT) على مستوى الكلى عند مختلف مجموعات الفئران المعالجة.

تظهر نتائجنا تغييرات ملحوظة في المعايير البيوكيميائية مع زيادة أكيدة ($P > 0.01$) في مستويات الكربوهيدرات والدهون والبروتينات في الكلى عند الفئران المعالجة بـ NiO-NPs مقارنة بالفئران بالشاهدة. وعلاوة على ذلك، لم نلاحظ اختلافات كبيرة في المعايير البيوكيميائية عند الفئران المعالجة بمستخلص قشور الرمان أو مستخلص الرتم أو كليهما بالمقارنة مع الشواهد ($p > 0.05$). كشفت النتائج التي تم الحصول عليها عن علامات الإجهاد التأكسدي في المجموعة المسممة بواسطة NiO-NPs مع زيادة كبيرة ($P > 0.01$) في MDA الكلوي ومستوى GSH وكذلك في النشاط الأنزيمي الكلوي لـ GPx و GST مع انخفاض في مستوى CAT ، العلاج باستخدام EMG و EMRs يحسن المعايير البيوكيميائية و معايير الإجهاد التأكسدي مقارنة بالمجموعة المعالجة بـ NiO-NPs. مع حماية الأعضاء من هجمات الجذور الحرة المؤكسدة الناجمة عن أكسيد النيكل.

في الختام، تبين هذه الدراسة أن العلاجات باستخدام EMG و EMRs يحرض على تأثير مفيد مضاد لسمية NiO-NPs على مستوى الكلى.

الكلمات المفتاحية: الإجهاد التأكسدي، جسيمات النيكل، مستخلصات الايثانول، قشور الرمان، الرتم، الفئران،

المؤشرات البيوكيميائية، الكلية.

Remerciement

Louange à Dieu le tout puissant pour nous avoir accordé la Puissance et la volonté afin de terminer ce travail.

*Nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadreur **Pr Mr. DJABRI Belgacem**, Professeur à la Faculté des sciences exactes et sciences de la Nature et de la Vie, l'université de Tébessa, pour nous avoir proposé ce thème de recherche et pour nous avoir consacré beaucoup de temps et d'énergie à l'encadrement de ce mémoire, et pour sa disponibilité, et sa confiance.*

*Nous voudrions exprimer nos remerciements à **Mme. ZEGHIB Assia**, Maître-de conférences à l'université de Tébessa, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de présider ce jury.*

*Nos sincères remerciements vont également à **Mme. GUEDRI Kamilia**, Maître-de conférence à l'Université de Tébessa, pour avoir accepté d'évaluer et d'examinatrice ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire, surtout **Asma et Karima** dont l'aide et l'amitié nous ont été un grand soutien moral au cours de ces mois de travail.*

*Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidés et encouragés lors de l'élaboration de ce mémoire notamment **Mme Slim Hanene** pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

Nous adressons un vif remerciement à l'ensemble des enseignants qui ont assuré notre formation le long de toutes nos années d'études.

*En fin, nous tenons à remercier nos amies et collègues de la promotion **2020-2021**, pour leur collaboration et pour les bons moments partagés tout au long de notre formation.*

Merci à vous tous

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mon père, le soleil de ma vie, le bon cœur

*La personne la plus digne de mon estime et de mon respect, que dieu te préserve
et te procure santé et longue vie, le meilleur*

Père. Papa, merci

*A ma très chère mère, Si tu savais combien je t'aime, tu
comprendras que déjà sans toi les jours sont blêmes, sans toi
il n'y a plus de joie. Ma fleur maman. Merci*

*A mes sœurs, A mes frères pour leurs soutiens morales, surtout ma chérie
Hanane.*

A tous les membres de ma famille.

A tous mes amis, mes camarades de la promotion 2020-2021.

A tous les personnes que j'aime.

Je dédie ce travail.

Oumaima

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents

A mes sœurs et mes frères

A toute la famille

A mes amis et à tous mes collègues

Thila

Liste des abréviations

Liste des abréviations:

ADN: acide désoxyribonucléique

AGE: Advanced glycation end products

AGPI : acides gras polyinsaturés

ASC : l'ascorbate

CAT : Catalase

CO : Monoxyde de carbone

DHA : Déhydroascorbique

e- : électron

EMG : l'extrait méthanolique de *l'écorce de grenade*

EMRs : extrait méthanolique de *Rétama sphaerocarpa*

eNOS : l'isoforme endothéliale

ERA : espèces réactives d'azote

ERO : espèces réactives de l'oxygène

GPx : Les glutathions peroxydases

GR : Glutathion Reductase

Grx : Glutaredoxines

GS : Glutathion Synthétase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé , Disulfure de glutathione

GST : Glutathion-S-Transférase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HNE : l'hydroxynonanal

HOCl : acide hypochlorique

INOS: L'isoforme inductible

L-Arg: L-Arginine

LPO : peroxydation lipidique

MDA : malondialdéhyde

MDHA : acide monodéhydroascorbique

Mn : le manganèse

MT : métallothionéines

NaCl : Chlorure de sodium

Ni : le nickel

Liste des abréviations

NiO : l'oxyde de nickel

NO: Monoxyde d'azote

NO[•] : monoxyde d'azote

NOS : nitric oxide synthases

NOS : NO Synthase

NPs-NiO : Les nanoparticules d'oxyde de nickel

O₂^{•-} : anion superoxide

OH[•] : le radical hydroxyde

ONOO⁻ : peroxydinitrite

ONOO⁻ : Peroxydinitrite

PUF : Particules ultra-fines

RL : radical libre

RO[•] : les alkoxydes

RO₂[•] : Peroxyle

Se : Sélénium

SOD : les superoxydes dismutases

Srx : Sulphiredoxines

Vit C : Vitamine C

Vit E-OH : Vitamine E

γ-GCS : Gamma-Glutamyl-Cystéine Synthétase

Sommaire

Résumé

Abstract

المخلص

Remerciement

Dédicace

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction 1

Partie Bibliographique

I. Stress oxydatif.....	4
I.1. Définition	4
I.2. Radicaux libres	4
I.2.1. Définition.....	4
I.2.2. Types des radicaux libres	5
I.2.3. Source des radicaux libre.....	6
I.2.4. Les cibles biologiques des radicaux libres	7
I.3. Antioxydants	9
I.3.1. Définition.....	9
I.3.2. Différents types d'antioxydants	10
I.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants	13
II. Nickel et l'oxyde de nickel	15
II.1. Nickel.....	15
II.1.1. Définition	15
II.1.2. Propriétés du Nickel	15
II.1.3. Sources d'exposition.....	16
II.1.4. Toxicocinétique de Nickel	17
II.1.5. Le mécanisme d'action	18

II.1.6. Effets du Nickel sur l'organisme	19
II.2. Oxyde de nickel	20
II.2.1. Définition	20
II.2.2. Structure	20
II.2.3. Préparation de NiO:.....	21
II.2.4. Applications d'oxydes de nickel.....	21
II.2.5. Les nanoparticules d'oxyde de nickel: (Les NPs-NiO).....	21
III. Rétama.....	25
III.1. Généralité.....	25
III.2. Description générale du genre Retama:.....	25
III.3. Systématique du genre Retama.....	26
III.4. Présentation des espèces	27
III.5. Distribution géographique	27
III.6. Intérêt des rétames	28
III.6.1. Intérêt écologique.....	28
III.6.2. Intérêt pharmacologique	28
III.6.2. Intérêt industriel et économique.....	28
IV. Grenade	30
IV.1. Généralité sur la grenade	30
IV.2. Origine.....	31
IV.3. Dénomination communes.....	31
IV.4. Etudes botanique	31
IV.4.1. Description botanique	31
IV.4.2. Classification botanique.....	32
IV.5. Production de grenade	33
IV.5.1. Production de grenade dans le monde	33
IV.6. L'écorce de grenade	33
IV.6.1. Composition chimique de l'écorce de grenade.....	34
IV.7. Utilisation du grenadier	34

IV.7.1. Utilisation traditionnelle de <i>Punica granatum</i>	34
IV.7.2. Consommation de la grenade.....	35
IV.7.3. Utilisation médicinale.....	35
IV.7.4. Autres utilisations	36
IV.8. Activité et intérêt de <i>Punica granatum</i>	36
IV.8.1. Activité anti oxydantes	36
IV.8.2. Activité anti-inflammatoires	36
IV.8.3. Activité anticancéreuse	37
IV.8.4. Activité antidiabétique de <i>P. granatum</i>	37
IV.8.5. Activité antimicrobiennes de la grenade.....	37
IV.8.6. Activité antiulcéreuse	37
IV.8.7. Action cicatrisante de la grenade	37
IV.8.8. Autres propriétés de grenade	38
IV.9. Méthodes d'extraction.....	38
IV.10. Toxicité de grenade	38

Partie Pratique

I. Matériels et méthodes	41
I.1. Matériels Biologique	41
I.1.1. Matériel végétal	41
I.1.2. Matériel animal (modèle biologique)	43
I.2. Méthodes	43
I.2.1. Traitement des souris.....	43
I.2.2. Dosage des métabolites (protéines, lipides et glucides)	43
I.2.3. Analyse des paramètres du stress oxydatif	46
II. Résultat	52
II.1. Effets du NPs-NiO et EMG et EMRs sur les paramètres biochimiques au niveau des reins	52
II.1.1. Effet sur le taux des glucides rénaux.....	52
II.1.2. Effet sur le taux des lipides rénaux	53

II.1.3. Effet sur le taux des protéines rénaux	54
II.2. Effets du nano-NiO et EMG et EMRs sur les paramètres du stress oxydant	55
II.2.1. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA)	55
II.2.2. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)	56
II.2.3. Effet sur l'activité de GPx	57
II.2.4. Effet sur l'activité de GST.....	58
II.2.5. Effet sur l'activité de CAT	59
III. Discussion	62
III.1. Effets du NPs-NiO sur les paramètres biochimiques au niveau des reins.....	62
III.1.1. Effet sur les glucides	62
III.1.2. Effet sur les lipides.....	62
III.1.3. Effet sur le taux des protéines	63
III.2. Effet du NPs-NiO sur les paramètres de stress oxydatif au niveau des reins.....	64
III.2.1. Effet sur le taux d'MDA.....	64
III.2.2. Effet sur le taux GSH.....	65
III.2.3. Effet sur le taux de GPx	66
III.2.4. Effet sur le taux de GST.....	66
III.2.5. Effet sur le taux de CAT	67
III.3. Effet des extraits EMR et EMG sur les paramètres Biochimiques et du stress oxydatif.	67
<u>II.4. Effet protecteur de l'EMR et l'EMG contre les NPs-NiO</u>	<u>68</u>
Conclusion.....	71
Référence Bibliographique.....	73
Annexes.....	91

Liste des figures

Liste des figures

N° de la Figure	Titre	Page
01	Notion du stress oxydant (Baraka-Vidot, 2014)	4
02	Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al., 2007)	6
03	Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (D'après Monteil 2004).	9
04	Les anti-oxydant (clémentine, 2013)	9
05	Les principales réactions de détoxification	11
06	Structure du B-carotène (D'après flora <i>et al.</i> , 2008)	11
07	structures des différents vitamères de la vitamine E	12
08	Les réactions impliquant le glutathion (d'après Lu, 2013)	12
09	Synthèse et dégradation de l'acide ascorbique (Lyebenova and Schoder)	13
10	Schéma générale de la toxico-cinétique de nickel dans l'organisme	18
11	Mécanisme d'action de nickel sur l'ADN	19
12	Poudre d'oxyde de nickel.	20
13	Maille cristalline de la phase NiO (FARES, 2017)	21
14	Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux	22
15	Mécanisme de toxicité des nanoparticules de nickel	23
16	A. <i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb 1, b. <i>Retama monosperma</i> (L.) Boiss 2, c. <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boiss.	25
17	Distribution géographique de trois espèces de <i>Rétama</i> en Algérie (Benmiloud <i>et al.</i> , 2011)	27
18	Feuilles, fleurs et fruits de <i>Punica granatum</i> (Benoît Bock, 2013 cité par Sanaa, 2013)	30
19	L'écorce de la grenade et la membrane blanche	34
20	Grenade (<i>Punica granatum</i>) (Kumari <i>et al.</i> , 2012)	41
21	<i>Rétama sphaerocarpa</i> image personnel	42
22	localisation géographique du <i>Rétama sphaerocarpa</i>	42
23	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al.	44

Liste des figures

	1966).	
24	Variation du taux moyen des glucides rénaux chez les souris traités et témoins (mg/l).	53
25	Variation du taux moyen des lipides rénaux chez Les souris traité et témoins (mg/l)	54
26	Variation du taux moyen des protéines rénaux chez les souris traités et témoins (mg/l).	55
27	Variation du taux moyen des MDA chez les souris traités et témoins (mg/l).	56
28	Variation des concentrations moyennes du GSH renal chez les souris témoins et traités par le NPs-Nio,EMG et EMR.	57
29	Variation des concentrations moyennes du GPx rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-Nio, EMG et EMR.	58
30	Variation des concentrations moyennes du GST rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-Nio, EMG et EMR.	59
31	Variation des concentrations moyennes du CAT rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-Nio, EMG et EMR.	60

Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

N° de le Tableaux	Titre	Page
01	Principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003)	5
02	Réaction de peroxydation lipidique	7
03	Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel	15
04	Propriétés physico-chimiques des dérivés de nickel	16
05	Propriétés physico-chimiques des dérivés de nickel	26
06	Classification botanique du grenadier (Spichiger <i>et al.</i> , 2002 cité par Benyahia et Hadbi, 2016)	32
07	Composition biochimique de <i>Punica granatum</i> (Fournier 1948).	33

introuduction

Introduction

Introduction

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais en faible quantité. Le plomb, le mercure, le fer, le cadmium, le chrome et le nickel sont les principaux métaux émis dans l'air par les activités humaines. Ces polluants peuvent s'avérer fortement toxiques et détériorer les sols, les eaux, les forêts et les cultures en plus de leurs effets sur l'homme (**Chen et Seaton, 1998 ; Crump, 1999**).

Les métaux lourds tels que le nickel (Ni) s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires (**Harber et al., 2000 ; Lauwerys, 2003**). La nature de leur toxicité peut varier en fonction de la forme sous laquelle ils pénètrent dans l'organisme (métal lui-même, vapeur, dérivés inorganiques ou organiques, hydro-ou liposoluble...etc.). Le nickel se présente sous des formes chimiques différentes, mais il ne pénètre efficacement dans les cellules que sous la forme cationique bivalente (Ni^{2+}) ou sous forme de chlorure ou de sulfate de nickel. L'ion nickel peuvent provoquer des lésions directes sur tous les composants cellulaires : peroxydation des lipides, protéines et des acides nucléiques, due aux attaques des radicaux libres générées par le nickel (**Audrey et al., 2015**). Avec ces radicaux ou indirectement en produisant des peptides comme les métallothionéines ou le glutathion (**Lou et al., 2013**). De nombreuses études rapportent une production massive d'espèces oxydantes et l'inhibition des activités des principales des enzymes antioxydants due à la cytotoxicité de Ni dans la cellule ce qui peut favoriser une mort cellulaire excessive ou une évolution tumorale (**Laib et Zeribit, 2019**). Les effets oxydatifs des métaux lourds peuvent être réduits par les antioxydants endogène et exogène puissants protégeant le corps contre les attaques des radicaux libres (**Hattiwale et al., 2013**).

Punica granatum est considéré comme pharmacologiquement actif en raison de la présence de composés phytochimiques abondants. La grenade est une source de polyphénols en particulier son écorce qui en contient la plus grande quantité. ces derniers sont connus pour leur activité antioxydante (**Li et al., 2005**).

Par ailleurs, le genre *Rétama* avec son espèce *Rétama sphaerocarpa* possède une large gamme de produits pharmaceutiques ayant des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, hypoglycémiques, diurétique, hypotenseur et ocytocique (**Touati et al., 2015**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intoxication induite par les NPs-NiO en s'intéressant particulièrement aux altérations biochimiques et aux troubles du stress oxydatif

Introduction

liés à une exposition subchronique à ces nanoparticules et d'apprécier l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *l'écorce de grenade* et l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* chez les souris. Afin d'atteindre cet objectif, ce mémoire traitera :

- ❖ Une partie bibliographique rapportant des informations de base qui servent à faciliter la compréhension du travail expérimental.
- ❖ Une partie expérimentale dans laquelle seront exposés: le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats et leur discussion

CHAPITRE I

STRESS OXYDATIF

I. Stress oxydatif

I.1. Définition

Comme illustré dans la **Figure 01**, le stress oxydant peut être défini comme le produit d'un déséquilibre en faveur des espèces pro-oxydantes au détriment des espèces antioxydantes (**Fridovich, 1978**). Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants (radicaux libres), soit d'une altération des mécanismes de défense antioxydant. Les premiers travaux dans le domaine ont montré le rôle important joué par les intermédiaires oxygénés, appelés également radicaux libres, dans les phénomènes physiologiques et leurs effets délétères dans les processus cellulaires (**Gerschman *et al.*, 1954 ; Gilbert, 2000**).

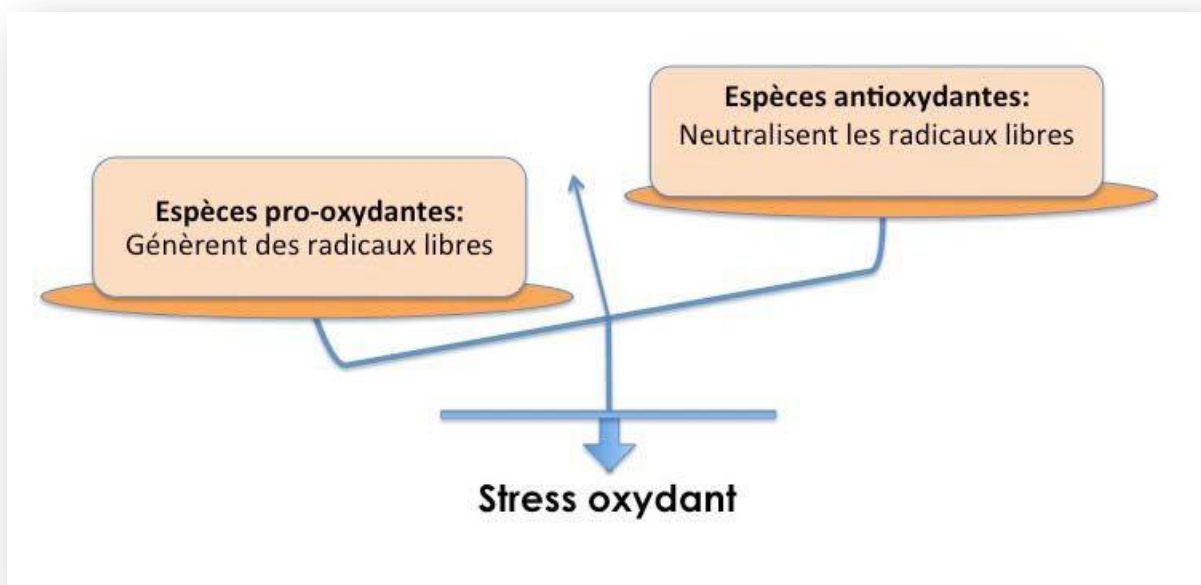


Figure 01: Notion du stress oxydant (Baraka-Vidot, 2014).

I.2. Radicaux libres

I.2.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes, ions ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (**Mac Laren, 2007**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène, ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote, ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité (**Delattre *et al.*, 2005a**).

I.2.2. Types des radicaux libres

Il existe deux types de radicaux libres : espèces réactives de l’oxygène et espèces réactives de l’azote.

I.2.2.1. Espèces réactive de l'oxygène

Les ERO sont des dérivés de l'oxygène ou certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnel. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants et la cause majeure du stress oxydatif dans ces derniers (**valko et al., 2007**)

Comme illustré dans **tableaux 1**, Ce sont soit des espèces active radicalaires de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyde (OH^{\cdot}), les peroxydes (ROO^{\cdot}), ou les alkoxydes (RO^{\cdot}), soit des espèces actives non radicalaire de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou l'azone (O_3). Les premières dérivent de l'oxygène par les réductions monoélectroniques, alors que les dernière dérivent de l' O_2 et peuvent être des précurseurs de radicaux. (**krieger. 2005 ; noguchi. 2002**).

I.2.2.2. Les espèces réactives azotées

Les ERA; il s’agit du monoxyde d’azote (NO^{\cdot}) et du peroxydinitrite ($ONOO^{\cdot}$) (**Tableau 1**). Le monoxyde d’azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l’arginine par les "nitric oxide synthases" (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L’isoforme inductible iNOS de l’enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, produisant ainsi de grandes quantités de monoxyde d’azote comparativement aux faibles quantités générées par l’isoforme endothéliale (eNOS) (**Rao, 2004**).

Tableau 1. Principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003).

Nom	Symbole
Anion superoxide	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Monoxyde d’azote	NO^{\cdot}
Peroxyde d’hydrogène	H^2O^2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	1O_2
Peroxydinitrite	$ONOO^{\cdot}$
Radical alcoxyle	RO^{\cdot}

Radical peroxy	ROO [•]
----------------	------------------

I.2.3. Source des radicaux libres

Les ROS sont à l'origine de la génération d'un stress oxydant et peuvent provenir de sources endogènes ou exogènes (**figure 02**).

Les systèmes endogènes pouvant induire la production de ROS sont en général des processus biologiques utiles pour les cellules. Nombreux sont les ROS qui participent à des réactions biologiques. Par exemple, lors de l'auto-oxydation des aldoses, il y a réduction de l'oxygène moléculaire dans des conditions physiologiques qui génère des alpha-cétoaldéhydes, de l'H₂O₂ et des intermédiaires radicalaires. (**Wolff et al., 1991**).

- ✓ La synthèse de prostaglandines, catalysée par la lipooxygénase et la cyclo-oxygénase, implique aussi une production de radicaux libres. Au niveau de la membrane plasmique (**Orient et al. 2007**).
- ✓ Aussi, lors de la respiration mitochondriale, dans la chaîne de transport des électrons, l'oxygène moléculaire est converti en radicaux superoxyde. (**Inoue et al. 2003**).
- ✓ Les réactions d'oxydations de protéines glyquées induisent aussi une production de ROS (La production d'AGE qui nécessite des étapes d'oxydation). (**Rondeau et al. 2008**).

Il existe également des sources exogènes telles que les polluants photochimiques, le tabac, les drogues et les radiations ionisantes, pénétrant dans l'organisme par la respiration, l'alimentation ou les muqueuses (**Kohen et Nyska. 2002 ; Blache et al., 1992**). La surproduction de ROS peut être aussi induite par des processus de type ischémie-reperfusion qui est à l'origine d'une partie des rejets des greffes (**Serrano et al., 2000**).

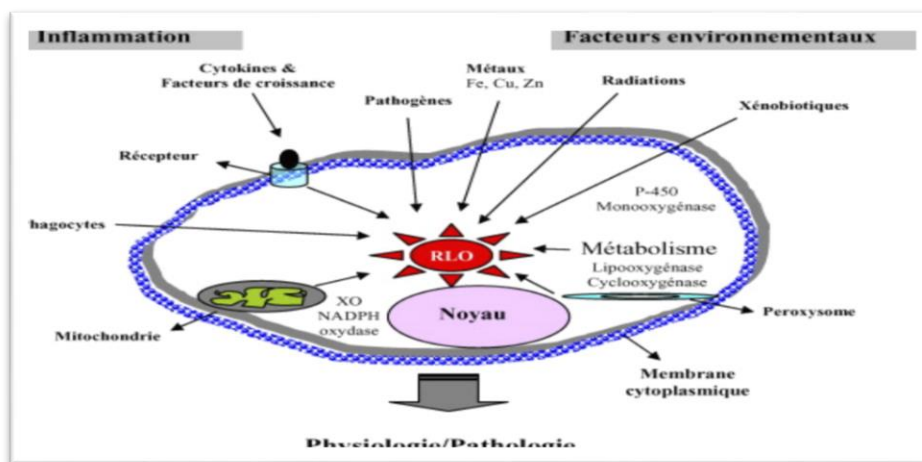


Figure 02 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al., 2007)

I.2.4. Les cibles biologiques des radicaux libres

En raison de leur grande réactivité, les EROs peuvent s'attaquer à de nombreuses cibles biologiques dont les lipides, les protéines et les acides nucléiques comme le montre la **Figure 03**.

I.2.4.1. La peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical OH[·] capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, (**tableaux 2**) oxydé en radical RO₂[·]. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical RO₂[·] formé se transforme en ROOH au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution: être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical RO₂[·], après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (HNE) (**Esterbauer H et al, 1992**).

Tableau 2 : Réaction de peroxydation lipidique (Clémentine, 2013).

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + HO\cdot \longrightarrow R\cdot + H_2O$
Propagation	$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$
Terminaison	$R\cdot + R\cdot \longrightarrow RR$ $ROO\cdot + R\cdot \longrightarrow ROR$ $ROO\cdot + ROO\cdot \longrightarrow ROOR + O_2$

La peroxydation lipidique se déroule selon trois étapes : une première d'initiation qui aboutit à la formation d'un radical qui dans une seconde étape dite de « propagation » conduit à la formation d'un second radical. Ces deux radicaux vont réagir ensemble lors de la terminaison, troisième étape de la réaction dont les produits finaux sont des composés stables (ROOR) et de l'oxygène.

I.2.4.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraînent des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur dégradation par les protéases (**Squier, 2001**). Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes (**Levine et Stadtman, 2001**). L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols (**Davis et al, 2001**). Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydantes qui contiennent très souvent des groupements thiols (-SH). L'intégrité GSH des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) (**Gruber et al., 2006 ; Jacob et al., 2006**).

I.2.4.3. Dommage de l'ADN

Les ERs, et plus particulièrement le radical hydroxyle (HO), peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation. Les EROs peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) qui peut être ensuite mesuré comme marqueur de stress oxydant. Ces modifications vont ainsi perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagenèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (**Valko et al., 2006**).

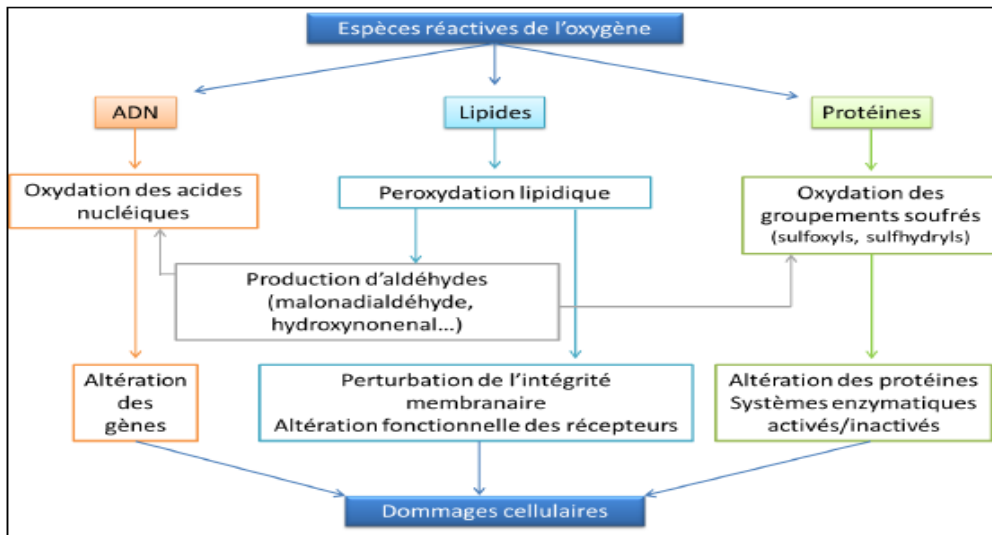


Figure 03 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Monteil 2004).

I.3. Antioxydants

I.3.1. Définition

Un anti-oxydant est une substance qui, à faible concentration, prévient ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat (Halliwell *et al.*, 1990). Ils ont pour rôle d'empêcher la formation de radicaux libres, de permettre leur élimination ou bien de réparer les dégâts causés par les radicaux libres (clémentine, 2013).

Il existe différentes sortes d'anti-oxydants : des enzymes, des facteurs de transcription, des composés de bas poids moléculaire piégeant les radicaux libres (figure 04).

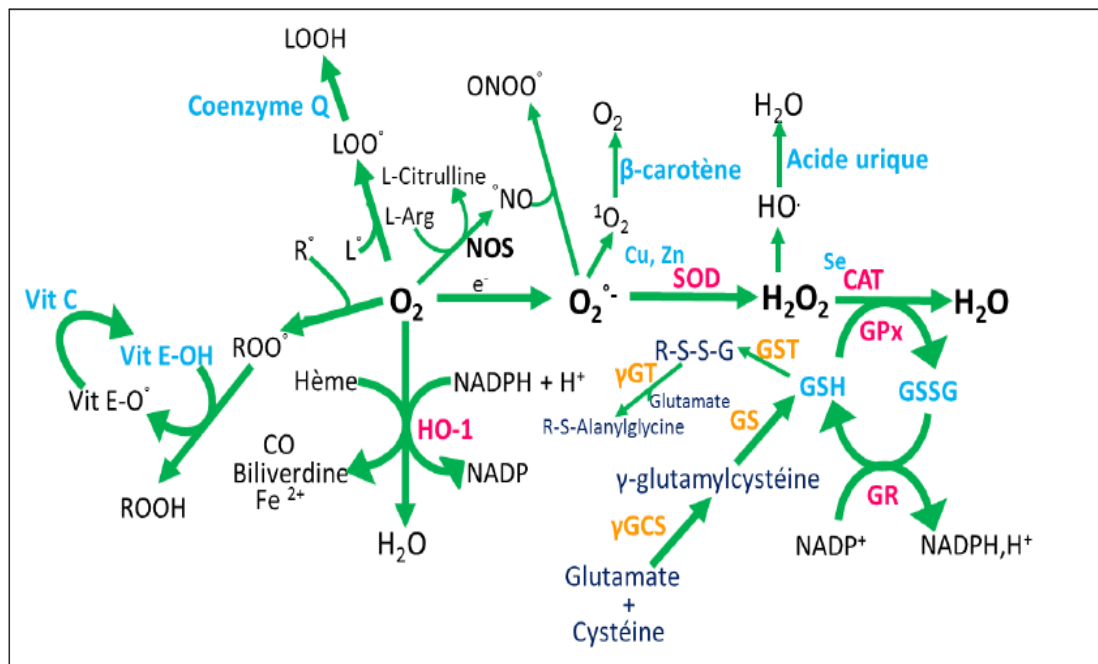


Figure 04 : Les anti-oxydant (clémentine, 2013)

Les couleurs utilisées permettent d'identifier les différents anti-oxydants : en rose, ce sont les enzymes anti-oxydantes, en jaune orangé celles impliquées dans la synthèse du glutathion et en bleu ciel les antioxydants naturels (vitamine, oligoéléments) ainsi que le glutathion. La synthèse du glutathion est représentée en bleu marine.

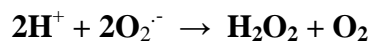
I.3.2. Différents types d'antioxydants

Il existe de nombreux systèmes de défense antioxydant endogène ou exogène, enzymatique ou non (**Rezaie et al., 2007**).

I.3.2.1. Système antioxydant enzymatique: Trois enzymes antioxydants majeures impliquées dans la défense antioxydante (**figure 05**) sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx) et la catalase (CAT).

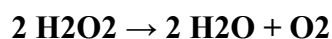
a. Superoxydes dismutases (SOD)

La SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante « anti-O₂^{•-} » la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale. La SOD catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en dioxygène et H₂O₂ selon la formule: (**Afonso et al. 2007**).



b. Catalase (CAT)

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en Eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve Préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (**Powers et Jackson. 2008**).



c. Glutathions peroxydases (GPx):

Les glutathions peroxydases présentes dans la plupart des tissus de mammifères, sont des enzymes formées de quatre sous unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elles catalysent la réduction par le glutathion réduit (GSH) du peroxyde d'hydrogène en eau et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (ROOH) en alcools et des espèces radicalaires en espèces non radicalaires. La réaction mise en jeu est la suivante (**Reichel, 2010**).



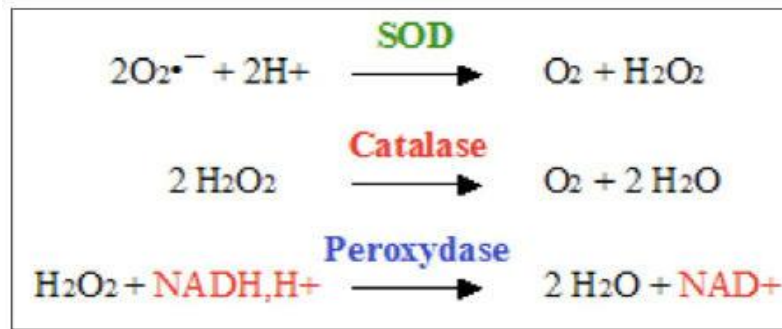


Figure 05. Les principales réactions de détoxification (Jennifer, 2014)

I.3.2.2. Système antioxydant non enzymatique

a. Caroténoïdes (Vitamine A)

les caroténoïdes sont une classe de pigment naturels présents principalement dans les plantes et les fruits et qui ont typiquement 40 atomes de carbone et plusieurs doubles liaisons conjuguées (qian *et al.*, 2012) ils sont synthétisés par les plantes et de nombreux microorganismes (bai *et al.* 2016). Parmi les caroténoïdes. Le **β -carotène** possède l'activité provitaminique la plus élevée (Figure 06). il pourrait donc constituer un bon élément pour l'incorporation dans les aliments fonctionnels (boon *et al.*, 2010).

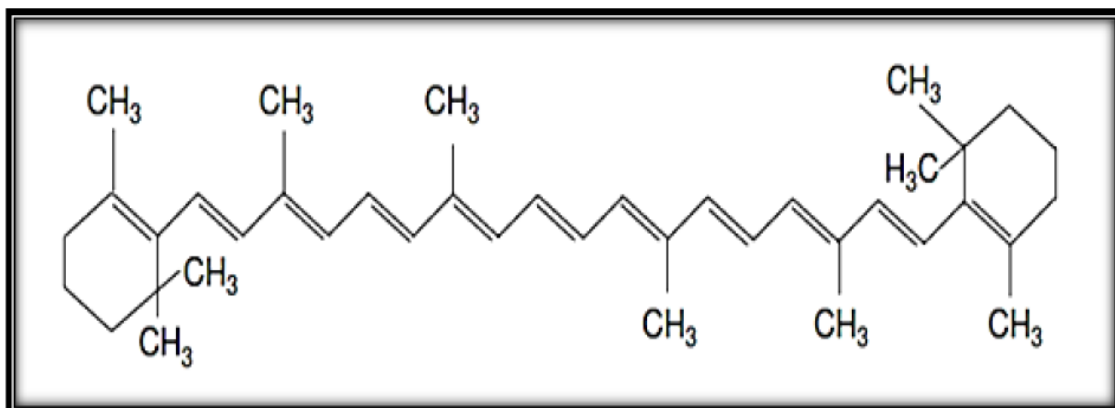


Figure 06 : Structure du B-carotène (D'après flora *et al.*, 2008)

b. Tocophérol (vitamine E)

terme générique vitamine E regroupe deux grands groupes de molécules : les tocophérols et les tocotriénols .comprenant chacun 4 vitamines α β γ et δ (azzi, 2007 ; jensen et lauridsen, 2007 ; traber et atkinson, 2007 ; brigelius-flohe, 2009 ; aggarwal *et al.*, 2010). Les formes α β γ et δ sont nommées sur la base du nombre et la position des groupements méthyles dans le cycle chromanol (palozza *et al.*, 2008 ; masaki, 2010). Parmi les quatre tocophérols et les quatre tocotriénols trouvés dans les aliments, seulement l' α -tocophérol répond aux besoins humains en vitamine E (traber et atkinson, 2007) (Figure 07).

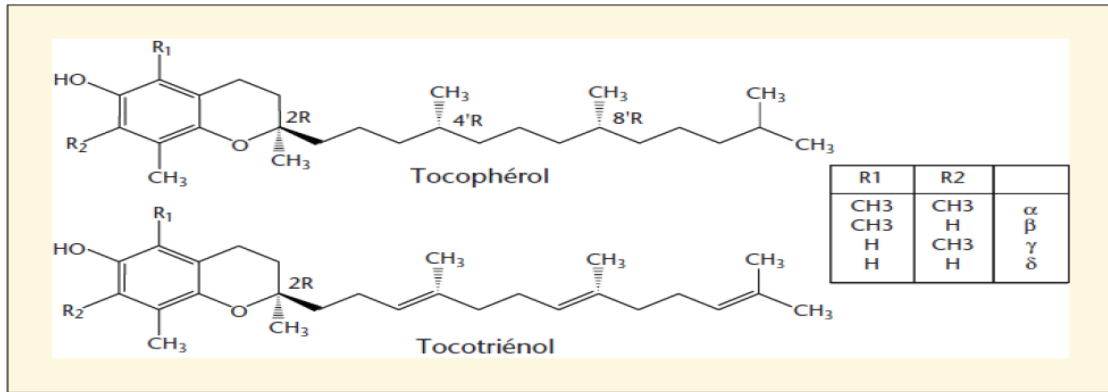


Figure 07:structures des différents vitamère de la vitamin E (Adapté par Landrier, 2011).

c. Glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (figure 08). Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers and Jackson 2008).

Le rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG permet de caractériser le statut redox de la cellule et constitue aussi un bon marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H2O2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et al., 1992).

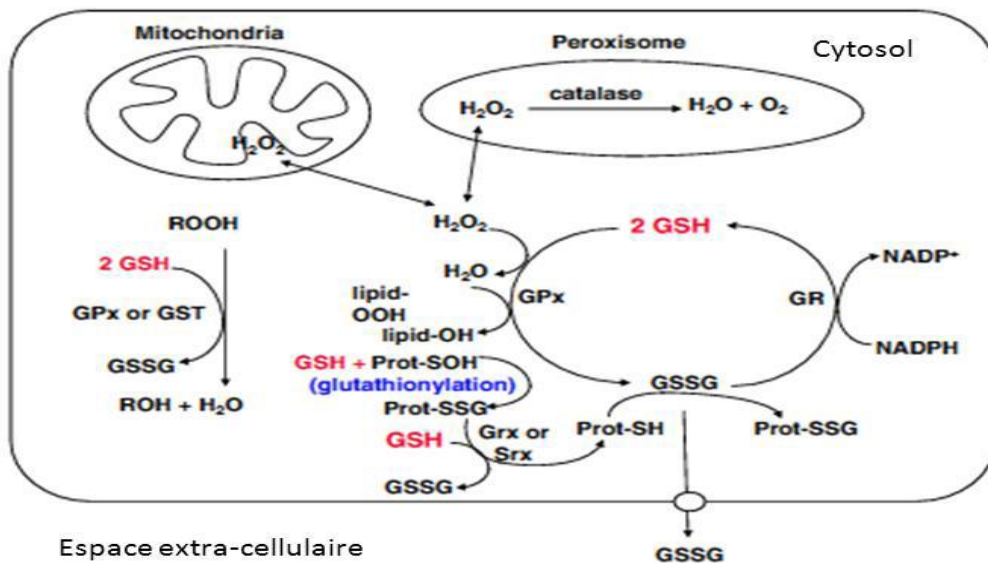
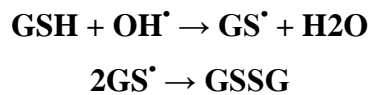


Figure 08 : Les réactions impliquant le glutathion (d'après Lu, 2013)

d. Ascorbate (ASC):

L'acide l'ascorbique ou vitamine C est un antioxydant omniprésent dans les plantes. L'ASC joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire (Foyer *et al.*, 1994). Il est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydants. L'ASC est synthétisé à partir de D-glucose et agit comme un réducteur dans le cytosol et les chloroplastes (Chen et Gallie, 2004 ; Foyer et Noctor, 2005a). Il se lie avec le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux de tocophérol pour donner de l'acide monodéhydroascorbique (MDHA) ou de l'acide déhydroascorbique (DHA) comme le montre la Figure 09.

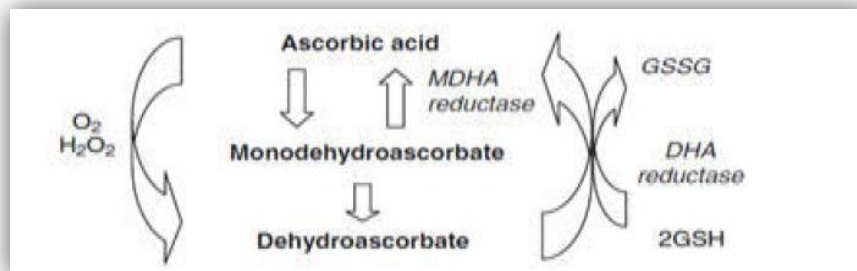


Figure 09: synthèse et dégradation de l'acide ascorbique (Iyebenova and Schoder, 2010)

e. Oligoéléments

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

I.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent de différentes manières :

- ❖ Ils peuvent empêcher la formation directe des radicaux libres.
- ❖ Ils peuvent faire la liaison avec les radicaux libres et les détruire.
- ❖ Renforcer le système immunitaire de défense.

Réparer les dommages résultants de radicaux libres (Lamina *et al.*, 2013).

CHAPITRE II

NICKEL ET OXYDE DE NICKEL

II. Nickel et oxyde de nickel

II.1. Nickel

II.1.1. Définition

Le nickel est le 23^{ème} éléments le plus répondu dans l'écorce terrestre. Celle-ci en contient en effet 0,0084 jusqu'à une profondeur de 16 km, le nickel est un métal de couleur blanche argentée à cassure fibreuse. Il est malléable et ductile et est plus dur de tous les métaux usuels. Il est ferromagnétique jusqu'à 355° (point de curie) et bon conducteur de chaleur et d'électricité (**Reguig, 2008**).

II.1.2. Propriétés du Nickel

Le nickel est un métal de transition voisin du fer et de cobalt, de couleur gris clair légèrement jaunâtre sous sa forme pure. Il est ferromagnétique, avec un point de Curie de 353 °C. Il est résistant à la corrosion aux températures ordinaires et s'allie facilement avec d'autres métaux, d'où son usage majeur pour les aciers inoxydables très largement utilisés et divers alliages. Le nickel absorbe facilement l'hydrogène et a des propriétés catalytiques. Le nickel métallique est un allergisant cutané pour environ 12% de la population (bracelets de montre, bijoux fantaisie ...). (**tableau 03**) **Fiche de synthèse sur la criticité des métaux**

Tableau 03 : Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel (Cotton et wilkinson 1988 ; Nieboer et *al.*, 1988).

Symbole	Ni
Numéro atomique	28
Masse atomique	58,71
Structure cristalline	Cubique à face centrée (a = 0,352 nm)
Densité (à 20°)	8,902 g/cm ³
Température de fusion	1452 °C
Température d'ébullition	2732°C
Résistivité électrique à 20 °C	6,9 μ ohm.cm
Conductibilité thermique à 0-100 °C	90,9W/ (m.K)
Configuration électronique	[2,8,6] 3d8 4s2

Le nickel est utilisé couramment pour fabriquer des alliages de métaux solides et durables. On retrouve ce métal dans de nombreux objets courants comme les casseroles inoxydables, les pièces de monnaie et les piles rechargeables. Les propriétés annoncées par **ATSDR** de ces dérivés sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Propriétés physico-chimiques des dérivés de nickel (ATSDR, 2005).

Propriétés	Sulfate de nickel	Acétate de nickel	Chlorure de nickel	Nitrate de nickel	Oxyde de nickel
Formule chimique	NiSO ₄	Ni (CH ₃ CO ₂) ₂	NiCl ₂	Ni (NO ₃) ₂	NiO
Poids moléculaire	154,75	176,80	129,60	182,72	74.69
Couleur	Jaune verdâtre	Vert	Jaune doré	Vert	Vert
Etat physique	Solide	Solide	Solide	Solide	Solide
Point de fusion	840 °C	/	1001 °C	56,7 °C	1984°C
Point d'ébullition	Dissocié à 840 °C	16,6 °C	973 °C	136,7 °C	-
Densité	4,01 g/cm ³	1,798 g/cm ³	3,55 g/cm ³	2,05g/cm ³	6.67g/cm ³

II.1.3. Sources d'exposition

II.1.3.1. Sources environnementaux

L'importance des risques liés au nickel serait limitée essentiellement à l'exposition professionnelle (**Bruaux & Lafontaine, 1978 ; Haguenoer et al., 1982**). En fait les risques professionnels sont importants dans la métallurgie du nickel mais aussi chez les Nickeleurs. Il ne faut pas oublier la présence du Ni dans les ciments, les liquides de coupe, les détergents, les charbons bitumineux, les peintures et les talcs. Une exposition importante au Ni concerne les garagistes, les soudeurs, les fondeurs et raffineurs de nickel et des ouvriers de l'industrie chimique (**Clemmenson et al., 1981**).

II.1.3.2. Sources industrielles

Le tabagisme et les implants dentaires ou orthopédiques présentent des niveaux faibles d'exposition au nickel (**Lauwerys, 2000**). Les émissions dues à la consommation de combustibles fossiles. L'exposition professionnelle, se produit principalement dans

l'exploitation minière, le raffinage, la production d'alliages, la galvanoplastie et le soudage. L'exposition humaine au nickel se produit principalement par inhalation et par ingestion et est particulièrement élevée chez les travailleurs de la métallurgie du nickel (**kaspirzak, 2003**).

II.1.4. Toxicocinétique de Nickel

Comme illustré dans la **Figure 10**, Le nickel dans l'organisme Subit des transformations (absorption; distribution; excrétion)

II.1.4.1. L'absorption

Le nickel et ses composés sont absorbés par les voies respiratoires et dans une moindre mesure par le tube digestif. Environ 20 à 35% du nickel inhalé (sous forme de composés peu solubles) sont absorbés dans le sang à partir des voies respiratoires (**ATSDR, 2005**). Chez des rats exposés par gavage à une dose unique de différents composés du nickel (10 mg de nickel) dans une solution saline, le pourcentage de la dose absorbée varie de 0,01 % pour le monoxyde de nickel, 0,47 % pour le sulfure de nickel, 11,12 % Chez des rats exposés par gavage à une dose unique de différents composés du nickel (10 mg de nickel) dans une solution saline, le pourcentage de la dose absorbée varie de 0,01 % pour le monoxyde de nickel, 0,47 % pour le sulfure de nickel, 11,12 %.

II.1.4.2. La distribution

Dans le sérum, le nickel est lié à l'albumine, la L-histidine et l' α 2- macroglobuline. Chez les humains, les rats et les bovins, la fixation du nickel a l'albumine sérique se réalise au niveau d'un résidu histidine (**Sarkar, 1984**). La distribution du nickel varie selon la voie d'exposition. Des travailleurs exposés par inhalation au nickel présentent des taux pulmonaires plus élevés que la population générale. Après exposition par voie orale, la distribution du nickel s'effectue principalement dans les reins, mais il est également retrouvé au niveau du foie, du cœur, des poumons, du tissu adipeux, du système nerveux périphérique et du cerveau (**ATSDR, 2005**).

II.1.4.3. Rxcrétion

L'excrétion est principalement rénale ; elle est assez rapide. Le nickel ingéré (non absorbé) est excrété dans les fèces. La demi-vie plasmatique est de 12 à 24 heures et la demi-vie urinaire chez les travailleurs exposés est comprise entre 17 et 53 heures, selon l'hydrosolubilité des composés (Chantal, 2000). Après administration intratrachéale, la voie d'élimination du nickel chez les rats dépend de la solubilité des composés. Pour les composés solubles (chlorure, sulfate), environ 70 % de la dose administrée est excrétée dans l'urine en 3 jours. Pour les composés moins solubles (Oxyde, sulfure de nickel), une grande partie de la

dose est excrétée dans les fèces (ATSDR, 2005). Après administration par voie orale de chlorure de nickel à des rats, de 94 à 97 % est excrété dans les fèces et de 3 à 6 % dans les urines (Ho et Furst, 1973).

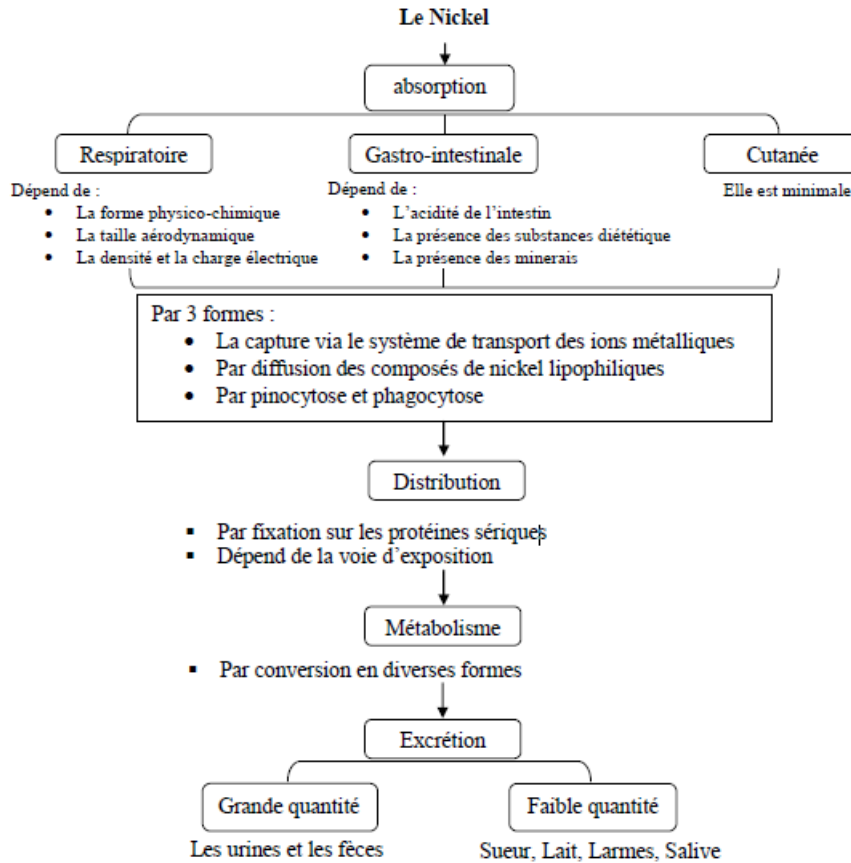


Figure 10: Schéma générale de la toxico-cinétique de nickel dans l'organisme (Alexandra *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2008).

II.1.5. Le mécanisme d'action

Une fois entré dans la cellule, les effets du nickel dépendent de sa solubilisation et des doses présentes d'ions Ni^{2+} . La capacité de captage par les cellules est directement corrélée à la capacité des dérivés du nickel à élever les taux intracellulaires (figure 06). Les structures cristallines de NiS_2 sont accumulées dans les vacuoles cytoplasmiques en périphérie du noyau où il se produit une acidification progressive avec dissolution puis relargage de Ni^{2+} à la périphérie du noyau où ont lieu des interactions préférentielles avec les régions hétéro chromatiques. Il se forme alors des complexes ADN-protéines et des cassures de brins (Mouffok, 2008).

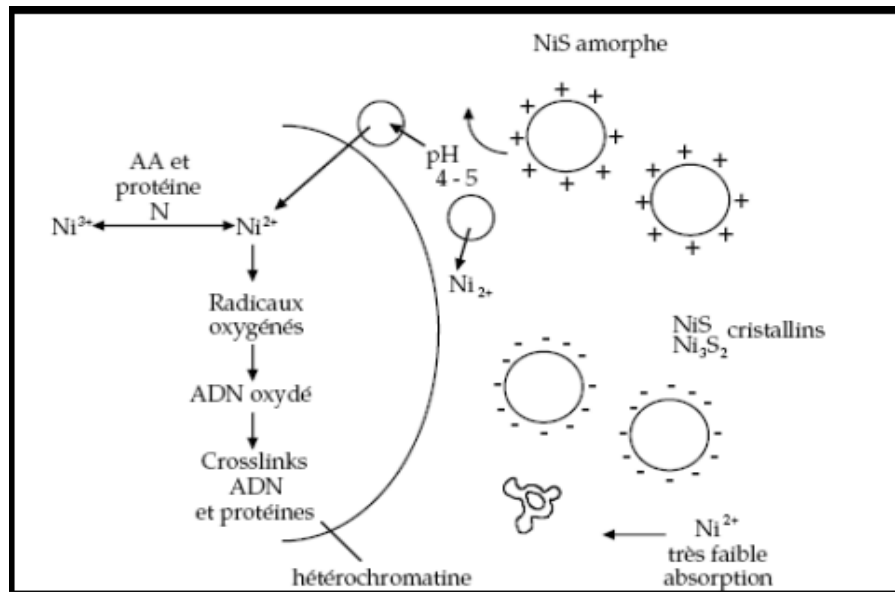


Figure 11: Mécanisme d'action de nickel sur l'ADN (Snow et Costa., 1998).

II.1.6. Effets du Nickel sur l'organisme

II.1.6.1. Effets du nickel sur les reins

L'exposition au Nickel se traduit par le dysfonctionnement de la fonction rénale. Une augmentation des taux de la créatininémie et de l'urémie apparaît après le traitement avec le NiCl_2 dans l'eau de boisson, ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, confirmée par une altération structurale du rein, ce qui rendrait difficile les fonctions rénales de filtration et de sécrétion tubulaire. Le nickel induit par ailleurs, une baisse de l'expression de la protéine de stress (Hsp72) et de la synthèse des métallothionéines (MT) au niveau des tissus rénaux (Hfaïedh et al. 2005).

II.1.6.2. Effets du Nickel sur le système hépatique

Chez le rat, l'intoxication par le Nickel témoigne d'une dégénérescence des hépatocytes. Ainsi, le sulfate de nickel administré par voie cutanée ou orale provoque chez le rat des effets hépatiques (Sunderman et al., 1988 ; Pari et Prasath, 2008). De plus, chez les rats mâles et chez les souris, le sulfate de Nickel administré dans l'eau de boisson provoque une chute du poids du foie (Obone et al., 1999), alors que par gavage il ne provoque pas de chute du poids du foie chez les rats.

II.1.6.3. Effets du Nickel sur l'appareil respiratoire

L'activité ciliaire des voies respiratoires supérieures a été réduite chez des hamsters et des souris exposés pendant 2 heures à du dichlorure de nickel en aérosol (Adalis et al., 1978 ; Gardner., 1980). Parmi les effets observés dans les voies respiratoires, on compte une inflammation des poumons accompagnée d'une pneumonie nécrosante, d'une augmentation du

nombre de macrophages alvéolaires chez les souris et une dégénérescence de l'épithélium respiratoire chez les rats et une augmentation du nombre des ganglions lymphatiques pulmonaires (Wehner *et al.*, 1981).

II.2. Oxyde de nickel

II.2.1. Définition

L'oxyde de nickel (NiO) connu sous le nom de (bunsénite) (Nandy *et al.* 2007). Est un oxyde très acide amélieore à doux. Il se présente sous forme d'une poudre grise verdâtre suivant le mode de préparation (**figure 12**), plus ou moins dense et plus moins noire. L'oxyde de nickel de type granuleux (oxyde de nickel vert), appelé aussi protoxyde de nickel (Perusin, 2004).



Figure 12 : Poudre d'oxyde de nickel.

II.2.2. Structure

Le NiO adopte la structure NaCl, avec des sites octaédriques Ni (II) et O²⁻. La structure conceptuellement simple est communément appelée structure de sel de roche. Comme beaucoup d'autres oxydes métalliques binaires, NiO est souvent non stoechiométrique, ce qui signifie que le rapport Ni: O s'écarte de 1:1. Dans l'oxyde de nickel, ce non stoechiométrie s'accompagne d'un changement de couleur, le NiO stoechiométriquement correct étant vert et le NiO non stoechiométrique étant noir (Fares, 2017) (**figure 13**).

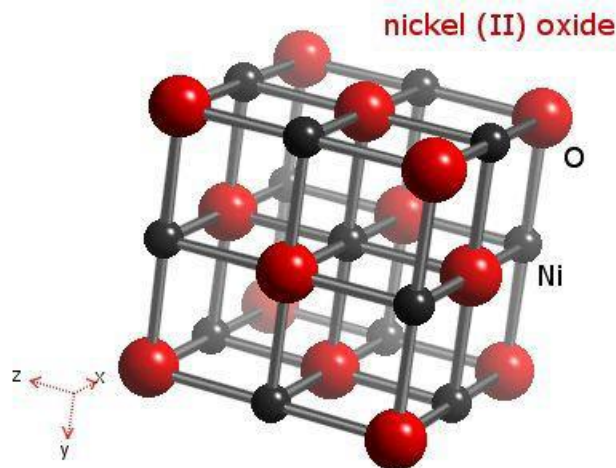


Figure 13 : Maille cristalline de la phase NiO (Fares, 2017)

II.2.3. Préparation de NiO:

L'oxyde de nickel NiO peut être préparé par plusieurs méthodes (Adhikari *et al.*, 2018)

:

- ❖ La méthode la plus simple et la plus réussie de préparation est par pyrolyse d'un alliage des composés de nickel (II) tels que l'hydroxyde, le nitrate et le carbonate, ce qui donne une poudre vert clair.
- ❖ La Synthèse de NiO Par chauffage de nickel au-dessus de 400 ° C, la poudre de nickel réagit avec l'oxygène pour donner de NiO.
- ❖ Dans certains procédés industriels, l'oxyde de nickel est réalisé par chauffage d'un mélange de poudre de nickel et de l'eau à 1000 ° C, la vitesse de cette réaction peut être augmentée par l'ajout de NiO.
- ❖ La Synthèse de l'oxyde de nickel par chauffage le métal (Ni) aux présences de l'oxygène peut produire une poudre gris/noire qui indique la non-stoechiométrie).

II.2.4. Applications d'oxydes de nickel

Les couches semi-conductrices et transparentes d'oxyde de nickel ont été notamment également utilisées dans d'autres domaines à savoir:

- Couche absorbante pour le thermique solaire (Varkey et fort, 1993)
- Oxyde à large bande interdite (kunz, 1981)
- Détecteur de gaz (Adler et Feinleib, 1970)
- La photo électrolyse (Gover et Hode, 1994)
- Composants électrochromique (klug et Alexender, 1974)
- Electrode positive dans les batteries (chen *et al.*, 2006)

II.2.5. Les nanoparticules d'oxyde de nickel: (Les NPs-NiO)

II.2.5.1. Définition

On appelle nanoparticules des particules de matière de quelques millièmes de millimètre (**figure 14**).

Les nanoparticules sont des particules ultra-fines (PUF) dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres (millardième de mètre). Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. La définition par l'échelle siffut cependant pas à décrire tous les aspects des nanoparticules (**Baratli, 2016**).

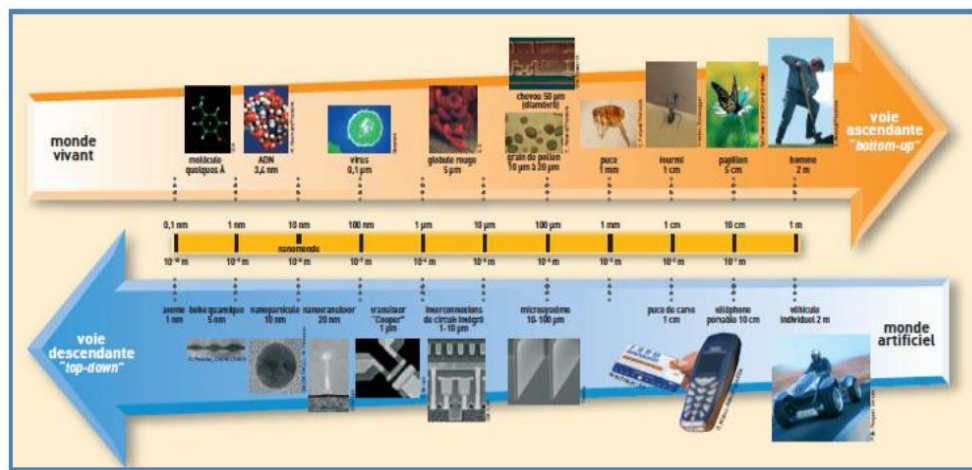


Figure 14 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (**Commissariat à l'Énergie Atomique., 2005**).

II.2.5.2. Les Types

On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance (**Baratli, 2016**):

- Les nanoparticules d'origine naturelle résultant essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère (feux de forêt, lave de volcan).
- Les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs.
- Les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées.

II.2.5.3. Utilisation

Le NPs-NiO est largement utilisé dans diverses applications telles que les catalyseurs, les cellules solaires, les diodes électroluminescentes, les batteries au lithium, les RRAM en informatique, les capteurs électrochimiques et les biosenseurs (**Rao & Sunandana, 2008**).

L'utilisation variée des NPs de NiO multipliant les risques de contact aux animaux voire l'être humain (Ahamed *et al.*, 2013).

II.2.5.4. Les nanoparticules d'oxyde de nickel

L'étude de la toxicité de NPs-NiO en utilisant plusieurs types de lignées cellulaires a fait l'objet de nombreuses publications. Les effets observés sont divers : (i) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules est toujours rapportée. Dans la cellule, les ERO sont naturellement fabriquées lors des processus métaboliques, cependant leur présence en quantités anormalement élevées peut entraîner des dommages parfois irréversibles (Yin *et al.*, 2012). (ii) Les NPs sont capables d'induire une peroxydation des membranes phospholipidiques. (iii) La présence de NPs dans les cellules peut pareillement causer des dommages de l'ADN en altérant les fonctions cellulaires (Figure 15). (iv) La mort cellulaire, des ralentissements de prolifération et également des modifications dans les cycles cellulaires sont aussi des conséquences rapportées (Siddiqui *et al.*, 2012 ; Ahamed *et al.*, 2013 ; Capasso *et al.*, 2014).

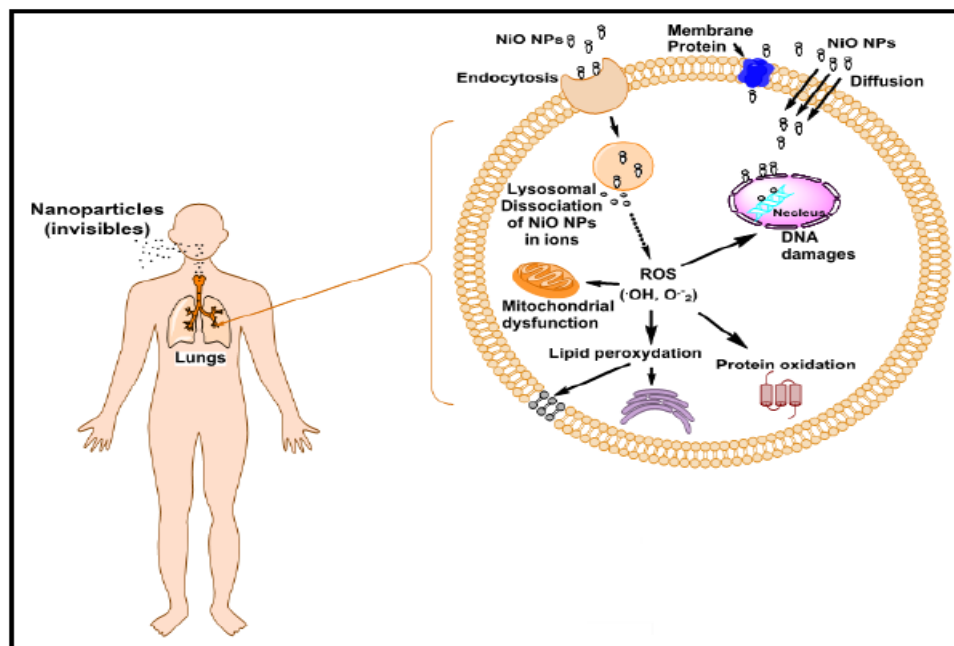


Figure 15: Mécanisme de toxicité des nanoparticules de nickel (Khiari *et al.* 2018).

CHAPITRE III

RETAMA

III. Rétama

III.1. Généralité

Les rétames sont des légumineuses arbustives. Occupant les zones arides, semi-arides et côtières. D'après Ighilhariz (1990) le genre rétama est caractérisé par une large distribution géographique et est originaire du Nord-Ouest africain probablement des Iles canaries. Elles sont qualifiées de plantes fixatrices de dunes. Leur nom dérive du nom biblique (rotem) qui fut changé par les arbres en (r'tem) ou (retam) (Zohary, 1962 ; shallaby *et al.*, 1972).

III.2. Description générale du genre *Retama*:

Retama est un arbuste ou arbrisseau de un à quatre mètres, portant de longs rameaux ‘joncailles’ dépourvus ou avec peu de feuilles dans le but de s'adapter au milieu désertique où l'eau est rare. La chlorophylle se trouve dans l'écorce des rameaux qu'ils sont donc verts et remplacent les feuilles dans le phénomène d'assimilation chlorophyllienne. Les stomates sont rares et sont confinés dans des cryptes revêtues entourées de poils où l'air y est toujours humide et l'évaporation est fortement réduite. Les tiges sont rigides et leurs parois externes sont épaisses et l'épiderme est recouvert d'une épaisse cuticule (Shalaby *et al.*, 1972). Les fleurs sont en grappe de couleur blanche ou jaune selon les espèces (Shalaby *et al.*, 1972) (Figure 16). Les gousses sont sub-globuleuses ou ovoïdes et indéhiscentes (Maire, 1952-1987).

Les racines sont profondes et touchent en permanence les couches humides du sol. Elles peuvent accéder dix mètres (Zohary, 1962) et même vingt-cinq mètres de longueur pour les trois espèces; *R. raetam*, *R. monosperma* et *R. sphaerocarpa* (Haase *et al.*, 1996).



. Figure 16: a. *Retama raetam* (Forssk.) Webb 1, b. *Retama monosperma* (L.) Boiss 2, c. *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss .

1https://www.flickr.com/groups/medicinal_aromatic_wild_edible_plants/pool/with/1672091441/light

2<http://www.flickr.com/photos/39929718@N07/4099268124/>

3<http://blogmanualidadeslamusa.blogspot.com/2012/05/porque-retama-plantas-pirofitas-que.html>

III.3. Systématique du genre *Retama*

Selon la nouvelle classification, le genre *Retama* et ses espèces suivent le taxon suivant

Tableaux 05 : Classification du genre *Retama*.

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Eu-angiospermes
Classe	Eudi-cotylédones
Sous classe	Rosides Fabides (APG III, 2009)
Famille	Fabaceae
Sous famille	Papilionaceae
Tribu	Genisteae
Genre	<i>Retama</i>
Espèce	<i>monosperma</i> (L.) Boiss. <i>raetam</i> (Forsskal) Webb <i>sphaerocarpa</i> (L.) Boiss. <i>dasycarpa</i> . Cosson.
Nom vernaculaire	R'tem (Selami, 2015)

III.4. Présentation des espèces

✓ *Retama sphaerocarpa*

Arbrisseaux de 1 à 2 m à rameaux pubescents plus ou moins dressés, caractérisés par de petites fleurs jaunes (5-6 mm), situées en grappes latérales sur les rameaux âgés, feuilles très petites, gousse globuleuse, jaune brun de 7-13.5-7 mm pâturage rocailleux (Quezel et Santa, 1962). *Retama sphaerocarpa* présente au Maroc, Espagne, Algérie, Portugal, Tunisie.

✓ *Retama monosperma*

Arbuste de 2 à 4 m des dunes littorales, fleurs blanches de 14 -15 mm étendard plus court que la carène, légèrement veiné de pourpre corole blanche, gousse à structure ventrale dilatée, ovoïde, portant une seule graine de couleur vert olive (Quezel et Santa, 1962).

✓ *Retama raetam*

Le *Retama raetam* est un arbuste saharien de 1 à 3,5m de hauteur à rameaux veloutés, fleurs blanches de 8-10 mm, étendard égalant la crène ou plus long, gousse non dilatée sur sa nature ventrale contenant une petite graine (Quezel et Santa, 1962).

III.5. Distribution géographique

Les rétames sont distribuées au Nord région de l'Afrique et de la méditerranée orientale et la péninsule du Sinaï (Kassem *et al.*, 2000). En Algérie les rétames (figure 17) colonisent les dunes et lits des oueds, les hauts-plateaux, au Sahara sept atteint au Sud le Tademaït et la hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).



Figure 17 : Distribution géographique de trois espèces de *Retama* en Algérie (Benmiloud *et al.*, 2011)

III.6. Intérêt des rétames

Le genre *Rétama* regroupe des espèces très intéressantes, du point de vu biochimique, moléculaire et écologique.

III.6.1. Intérêt écologique

C'est une espèce qui présente un grand intérêt écologique en zone saharienne .elle est fixatrice de sable mobile donc susceptible d'aider à la lutte contre la désertification et l'érosion éolienne ,amélioration de la teneur du sol en matière organique et accroissement de la productivité biologique du milieu .il a été démontré que l'accroissement de la teneur du sol en matière organique ,dans les systèmes à base de fabacées ,améliore les propriétés physiques du sol .ces améliorations incluent un accroissement de la porosité du sol ,de la stabilité globale et une meilleure rétention et disponibilité de l'eau (**Greenland, 1971 et al.,1995**).

III.6.2. Intérêt pharmacologique

Rétama a été répertorié comme étant plante médicinale des régions arides (**Unesco, 1995**). En médecine traditionnelle, Elle est utilisée dans le traitement de plusieurs maladies comme l'eczéma, et dans le sud, pour les soins en cas de morsures de serpents (**El Hamrouni, 2001**). Ce pouvoir pharmacologique des rétames est dû à la présence de certains Alcaloïdes.

III.6.2. Intérêt industriel et économique

Les rétames sont considérés comme un excellent fourrage, de plus leur bois est utilisé en chauffage.

Ils sont riches en fibre, dont la longueur moyenne atteint 1,93mm (**Bahi, 1991**), ils pourraient donc être valorisés dans l'industrie papetière.

Les rétames sont aussi des plantes ornementales en raison de leurs multiples fleurs odorantes (**Mahnane, 2010**).

Les graines des rétames contiennent des léctines, protéines allergènes, utilisées par la plante dans les mécanismes de défense contre les insectes, ce qui pourrait donc être valorisé dans l'industrie des bio insecticides (**Mahnane, 2010**).

CHAPITRE IV

GRENADE

IV. Grenade

IV.1. Généralité sur la grenade

Le grenadier est un petit arbre à port arbustif des régions méditerranéennes qui peut atteindre 6 m de haut. Ses fleurs rouge vif sont très ornementales et mesurent 3 cm de diamètre. Ses fruits, les grenades, contiennent en moyenne 600 graines pulpeuses (**figure 18**). La grenade est une grosse baie ronde, de la taille d'une grosse orange, à écorce dure et coriace, de couleur rouge ou jaune beige. Elle renferme de nombreux pépins de couleur rose à rouge. Seuls ses pépins sont comestibles, soit environ la moitié du fruit. Dans chaque pépin, la graine est enrobée d'une pulpe gélatineuse de chair rouge transparente, sucrée chez les variétés améliorées, sinon d'un goût plutôt âcre (**Benoît Bock, 2013, cité par Sanaa, 2013**). Le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216g. Ses feuilles sont simples, lancéolées et peuvent mesurer de 3 à 8 cm de long (**Oukabli et al, 2004 cité par, Bakhtaoui, 2019**).



Feuilles



Fleurs



Grenades (fruit)



Graine

Figure 18: Feuilles, fleurs et fruits de *Punica granatum* (Benoît Bock, 2013 cité par Sanaa,2013)

IV.2. Origine

La grenade (*Punica granatum* L.), en latins pomus et granatus, ce qui signifie une tête de série ou de pomme granulaire, originaire de l'Iran à l'Himalaya dans le nord de l'Inde, où elle a été cultivée depuis des milliers d'années. Il y a plus de 1000 cultivars de *Punica granatum*, qui sont passés de l'Iran, à l'est en Chine et en Inde et à l'ouest par la région Méditerranéenne, sur le sud-ouest américain, la Californie et le Mexique (*Levin, 1994 ; Lansky et Newman, 2007*).

La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographiques, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinales des populations des différents pays comme l'Iran, l'Inde, l'Egypte, la Chine, Israël, la Tunisie, la Syrie, le Liban, la Turquie, la Grèce, l'Italie, la France, l'Espagne, le Chili, le Portugal, les Etats-Unis, Oman et plus récemment en Afrique du sud (*Al-Said et al., 2009; Holland et al., 2009 ; Fawole et al., 2011*).

Son nom est dérivé du latin "*granatum*" qui signifie "fruit à grain". La grenade est mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires (*Calin Sanchez et al., 2012*).

IV.3. Dénomination communes

(*Hmid, 2013*), signale les noms suivants pour désigner cette espèce :

- Nom scientifique : *Punica granatum*
- Nom français: grenadier
- Nom anglais: pomegranate
- Nom espagnol: Granada
- Nom italien: Melograno
- Nom arabe: Rommane.

IV.4. Etudes botanique

IV.4.1. Description botanique

La grenade est le fruit d'un arbuste appelé grenadier, de nom latin *Punica granatum* L. appartenant à la famille des *Punicacées* (*Espiard, 2002*).

La grenade est le fruit du grenadier qui est un petit arbre ou un grand arbuste (2 à 7 m de hauteur). Le tronc est recouvert d'une mince écorce grise; se ramifie irrégulièrement en branche plus ou moins épineuses et hérissées, portant des feuilles caduques et lancéolées en spires (*Boullard, 1997 ; Iserin, 2001*).

Ses feuilles sont simples, lancéolées et peuvent mesurer de 3 à 8 cm de long. Ses fleurs de couleur rouge orangées sont très ornementales. Son fruit, la grenade, est une baie qui possède une peau lisse dont la couleur varie du jaune doré au rouge. La taille de la grenade est

comparable à celle d'une pomme. Cette baie renferme de nombreuses petites graines rouges contenues dans des loges, séparées par des membranes au goût amer. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnu et gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (*Wald, 2009*).

Le poids des grenades varie généralement selon l'origine et le cultivar entre 163 et 216g. De point de vue botanique, le fruit de grenadier se compose de 3 parties: l'épiderme (écorce), les arilles et les pépins.

La proportion de l'épiderme qui est la partie extérieure du fruit représente 28 à 32% du poids total du fruit, alors que le taux en graines varie de 55 à 60% du poids total du fruit (*Oukabli et al., 2004*).

IV.4.2. Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Cette classification encore adoptée est décrite dans le **Tableau 06**.

Tableau 06 : Classification botanique du grenadier (*Spichiger et al., 2002 cité par Benyahia et Hadbi, 2016*)

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Punicaceae (Lythraceae: classification phylogénétique)
Genre	Punica
Espèce	<i>Punica granatum</i>

Tableau 07: Composition biochimique de *Punica granatum* (Fournier, 1948).

Organe végétal	Composition chimique	Références
Ecorce de fruit	<ul style="list-style-type: none"> • flavonoïdes • Tannins • Acides polyphénoliques 	(Fournier <i>et al.</i> , 1948).
Feuilles	<ul style="list-style-type: none"> • flavonoïdes • tannins 	(Fournier <i>et al.</i> , 1948).

Graines	<ul style="list-style-type: none"> • acides gras insaturés • acides gras saturés • tannins • Stérol 	(Fournier <i>et al.</i> , 1948).
---------	---	----------------------------------

IV.5. Production de grenade

IV.5.1. Production de grenade dans le monde

La surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000Ha, dont plus de 76% sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA).

Cependant, l'Espagne, l'Égypte, et Israël ont une superficie comprise entre 16 000 et 2 400 ha et sont parmi les pays qui ont développé le secteur d'exportation et aussi la sélection de nouvelles variétés (*Quiroz, 2009*).

D'autres pays pratiquent également cette culture notamment Afghanistan, Pakistan, Arménie, Géorgie, Tadjikistan, Jordanie, Italie, Tunisie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre et Grèce (*Melgarejo et Valero., 2012*).

IV.5.2. La production de grenade en Algérie

Bien que le grenadier soit peu exigeant, les plantations ne sont pas très importantes en Algérie. Il existe de nombreuses variétés de grenades, de qualités très différentes. Plusieurs sortes de grenadier sont signalées dans des petites jardins en Kabylie, on ne connaît que leur appellation locale (Lahlou, Elmouze,...). Quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat (*Inraa, 2006*)

IV.6. L'écorce de grenade

Environ 50% du poids total de la grenade correspond à l'écorce et aux membranes blanches, qui sont une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitannins, les proanthocyanidines et les minéraux, essentiellement du Potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium (**Calin Sanchez et al., 2005**). C'est pourquoi les produits nutraceutiques et les condiments alimentaires élaborés à partir d'extraits d'écorce et de membranes blanches peuvent représenter une source importante de tous ces composés, s'ils ont été élaborés d'une manière correcte (**Figure 19**) (**Calin Sanchez et al., 2005**). L'écorce coriace et plutôt épaisse (2-3mm) rouge brillant elle est jaune dans certaines variétés (QA international collectif, 1996). Il est riche en tanins hydrosolubles, principalement en punicaline, pédunculaine et punicalagine (**Calin Sanchez et al., 2005**). Il peut représenter jusqu'à 28% des tanins (Fournier, 1948). L'écorce,

riche en substances antimicrobiennes et anti oxydantes, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire (Curtay *et al.*, 2010).



Figure 19: L'écorce de la grenade et la membrane blanche

IV.6.1. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'ECORCE DE GRENADE

L'écorce de grenade est une source très importante de composés bioactifs tels les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitanins (28% de l'épiderme du fruit), les proanthocyanidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium (Calin *et al.*, 2005). L'écorce de grenade se compose également, d'acides gras, de catéchines, de quercétines et de rutines (Ghazaleh *et al.*, 2013). Toutefois, les flavonoïdes et les tanins sont plus abondants dans l'écorce de fruit sauvage que dans celle des plantes cultivées (Wald, 2009).

En outre, l'écorce du fruit contient également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide ellagique, Elle renferme aussi des molécules de coloration jaunes et des anthocyanidines ; responsables de la couleur rouge des grenades (Hmid, 2014). Cette composition lui a conféré plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que le domaine agroalimentaire (Lairini *et al.*, 2014).

IV.7. Utilisation du grenadier

IV.7.1. Utilisation traditionnelle de *Punica granatum*

Les fruits de grenadier ainsi que ses graines, son écorce, son épicarpe et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique Latine, régions dont cet arbuste est originaire. Il est utilisé historiquement pour soigner les maladies gastro-intestinales et les affections parasitaires (Afaq *et al.*, 2005).

IV.7.2. Consommation de la grenade

La grenade peut être utilisée en fruit de table, ainsi le fruit se mange naturellement ou accompagné de sucre, les grains de grenade peuvent servir à garnir une salade de fruits, lui apportant une saveur sucrée acidulée. La grenade peut aussi être employée pour la confection de sorbets ou coulis, en passant les grains pulpeux au moulin à légumes, afin d'obtenir un jus épais, sombre et parfumé, qui servira de base à ces préparations (Saad, 2013). Le suc de grenade est également utilisé dans la préparation de gelées alimentaires. Le sirop de grenadine était autrefois réalisé avec des grenades fraîches. La vraie grenadine, de couleur rouge vif, est un sirop concentré de suc de graines de grenade (Saad, 2013).

IV.7.3. Utilisation médicinale

IV.7.3.1. Activités antioxydants

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (Basu *et al.*, 2009).

Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines. Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydant du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (Seeram *et al.*, 2004).

IV.7.3.2. Activités thérapeutiques

Toutes les parties du fruit du grenadier semblent avoir des propriétés thérapeutiques et certaines études rapportent que l'écorce, les racines, les feuilles et le tronc ont aussi des effets médicaux bénéfiques. Des recherches actuelles semblent indiquer que les principaux constituants thérapeutiques du grenadier sont les ellagitannins (incluant les punicalagins), l'acide punique, les flavonoïdes, les anthocyanidines, les anthocyanines, les flavonols estrogéniques et les flavones (Jurenka, 2008).

IV.7.3.3. Activité anticancéreuses

L'acide ellagique, l'acide caféique, la luteoline et l'acide punique, sont tous des composés avec des actions anticancéreuses connues. Le jus fermenté, l'écorce de grenade, et l'huile de pépins de grenade, lorsqu'ils sont combinés, cet ensemble Inhibe la prolifération, l'invasion et la sécrétion de phospholipase A2 (sPLA2) dans le cancer de la prostate. (Lansky, 2005).

IV.7.3.4. Protection contre les maladies cardiovasculaires

L'effet de la consommation de jus de grenade par des patients hypertendus sur leur tension artérielle et sur l'activité de l'enzyme de conversion sérique a été décrit, on observe une diminution de l'activité de l'AC sérique et une réduction de la tension artérielle systolique. (Aviram & al., 2001).

IV.7.3.5. Effet antidiabétique

Il a été mentionné que les mécanismes hypoglycémiques de l'extrait de fleurs de grenadier sont similaires à ceux de l'acarbose, 10- α -glucosidase inhibiteur utilisé dans le traitement de la maladie de type II. (Katz, 2007).

L'extrait aqueux de l'écorce de grenade était également significativement hypoglycémiant, et il est suggéré de l'utiliser pour traiter le diabète type 1 aussi bien que pour type 2. (Katz, 2007).

IV.7.4. Autres utilisations

Au Japon, un insecticide est dérivé de l'écorce de l'arbre. Le bois de couleur jaune pâle est très dur. Cependant, étant disponible uniquement en petits morceaux, il est utilisé pour la confection de cannes. Les études récentes ont démontrées l'effet thérapeutique de quelques-unes de ces utilisations (Stover et Mercure, 2007).

IV.8. Activité et intérêt de *Punica granatum*

IV.8.1. Activité anti oxydantes

Des études *in vitro* ont démontré que le jus de grenade et les extraits de graines du grenadier ont 2 à 3 fois la capacité antioxydante du thé vert ou du vin rouge en piégeant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif des macrophages et la peroxydation lipidique chez les animaux (Basu et al., 2009). Dans le jus de grenade les principaux polyphénols antioxydants sont les ellagitannins et les anthocyanines.

Les ellagitannins comptent pour 92% de l'activité antioxydante du jus de grenade et sont concentrés dans l'écorce, les membranes et les moelles du fruit (Seeram et al., 2004).

IV.8.2. Activité anti-inflammatoires

Des études *in vivo* ont démontré que l'huile de graines pressées du grenadier inhibe la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La cyclo-oxygénase, enzyme clé dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (principaux médiateurs de l'inflammation), a été inhibée de 37% par l'extrait d'huile de graines pressées. La lipooxygénase, qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en leukotriènes, aussi médiateurs importants de l'inflammation, ont été inhibés de 75% par le même extrait (Schubert, 1999).

IV.8.3. Activité anticancéreuse

Des études *in vivo* utilisant des lignées cellulaires du cancer de la prostate ont démontré que divers extraits de grenadier (jus, huile de graine, écorce) inhibent potentiellement la prolifération et l'envahissement des cellules cancéreuses, causent une perturbation du cycle cellulaire, induisent l'apoptose et inhibent le développement de la tumeur (Albrecht, 2004). Le mécanisme anticarcinogénique du grenadier peut être expliqué par une modulation des protéines régulatrices de l'apoptose (Malik, 2005). Une étude clinique en phase II portant sur 46 hommes ayant le cancer de prostate récurrent a illustré que 35% des patients montraient une diminution significative du taux sérique de PSA (Prostate Specific Antigen) durant le traitement avec du jus de grenade. La même étude a indiqué que le grenadier pourrait affecter le cancer de prostate grâce à la combinaison de ses propriétés antiproliférative, apoptotique, antioxydante et anti-inflammatoire (Pantuck, 2006).

IV.8.4. Activité antidiabétique de *P. granatum*

Une étude pilote sur des patients diabétiques de type 2 avec hyperlipidémie a démontré que le jus concentré de grenade diminue l'absorption et augmente l'excrétion fécale du cholestérol et réduit significativement le taux total de cholestérol et du LDL cholestérol en améliorant les ratios total/HDL et LDL/HDL cholestérol. La consommation du jus de grenade réduit significativement le stress oxydatif chez les patients diabétiques (Esmailzadeh et al., 2006) sans affecter les paramètres diabétiques (Rosenblat et al., 2006).

IV.8.5. Activité antimicrobiennes de la grenade

L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède donc, *in vitro*, une activité antibactérienne. La combinaison unique des tanins et des alcaloïdes issus de cette écorce, ainsi que leur action synergique, explique probablement cette activité antibactérienne non retrouvée dans d'autres fruits également riches en tanins et alcaloïdes (Prashanth, 2001).

IV.8.6. Activité antiulcéreuse

L'écorce de grenade séchée en poudre présente un efficace traitement contre l'acidité d'estomac et l'ulcère d'estomac (Championnière, 1850). L'extrait de peau de grenade possède une activité inhibitrice des ulcères de l'estomac induits par l'aspirine et l'éthanol grâce à ses propriétés antioxydantes. Pour des doses de 250 et 500 mg/kg d'extrait hydroalcoolique de grenade (70% méthanol v/v), le pourcentage d'inhibition est respectivement de 22,37% et 74,21% pour les ulcères induits à l'aspirine et de 21,95% et 63,41% pour ceux induits par l'éthanol (Ajaikumar et al., 2005).

IV.8.7. Action cicatrisante de la grenade

Comparé à un produit topique antibactérien du commerce, une préparation à base d'extrait de peau de grenade (44% de composés phénoliques) à 5% permet une bonne cicatrisation, nettement visible par examen histopathologique des blessures des rats Wistar utilisés. Au bout de 10 jours, les rats traités au gel à l'extrait de peau de grenade sont guéris alors que 16 à 18 jours sont nécessaires à la cicatrisation des rats témoins (Murphy, 2004).

Les analyses par HPLC montrent que les composants majoritaires de l'extrait sont la catéchine et l'acide gallique, molécules qui pourraient donc avoir un intérêt dermatologique (Murphy, 2004).

IV.8.8. Autres propriétés de grenade

Le jus de grenade stimule le foie et la rate. Il renforce la qualité et la quantité de sang, permettant de mieux nourrir les tissus. Il est très régénérant pour le coeur et le tissu reproducteur. Il est aussi très détoxifiant comme le jus de citron, mais sans acidité. Il donne de vitalité et stimule l'immunité physique et mentale (Geneviene, 2012).

L'écorce, les racines de l'arbre, et parfois mêmes les écorces du fruit, sont utilisées contre les parasites intestinaux, en particulier le vers solitaire (ténia) et la dysenterie amibienne. Elles contiennent des alcaloïdes, dont la pelletiérine, vermifuge efficace contre le ténia, inscrite au Codex de pharmacopée française depuis 1937 (Cutray *et al.*, 2010).

IV.9. Méthodes d'extraction

Les techniques d'extraction sont nombreuses, certaines sont utilisées de longue date par l'homme, d'autres sont le résultat d'avancées récentes, et toutes ont pour but de récupérer un corps pur (arôme, médicament...) à partir d'un mélange. On peut distinguer :

❖ Préparation de l'extrait d'écorces de la grenade

La méthode d'extraction que adoptée est la macération par trois solvants organiques ; il s'agit du méthanol, acétone et de l'éthanol. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de la matière végétale à extraire

L'extraction est effectuée sous agitation continue et à une température ambiante, pendant 24 heure. Après filtration sur un papier whatman, les filtrats sont additionnés et concentrés par un rotavaport. Le même procédé est répété pour les trois types de solvants. Cette série d'extraction a permis d'obtenir trois extraits organiques: extrait du méthanol, extrait de l'acétone et extrait de l'éthanol, qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation (Safi *et al.*,2017).

IV.10. Toxicité de grenade

La partie comestible de la grenade n'est pas toxique, par contre l'écorce riche en tannins peut être nuisible pour l'organisme. Beaucoup d'études ont prouvé que lorsque le contenu en tannins de la ration alimentaire dépassent 0,25% est cancérigène (**Morton, 1987**).

Afin de mieux comprendre l'effet de la consommation de grenade ou des extraits de grenade sur l'organisme et leur rôle dans le traitement de certaines maladies, il est nécessaire de connaître les substances bioactives et leurs propriétés.

Il a été dit que la punicalagine, le tanin ellagique hydrosoluble et le polyphénol antioxydant très abondant dans le jus de grenade étaient toxiques pour le bétail. Une étude a donc été réalisée sur des rats Sprague-Dawley pour évaluer la toxicité potentielle de ce composé via un régime enrichi en punicalagine à hauteur de 6% administré sur une période de 37 jours.

La quantité d'aliments ingérés, l'index d'utilisation alimentaire et le taux de croissance sont plus faibles chez les rats traités durant les 15 premiers jours sans effet adverse significatif. Cela pourrait être dû à la plus faible valeur nutritionnelle de la ration enrichie en punicalagine ainsi qu'à sa moindre appétence. Aucune différence significative n'a été observée lors des analyses de sang, sauf pour l'urée et les triglycérides qui sont restés à des valeurs faibles durant toute l'expérience. L'analyse histopathologique du foie et des reins a confirmé l'absence de toxicité (**Cerda et al., 2003**).

Partie Pratique

I. Matériels et méthodes

Les expérimentations effectuées dans cette étude ont été accomplies dans le Laboratoire de recherche sur les molécules bioactives et applications et le laboratoire de toxicologie, du département de Biologie appliquée.

I.1. Matériels Biologique**I.1.1. Matériel végétal**

L'étude porte sur l'écorce de grenades (*Punica granatum*) récoltées au cours du mois d'octobre 2019 dans delà région de Hammamet à Tébessa. Les grenades récoltées étaient saines et ne possèdent aucune lésion (**figure 20**). L'identification du genre et de l'espèce a été faite par Mme Hioun (Enseignante de Botanique au département de Biologie des êtres vivants) sur la base de la Clé de Quezel et Santa (1963). L'écorce des grenades a été séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière puis broyée pour obtenir une poudre fine et homogène nécessaire à la préparation de l'extrait. La poudre obtenue a été stockée dans une boîte opaque hermétiquement fermée.



Figure 20: grenade (*Punica granatum*) (Kumari et al. 2012).

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué par les feuilles de *Rétama Sphaerocarpa* (**figure 21**). Les feuilles ont été séchées à l'air libre jusqu'au poids constant et rendue sous forme de poudre à l'aide d'un broyeur de laboratoire. *Rétama sphaerocarpa* utilisé dans cette étude provenait de la région de SERDIES au sud-ouest de la wilaya de Tébessa.

L'identification du genre et de l'espèce a été faite par Mme Hioun (Enseignante de Botanique à l'Université de Tébessa) sur la base de la Clé de **Quezel et Santa 1963**.



Figure 21: *Rétama sphaerocarpa* image personnel



Figure 22: localisation géographique du *Rétama sphaerocarpa*

I.1.2. Matériel animal

Trente et un (31) souris mâles adultes *Mus musculus* de la souche BALB/C ont été utilisées dans les expérimentations. Ces souris proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger (Centre d'élevages El-Kouba, Alger) et ont un poids corporel qui varie entre 20 et 36 g.

Les souris été soumis à une période d'adaptation de mois dans l'animalerie du département de Biologie Appliquée à une température voisine de 18°C et un photopériodisme naturel. Les souris ont été élevées dans des cages en polyéthylène munies de bouteilles d'eau et tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la poubelle est renouvelée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience. Les souris ont été nourries avec du pain et leur poids a été pris quotidiennement grâce à une balance analytique. Le gain du poids qui est la différence de poids entre le premier et le dernier jour du traitement a été également notée.

I.2. Méthodes**I.2.1. Traitement des souris**

Les souris ont été répartis en 8 lots de 4 souris chacun sauf le lot témoin contenait 3 souris seulement. Les nanoparticules d'Oxyde de Nickel (nano-NiO), l'extrait méthanolique de grenade (EMG), ainsi que l'extrait méthanolique de *Retama spherocarpa* (EMRs) ont été administrés par gavage quotidien pendant 1 mois. Le traitement des souris a été effectué comme suit :

- ✚ **Lot 1 (T) :** non traité (témoins) : les souris ont reçu 100 µl d'eau physiologique.
- ✚ **Lot 2 (N):** souris traités par les Nps-NiO à une dose de 10 mg/kg de poids
- ✚ **Lot 3 (P):** souris traités par l'EMG à une dose de 500 ml/kg de poids
- ✚ **Lot 4 (R) :** souris traités par l'EMRs à une dose de 250 ml/kg de poids
- ✚ **Lot 5 (P+N):** souris traités par la combinaison NPS-NiO et EMG aux mêmes doses.
- ✚ **Lot n°6 (R+N) :** souris traités par la combinaison NPS-NiO et EMRs aux mêmes doses.
- ✚ **Lot 7 (P+R) :** souris traités par la combinaison EMG et EMRs aux mêmes doses.
- ✚ **Lot 8 (N+P+R) :** souris traités par la combinaison NPS-NiO, EMG et EMRs aux mêmes doses.

I.2.2. Dosage des métabolites (protéines, lipides et glucides)

Le dosage des différents métabolites (protéines, lipides et glucides) contenus dans les reins des souris a été réalisé selon le procédé de **Shibko et al. (1966)**. Après broyage et centrifugation (5000 tours/mn pendant 10mn), le surnageant **I** a été récupéré afin de doser les lipides. Le culot **I** quant-à-lui a été récupéré et mélangé avec 1ml d'éther de chloroforme

(V/V). Ensuite, une deuxième centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn) a été réalisée. Le surnageant II a été récupéré afin de doser les lipides tandis que le culot II a été traité avec 1 ml de NaOH (0,1N) pour le dosage du taux des protéines totales (**Figure 23**).

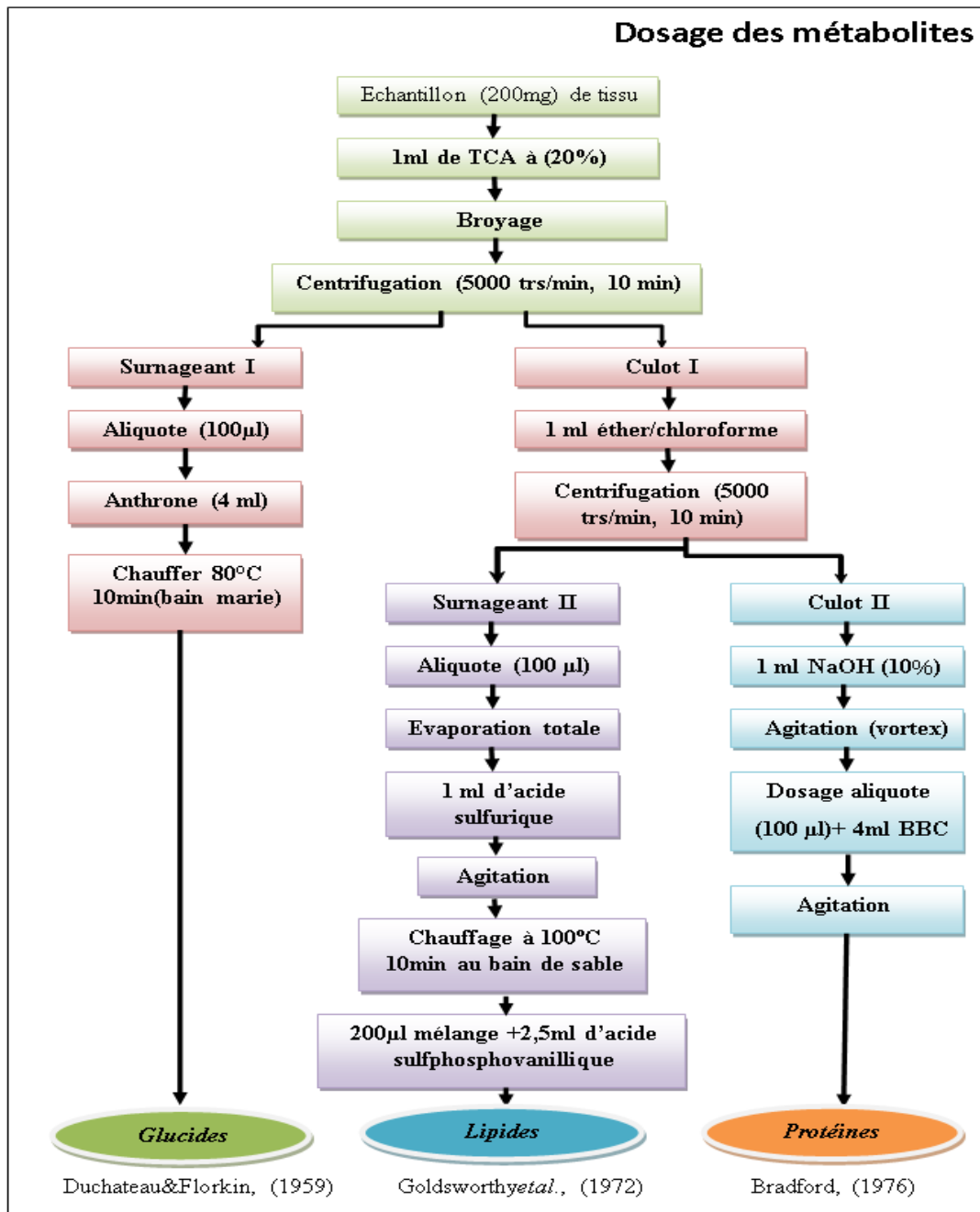


Figure 23: Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al. 1966).

1.2.2.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été déterminé selon la méthode de (**Bradford, 1976**) qui consiste à utiliser le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements

amines (-NH_2) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de la couleur bleu reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines. Pour accomplir cet essai, nous avons procédé comme suit :

- Prélever 0.1ml de l'homogénat.
- Ajouter 5ml de réactif de Bradford.
- Agiter et laisser 5 minutes.

❖ Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 595 nm

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gramme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (**annexe 01**).

I.2.2.2. Dosage des lipides

Le taux des lipides a été déterminé selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)**. Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide ortho-phosphorique à 85% et 55ml d'eau distillée) et solution mère de lipides (2,5mg/ml comme standard. Et additionné 1ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les chauffés un bain marie (100C° pendant 10min) ; de chaque tube 200µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5ml de réactif.

❖ Lecture

Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm. La concentration des lipides est déterminée par comparaison à une gramme étalon d'huile table préalablement réalisée dans les mêmes conditions (**annexe 02**).

I.2.2.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau et Florkin, (1959)**. Elle consiste à additionner 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml de réactif d'Anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présent dans l'échantillon

❖ Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde de 620 nm (**annexe 03**).

I.2.3. Analyse des paramètres su stress oxydatifs**I.2.3.1. Dosage du Malondialdéhyde (MDA)****❖ Principe**

Le MDA peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 doubles liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation in vitro. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode **Draper et Hadley (1990)**.

❖ Mode opératoire

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (pH7, 4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT.
- Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

Lecture de la densité optique à $\lambda=530$ nm.

❖ Calcul

La concentration du MDA est calculée selon la loi de **Beer-Lambert** :

$$C(\text{nmol /mgdeprotéine}) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

- **C** : Concentration en n mol /mg de protéines;
- **DO** : Densité optique lue à 530 nm;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1,56 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹;
- **L** : Longueur du trajet optique = 0,779 cm;
- **X** : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml);
- **Fd** : Facteur de dilution : Fd = 0,2083.

I.2.3.2. Dosage du glutathion (GSH)**❖ Principe**

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5, 5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat

doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalicylique 0,25%) afin de garder uniquement les groupements-SH spécifique du glutathion (**weckbeker et Cory, 1988**)

❖ Mode opératoire

- Une fois préparé, l'homogénat est déprotéinisé ; 0,8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0,25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifugé pendant 5min à 1000 t/min.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0,02M), PH=9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5min à température ambiante. puis lecture de la DO à $\lambda = 412$ nm.

❖ Calcul

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5} \text{ /mg de protéines}$$

-DO : Densité optique ;

-1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation (0,8 ml homogénat + 0,2 ml SSA);

-1,525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant

(0,5 ml surnageant + 1 ml Tris -EDTA + 0,025 ml DTNB);

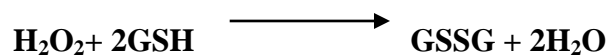
-13100 : Coefficient d'absorbance (contenant le groupement -SH à 412 nm);

-0,8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml;

-0,5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1,525 ml.

1.2.3.2. Dosage du Glutathion peroxydase (GPx)**❖ Principe**

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante (**Flohe et Gunzler, 1984**):



❖ Mode opératoire

- Dans un tube sec, 0,2 ml de surnageant est additionnée à 0,4 ml de GSH à 0,1 mM (réaction enzymatique) + 0,2 ml de KNaHPO₄ à 0,067 M (tampon d'extraction pH 7,8).
- Le tube blanc contient 0,4 ml de GSH + 0,2 ml de KNaHPO₄ (réaction non enzymatique).
- Incubation au bain marie à 25° C pendant 05 min puis addition de 0,2 ml d'H₂O₂ (1,3mM) pour initier la réaction.
- Incubation 10 min.
- Addition de 1ml de TCA 1% T pour arrêter la réaction.
- Le mélange se met dans la glace pendant 30 min. Centrifugation durant 10 min à 3000t/min. 0,48 ml de surnageant sont placés dans une cuve et additionnés de 2,2 ml de Na₂HPO₄ (0,32M) + 0,32 ml de DTNB à 1mM.
- Mesure de la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

❖ Calcul

La détermination de l'activité de la GPx se fait de la façon suivante :

$$\text{L'activité de la GPx} = \text{La quantité de GSH réduit disparue} \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

La quantité GSH réduit qui sera oxydée (disparue) est déterminée comme suit :

$$X = \frac{(DOe - DOb) \times 0.04}{DOb} = \text{quantité de GSH réduit disparue (oxydée)}.$$

DOb = Densité optique de GSH réduit du blanc

DOe = Densité optique de GSH réduit de l'extrait

1.2.3.3. Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

❖ Principe

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2 ,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di

nitrobenzène (**Habig et al., 1974**). Permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante:



❖ Mode opératoire

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 1400 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM). La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

❖ Calcul

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST /min/mg de protéine)} = \frac{(\text{DO}_{\text{échant}}/\text{min} + \text{DO}_{\text{blanc}}/\text{min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

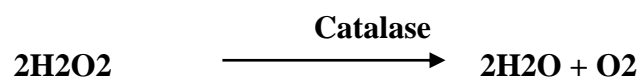
-Do : Densité optique de l'échantillon /min ;

-Do/min blanc : Densité optique du blanc /min ;

-9,6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm.

1.2.3.4. Dosage de l'activité catalase(CAT)

La catalase est une enzyme antioxydant la plus couramment mesurée dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette enzyme intervient dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique en eau et en oxygène (**Regoli et Pricipato, 1995 ; Boucenna, 2010**).



L'activité du catalase est déterminée selon la méthode de **CaKmak et Horst (2003)**. Le principe repose sur la disparition de l' H_2O_2 à 25°C par la présence de catalase. Pour réaliser ce protocole, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Prélever 20 μl de surnageant
- Ajouter 200 μl de peroxyde d'hydrogène
- Ajouter 780 μl TBS.
- Pour le blanc : mélange 780 μl TBS + 200 μl H_2O_2 + 20 H_2O

La réaction est contrôlée par une lecture continue pendant 2 minutes durant 15 secondes à une longueur d'onde à 240 nm.

L'activité CAT est calculée par la formule suivante:

$$X = \frac{(\Delta\text{DO} \times 10)}{(\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines})}$$

X: micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mn}$ /mg de protéines).

Δ DO : différences de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat pendant une minute.

ϵ : Le coefficient d'extinction du H_2O_2 ($3900 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$)

L : longueur de la cuve utilisée (1cm).

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

1.2.3.5. Etude statistique

Les digrammes ont été tracés grâce au logiciel Excel10. Les traitements statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version16). Pour chaque paramètre, les différences entre les lots ont été évaluées grâce à une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA) suivie par un test de Tukey pour comparer les différents lots entre eux y compris le lot témoin.

Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne \pm écart type, et les différences ont été considérées comme significative si $p < 0,05$.

II. Résultat**II.1. Effets du NPs-NiO et EMG et EMRs sur les paramètres biochimiques au niveau des reins****II.1.1. Effet sur le taux des glucides rénaux**

Les variations du taux des glucides au niveau du rein chez les souris témoins et traités par l'extrait méthanolique de grenade (EMG) et traités par l'extrait méthanolique *Retama sphaerocarpa* (EMRs) et aux nanoparticules de l'oxyde de Nickel (Nps-NiO) et leur combinaison sont présentés dans la (**figure 24**). Nos résultats montrent que le taux moyen de glucides au niveau rénal a augmenté significativement chez les souris traitées par les NPs-NiO en comparaison avec les témoins (193,52 mg/L vs 91,02 mg/L). Dans le lot traités par l'EMG nous avons enregistré une augmentation non significative du taux des glucides rénaux en comparaison avec les témoins (109,77 mg/L vs 91,02 mg/L). Le traitement par l'EMRs montre une augmentation non significative du taux moyen des glucides comparé aux témoins (149,25 mg/L vs 91,02 mg/L). Dans le lot traité par la combinaison des NPs-NiO et l'EMG, diminue le taux des glucides rénaux en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (155,34 mg/L vs 193,52 mg/L) à une valeur qui n'est pas significativement différente à celle enregistrée chez le lot témoin (91,02 mg/L). La combinaison des Nps-NiO et l'EMRs, le taux de glucides prend une valeur proche de lot traité par les NPs-NiO (165,34 mg/l vs 193,52). Le traitement par l'EMG et l'EMRs a augmenté en comparaison avec les témoins (175,19 mg/L vs 91,02 mg/L). Par ailleurs, la combinaison des NPs-NiO et l'EMG et l'EMRs diminue le taux des glucides rénaux en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (158,94 mg/L vs 193,52 mg/L). Mais cette valeur reste quand-même significativement supérieure à celle des témoins (91,02 mg/L).

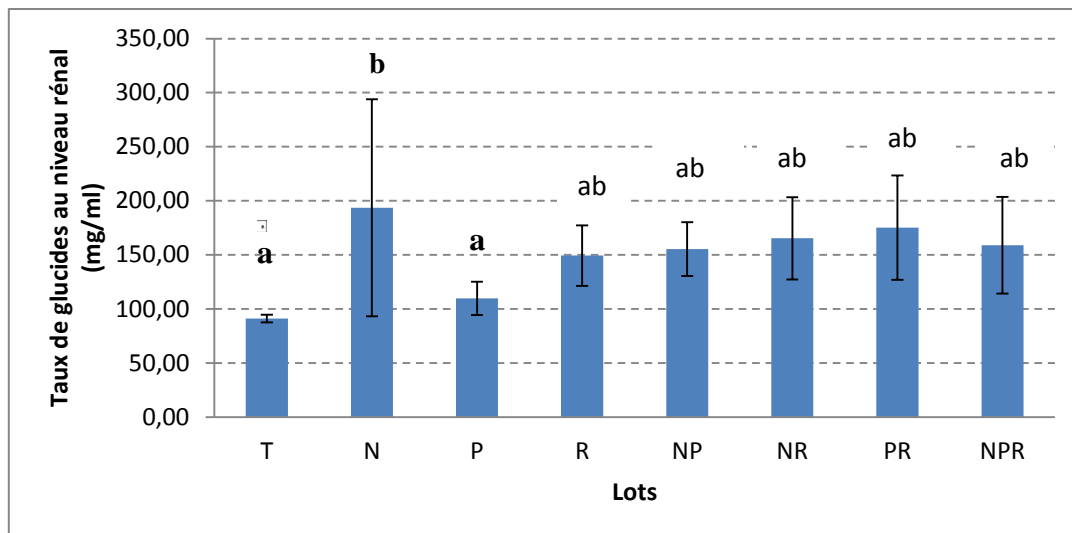


Figure 24: Variation du taux moyen des glucides rénaux chez les souris traités et témoins (mg/l).

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.1.2. Effet sur le taux des lipides rénaux

Les variations du taux moyen de lipides au niveau rénal chez les souris témoins est traités sont présentées dans la (Figure 25). Nos résultats montrent que l'administration des NPs-NiO chez les souris provoque une augmentation significative du taux moyen des lipides rénaux par rapport aux souris témoins (343,76 mg/L vs 148,76 mg/L). Par ailleurs, Chez le lot traité par l'EMG, nous avons enregistré de modification notable en comparaison avec le témoin (256,66 mg/L vs 148,76 mg/L). Notons que le lot traité par l'EMRs seule montre une augmentation non significative de taux de lipides par rapport aux témoins (234,96 mg/L vs 148,76 mg/L). L'administration des NPs-NiO avec l'EMG provoque une diminution du taux moyen des lipides rénaux en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (290,86 mg/L vs 343,76 mg/L) à une valeur qui n'est pas significativement différente à celle enregistrée chez le lot témoin (148,76 mg/L). Le Co-traitement Nps-NiO et EMRs a augmenté le taux des lipides à (373,66 mg/L) à une valeur supérieure à celle enregistrée chez le lot traité par Nps-NiO (343,76 mg/L). Le traitement par l'EMG et L'EMRs a augmenté en comparaison avec les témoins (261,76 mg/L vs 148,46 mg/L). Par ailleurs, la combinaison des NPs-NiO et l'EMG et l'EMRs diminue le taux des lipides rénaux en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (220,46 mg/L vs 343,76 mg/L). Mais cette valeur reste quand-même significativement supérieure à celle des témoins (148,76 mg/L).

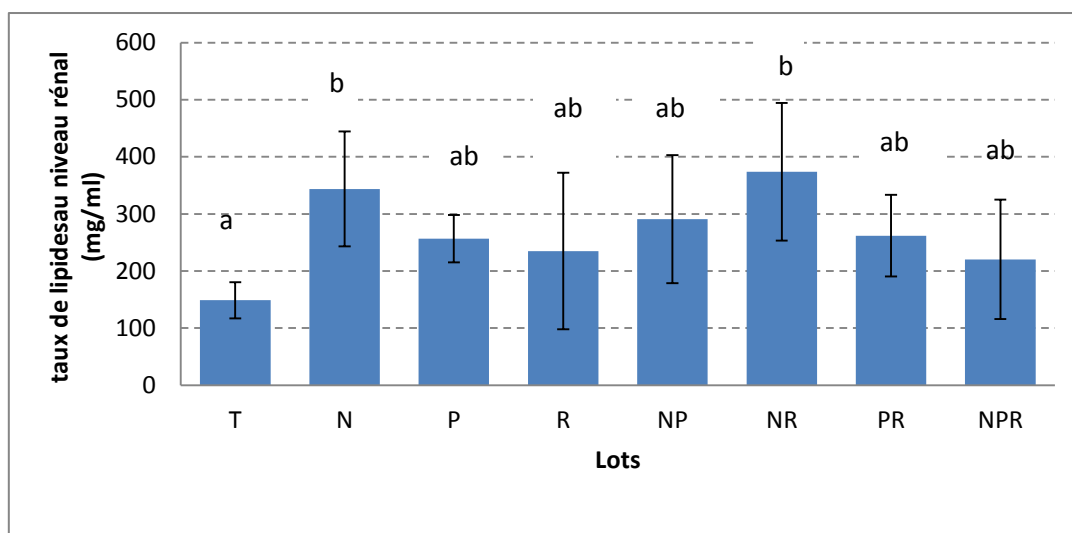


Figure 25: Variation du taux moyen des lipides rénaux chez les souris traité et témoins (mg/l)

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.1.3. Effet sur le taux des protéines rénaux

La figure 26 représente les variations des taux moyens de protéines chez les souris témoins et traité par le NPs-NiO et les EMG et les EMRs. Les résultats de cette étude indiquent que l'administration des NPs-NiO est associée à une augmentation significative du taux du moyen des protéines rénaux comparée aux souris témoins (68,74 mg/L vs 40,28 mg/L respectivement). L'administration d'EMG quant-à-elle ne modifie pas le taux du moyen des protéines rénaux par rapport à celui des souris témoins (46,85 mg/L vs 40,28 mg/L respectivement). Cependant, les souris traitées par l'EMRs n'enregistrent pas une augmentation significative du taux des protéines rénaux en comparaison avec les témoins (43,84 mg/L). La combinaison d'EMG et du NPs-NiO diminue les taux du moyen des protéines rénaux on comparaison avec le lot traité uniquement par les NPs-NiO (46,03 mg/L vs 68,74 mg/L respectivement). Le co-traitement des NPs-NiO et l'EMRs est à l'origine d'une diminution du taux des protéines rénaux en comparaison avec le lot traité uniquement par les NPs-NiO (57,32 mg/L vs 68,74 mg/L) à une valeur qui n'est pas significativement différente à celle enregistrée chez le lot témoin (40,28 mg/L). Le traitement par l'EMG et L'EMRs a augmenté en comparaison avec les témoins (44.72 mg/L vs 40.28 mg/L). Par ailleurs, la combinaison des NPs-NiO et l'EMG et l'EMRs ne diminue pas le taux des protéines rénaux en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (66.00 mg/L vs 68,74 mg/L).

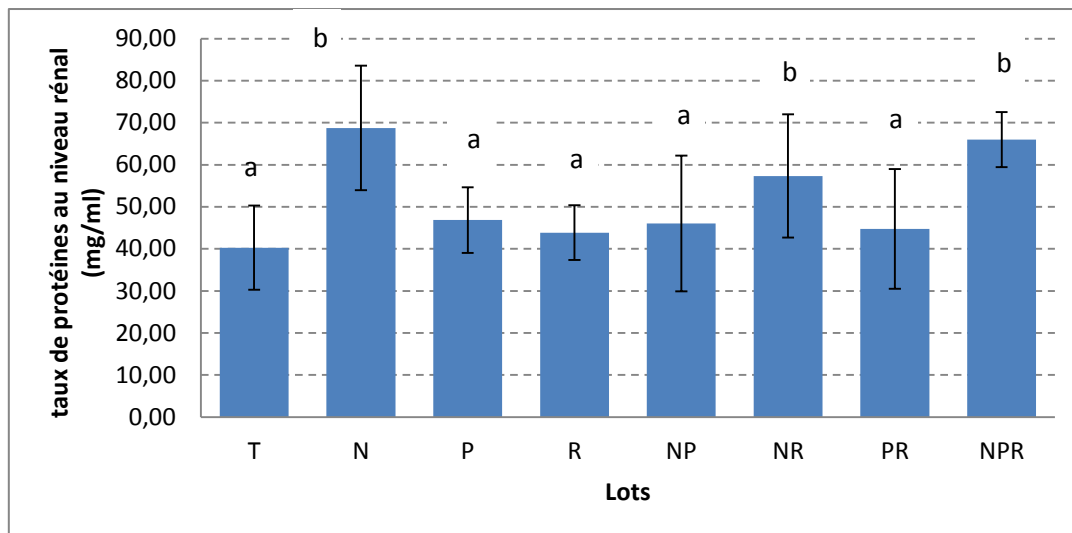


Figure 26: Variation du taux moyen des protéines rénaux chez les souris traitées et témoins (mg/l).

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.2. Effets du nano-NiO et EMG et EMRs sur les paramètres du stress oxydant

II.2.1. Effet sur le taux de malondialdéhyde (MDA)

Les variations du taux moyen de malondialdéhyde au niveau rénal chez les souris témoins est traitées sont présentées dans la (**Figure 27**). Nos résultats montrent que le taux de MDA a augmenté significativement chez le groupe traité par les NPs-NiO par rapport aux témoins. En effet, nous constatons que le taux de MDA passe de 0,25 mg/l chez les témoins à 0,68 mg/l chez le lot traité par les NPs-NiO. Tandis que chez le lot traité par EMG, le taux moyen du MDA reste proche à celui des témoins (0,32 mg/l vs 0,25 mg/l). Par ailleurs, Dans le lot traité par EMRs, n'enregistre aucune différence significative du taux de MDA avec les témoins (0,29 mg/l vs 0,25 mg/l). La combinaison d'EMG et du NPs-NiO diminue les taux du moyen des MDA on comparaison avec le lot traité uniquement par les NPs-NiO (0,34 mg/L vs 0,68 mg/L) à une valeur qui n'est pas significativement différente à celle enregistrée chez le lot témoin (0,25 mg/l). L'administration des NPs-NiO avec l'EMRs provoque une diminution du taux moyen des MDA en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (0,56 mg/L vs 0,68 mg/L) à une valeur supérieure à celle enregistrée chez le lot témoin (0,25 mg/L). Le traitement par l'EMG et L'EMRs a augmenté en comparaison avec les témoins (0,33 mg/L vs 0,25 mg/L). La combinaison des NPs-NiO et l'EMG et l'EMRs diminue le taux des MDA en comparaison avec le lot traité par Nps-NiO (0,62 mg/L vs 0,68 mg/L). Mais cette valeur reste quand-même significativement supérieure à celle des témoins (0,25 mg/L).

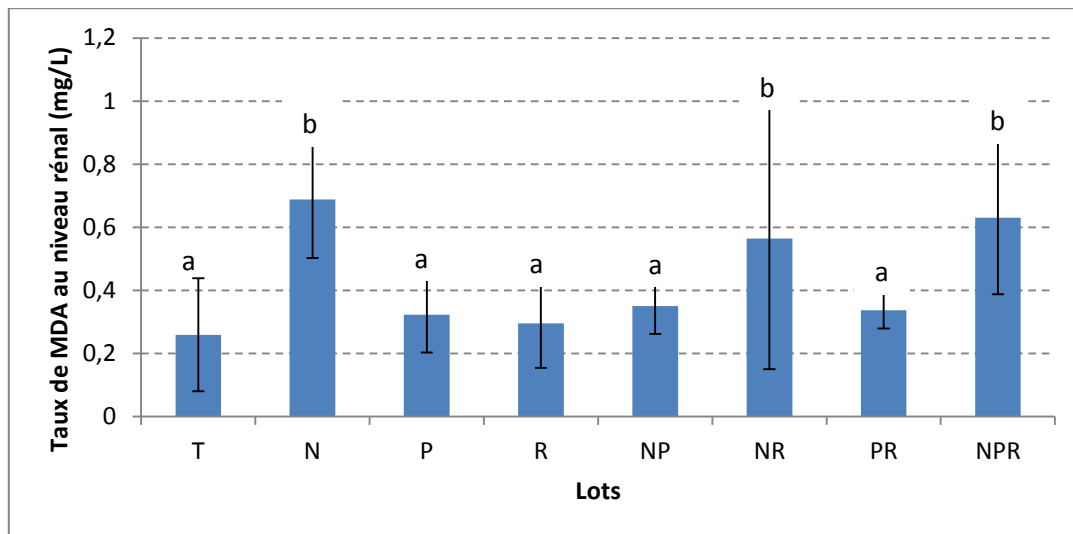


Figure 27: Variation du taux moyen des MDA rénal chez les souris traités et témoins (mg/l).

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.2.2. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)

Les variations du taux moyen de GSH au niveau rénal chez les souris témoins est traités sont présentées dans **la Figure 28**. Nos résultats montrent que l'administration des EMG, EMRs et leur combinaison (EMG+EMRs) ne modifie nullement les valeurs de GSH ($10,67 \text{ mg/m}$, $9,24 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$ et $10,86 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$ respectivement) comparées aux témoins ($7,54 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$).

Cependant, le taux des GSH rénal a augmenté significativement chez le groupe traité par les NPs-NiO par rapport aux témoins. En effet, nous constatons que le taux de GSH passe de ($7,54 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$) chez les témoins à ($33,50 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$) chez le lot traité par les NPs-NiO. L'activité de GSH a augmenté chez les souris traitées par rapport aux témoins surtout pour les lots traités par NPR ($30,59 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$), le lot traités par NR ($20,53 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$), et le lot NP ($11,20 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$). La combinaison d'EMG et du NPs-NiO diminue les taux du moyen des GSH rénal on comparaison avec le lot traité uniquement par les NPs-NiO ($11,20 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$ et $33,50 \times 10^{-05} \text{ mg/ml}$ respectivement).

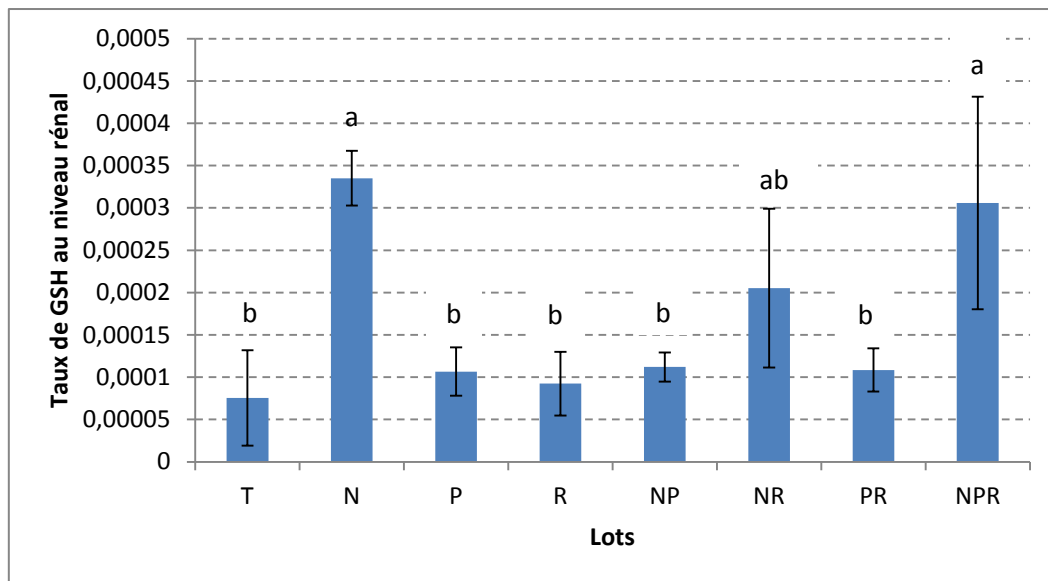


Figure 28 : Variation des concentrations moyennes du GSH rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-NiO, EMG et EMR.

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.2.3. Effet sur l'activité de GPx

Les valeurs moyennes de l'activité du GPx au niveau rénal chez les souris témoins et traitées sont présentées dans la **Figure 29**. Nos résultats montrent que l'administration des NPs-NiO chez les souris provoque une augmentation de l'activité moyenne du GPx ($51,35 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) par rapport aux souris témoins ($9,58 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

Par ailleurs, chez le lot traité par l'EMG, EMRs, et le (EMG+EMR) nous n'avons pas enregistré de modification notable en comparaison avec le témoin ($25,50 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, $30,55 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ et $31,32 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ respectivement). L'activité de GPx a diminué chez les souris traitées par rapport aux NPs-Nio, surtout pour le lot traité par la combinaison NPs-Nio+EMG+EMRs ($6,45 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) et le lot traité par la combinaison NPs-Nio+EMRs ($15,01 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

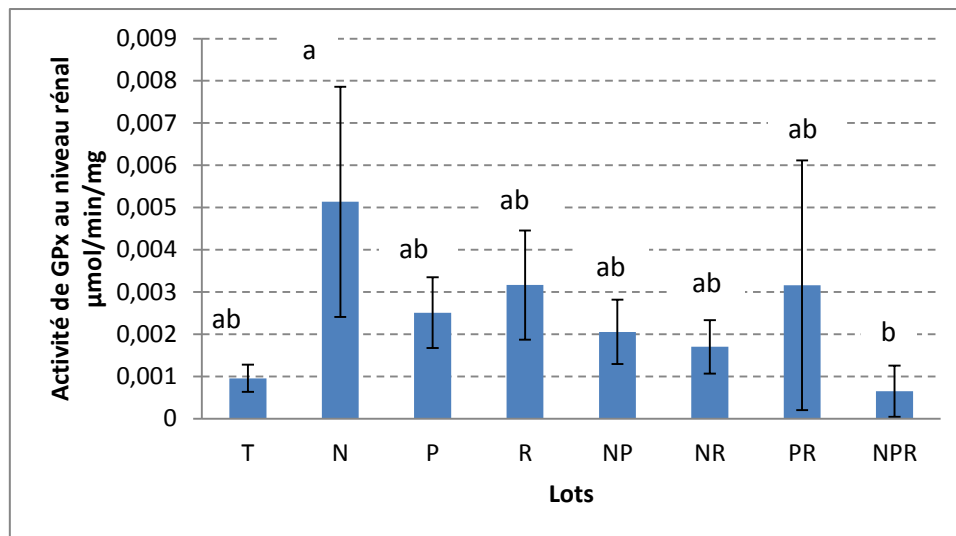


Figure 29: Variation des concentrations moyennes du GPx rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-Nio,EMG et EMR.

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.2.4. Effet sur l'activité de GST

La **figure 30** représente les variations des niveaux d'activité de la GST rénale chez les souris témoins et traité par le NPs-NiO, les EMG, et le EMRs et leurs combinaisons. Les résultats de cette étude montrent que l'administration des NPs-NiO ($0,0023 \text{ mg/ml}$), est associée à une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de GST comparée aux souris témoins ($23 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$ vs $13 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$ $0,0013 \text{ mg/ml}$). Par ailleurs, l'administration des EMG et l'EMRs ne modifie nullement les niveaux d'activité de la GST rénale comparés aux souris témoins ($17 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$ et $12 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$).

Cependant, l'activité de la GST a augmenté chez les souris traitées par les combinaisons des NPs-NiO avec l'EMRs et l'EMG comparés aux témoins ($27 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$ et $32 \times 10^{-4} \text{ μmol/min/mg}$ respectivement).

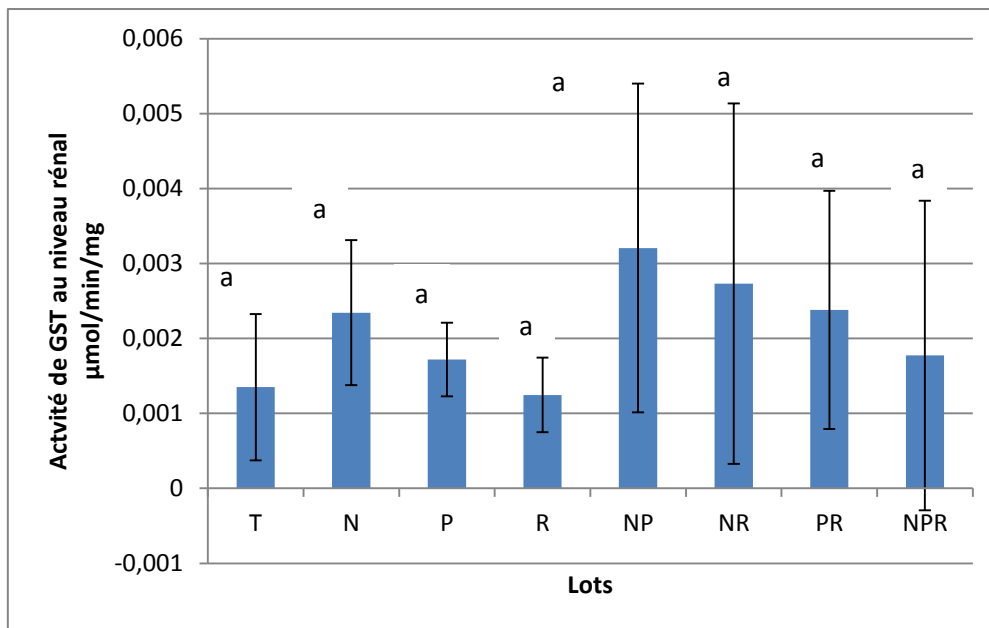


Figure 30: Variation des concentrations moyennes du GST rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-NiO, EMG et EMR.

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

II.2.5. Effet sur l'activité de CAT

Les variations des niveaux d'activité de la CAT au niveau rénal chez les souris témoins et traités par l'extrait méthanolique de grenade (EMG) et traités par l'extrait méthanolique *Retama sphaerocarpa* (EMRs) et aux nanoparticules de l'oxyde de Nickel (Nps-NiO) et leur combinaison sont présentés dans la **Figure 31**. Les NPs-NiO sont à l'origine d'une diminution significative de l'activité de la Catalase en comparaison avec les témoins ($0,9 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg vs $6,19 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg).

Nos résultats montrent que l'administration des EMG chez les souris provoque une augmentation non significative de l'activité moyenne de la CAT ($21,63 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg). De même, l'administration des EMRs chez les souris provoque une augmentation non significative de l'activité moyenne de la CAT ($21,25 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg).

Par ailleurs, chez les lots traités par les autres combinaisons, nous avons enregistré une diminution significative de l'activité de CAT en comparaison avec les témoins ($1,49 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg, $2,58 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg et $2,10 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg respectivement pour NP, PR et NPR respectivement).

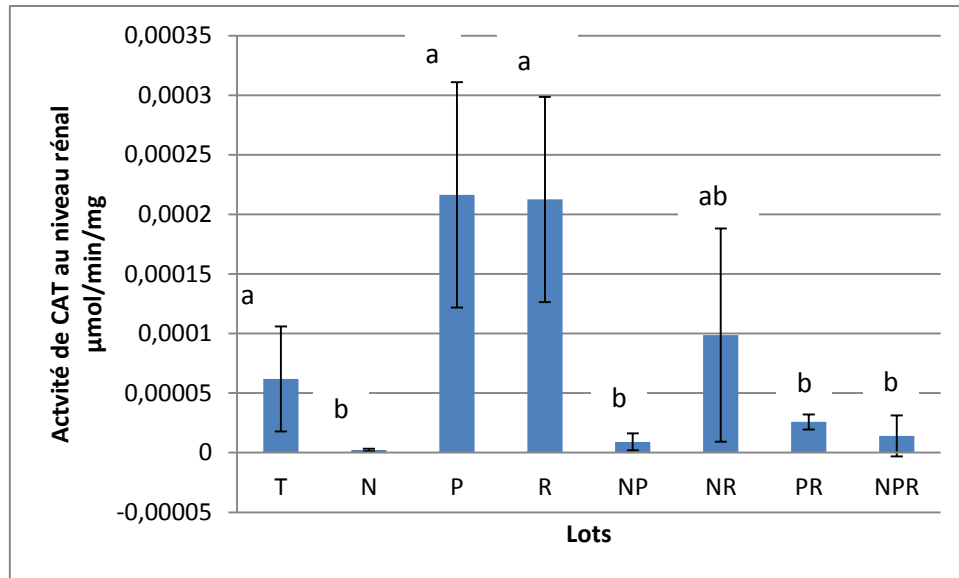


Figure 31: Variation des concentrations moyennes du CAT rénal chez les souris témoins et traités par le NPs-NiO, EMG et EMR.

Les moyennes affectées par des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$)

III. Discussion

Le but de notre travail est basé sur l'évaluation de l'empoisonnement par les nanoparticules d'oxyde de nickel sur un modèle biologique qui est les souris tout au long de la durée du traitement par voie orale, qui a duré 30 jours et l'estimation de l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de grenade et de *Rétama sphaerocarpa* en augmentant le système de défense antioxydant chez la souris et de déterminer si l'EMG et L'EMRs pouvaient être toxiques pour les reins. Dans la littérature, les travaux sur les NPs-NiO sont très rares. En effet, nous avons remarqué une rareté d'études sur l'effet protecteur de genre *Retama sphaerocarpa*. La comparaison de nos résultats avec ceux de littérature va se faire, si possible, avec les travaux qui se ressemblent le plus à notre travail.

III.1. Effets du NPs-NiO sur les paramètres biochimiques au niveau des reins

Partant du principe que tout type de contraintes environnementales (stress chimique, stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution), provoque une libération de radicaux libres dans l'organisme, une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (**Halliwell et Chirico, 1993**), glucides et ADN (**Jaeschke, 1995 ; Meneghini, 1997**).

III.1.1. Effet sur les glucides

L'analyse des paramètres biochimiques a montré une augmentation significative de la concentration des glucides au niveau rénal chez les souris traitées par les NPs-NiO. En fait, il n'existe pas vraiment de règle générale qui permet d'expliquer ou de prédire la toxicité associée à un mélange donné de produits chimique mais Cette peut être expliquée par plusieurs hypothèses notamment l'augmentation des réserves énergétiques ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires (**Carpy et al., 2000**).

III.1.2. Effet sur les lipides

Le résultat de l'effet du NPs-NiO sur le profile lipidique a montré une augmentation significative de la concentration des lipides chez les souris traités aux NPs-NiO par rapport aux témoins. Notre étude est concordante à celle de **Hfaiedh et al. (2008)** qui ont trouvé que le traitement par le nickel entraîne des perturbations du métabolisme lipidique. Cette augmentation peut être expliquée par le nickel peut conduire à la mort cellulaire par apoptose de certains lignées cellulaires, due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**Rudolf & Cervinka, 2010; Wang et al., 2012**). Ces dérivés lipidiques toxiques

induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible (**Hannun et al., 1996 ; Lee et al., 2016**).

Contrairement à nos résultats, d'autres études montrent une diminution des taux des lipides totaux après l'injection de Ni(II) qui peut être explicable par l'utilisation des lipides dans la production d'énergie aux fonctions vitales de l'organisme sous la toxicité du nickel (**Sidhu et al., 2004**) ou le résultat des dégradations intenses des lipides des tissus adipeux de l'organisme (**Cempel et Janicka, 2002**).

III.1.3. Effet sur le taux des protéines

A lumière de nos résultats, la toxicité par les NPs-NiO est associée à une augmentation significative du niveau de protéines tissulaires chez les souris traités en comparaison avec les témoins. Ceci peut-être expliqué par la cytolysse cellulaire par nécrose, conduisant à la libération des différents composants protéiques incluant les enzymes du foie dans le milieu extracellulaire d'où l'élévation de leur concentration dans le tissu (**Pari et Amudha, 2011**).

Dans autre étude, les résultats suggérant qu'une augmentation des protéines suite à une exposition aux xénobiotiques est causée par la synthèse et la production excessive des molécules protéiques enzymatiques et non enzymatiques impliquées dans les différents mécanismes de défense antioxydant ce résultat est proche à les résultats de (**Anadn et al., 1991 ; Benbouzib, 2012 ; Rouabhi et al., 2015**). Cet effet est expliqué d'une part par l'induction de la synthèse des protéines de stress en rapport avec le phénomène de bio activation/biotransformation et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les ROS. Alors, l'occurrence de l'ensemble de ces phénomènes au même temps peut être à l'origine de cet équilibre et qui est le résultat des effets conduisant à la production et la destruction des molécules protéiques de simultanément par des processus différents.

Contrairement à nos résultats, certaines études ont montré une diminution importante des protéines totales chez les rats traités par le Ni. Cette réduction est expliquée par le fait que la plus part des protéines possèdent des groupements (SH, OH) ces dernières réagissent très facilement avec le Ni et les radicaux libres générés par ce métalloïde et par conséquence ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structures primaires et secondaires (**Käkelä et al., 1999 ; Harris et al., 2011**). La liaison du Ni avec de certaines protéines de la chromatine dans les cellules somatiques peut entraîner des dommages oxydatifs et structurels importants (**Costa et al., 1994; Kasprzak, 2003**). De plus l'exposition des rats au stress environnemental (Ni) peut modifier le métabolisme des protéines des acides aminés et leurs synthèses au niveau du foie (**Stinson et al., 1992**). La

diminution des taux des protéines après l'injection de nickel peut être également due à une diminution de la consommation alimentaire d'apport protéique (**Pari and Amudha, 2011**).

III.2. Effet du NPs-NiO sur les paramètres de stress oxydatif au niveau des reins

Des études expérimentales ont montré que le stress oxydatif au niveau des systèmes biologiques est généralement suite à un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes et les défenses antioxydantes cellulaires (**Banerjee, et al., 1999**).

Concernant les paramètres de stress oxydatif, le traitement par le Ni a montré une altération remarquable des systèmes de défense antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques) et la peroxydation lipidique (lipoperoxydation). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, l'augmentation de la défense antioxydante (**Ece et al., 2007**). Parallèlement, des recherches antérieures avaient indiqué l'implication du stress oxydant dans les mécanismes de toxicité induits par le Ni (**Cavallo et al., 2003**). Alors, l'exposition aux métaux lourds, incluant le nickel peut induire un état de stress oxydant soit par production accrue des radicaux libres qui s'accumulent dans la cellule, ou par l'altération des mécanismes de défense antioxydant; y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou bien par l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les membranes cellulaires (**Attig et al., 2010**).

III.2.1. Effet sur le taux d'MDA

Selon **Draper et al. (1988)** et **Valko et al. (2005)** le MDA est l'aldéhyde le plus abondant résultant de la peroxydation lipidique. Cet aldéhyde peut être considéré comme un indicateur important de la peroxydation lipidique (**Favier, 1997 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2003**). La peroxydation lipidique est un processus de dégradation par oxydation des acides gras polyinsaturés et sa présence dans les membranes biologiques provoque une altération membranaire ainsi que la fonction et l'intégrité structurelle (**Gutteridge et Halliwell, 1988**).

Nos résultats ont montré une augmentation significative des niveaux du MDA dans le tissu rénal après exposition de NPs-NiO. Nos résultats confirment ceux de **Cemek et al., (2010)** et **Xiel et al., (1995)** qui ont trouvé le Ni contribue à la peroxydation lipidique dans les reins des souris et une altération du statut antioxydant chez des souris traitées par ces Ni. Cette altération est accompagnée d'une augmentation de la peroxydation lipidique. Ce qui expliqué par des effets néfastes de l'action du Ni dans le corps et l'induction de la formation d'espèces réactives de l'oxygène et l'augmentation de la peroxydation des lipides dans les cellules. La peroxydation lipidique constitue un processus d'oxydation radicalaire dans lequel les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire (**Pardeep et al., 2004**) décomposent

pour donner, entre autres, des hydroperoxydes lipidiques hautement réactifs (H_2O_2), un radical hydroxyle (OH^\cdot) et du malondialdéhyde. Il a été démontré que le malondialdéhyde provoque la réticulation et la polymérisation des composants de la membrane et peut contribuer aux effets mutagènes, génotoxiques qui est provoqué par l'altération des mécanismes de défense antioxydant; y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou bien par l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les membranes cellulaires (**Attig *et al.*, 2010 ; Misra *et al.*, 1990**).

III.2.2. Effet sur le taux GSH

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales : c'est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds (**Dickinson et Forman, 2002**).

La GSH joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. En effet, il est considéré en tant que composé essentiel qui maintient l'intégrité cellulaire en raison de sa propriété de réduction et de sa participation dans le métabolisme cellulaire (**Ben Amara *et al.*, 2011**). Par ailleurs, il est important dans le stockage et le transport de la cystéine et a également joué un rôle important dans les défenses cellulaires contre les radicaux libres et peroxydes. Par conséquent, Le GSH joue un rôle clé dans la détoxification des radicaux libres et des métaux lourds (**Hultberg *et al.*, 2001**) et dans le cas de nickel, ce dernier interagit directement avec une forte affinité aux groupements thiols (-SH) du GSH, deuxièmement, le glutathion peut aussi interagir avec les radicaux libres générés par ce métalloïde (**Anicka et Cempei, 2001 ; Ito *et al.*, 1998 ; Whanger, 1973 ; Weischer *et al.*, 1980**). D'après nos résultats on observe une augmentation significative de la GSH dans les reins. Cette augmentation reflète la participation du GSH à la défense cellulaire contre les ERO.

Contrairement à nos résultats, une étude antérieure a montré que l'intoxication par le Nickel induit un stress oxydatif accompagné par une diminution de niveaux systèmes de défense antioxydants GSH et GST au niveau rénal. En effet, **Djemli et Kechrid (2013)** et **Mahmoud (2012)** ont montré une réduction des niveaux de GSH en cas de toxicité par le nickel. Le nickel inhibe la glutathion synthétase, et la glutathion réductase (**James *et al.*, 2006**), donc peu de GSH est produit. Tous ces facteurs conduisent à une forte diminution du

glutathion réduit (GSH) et une augmentation du glutathion oxydé (GSSG), et par conséquence une diminution de la activité des enzymes GSH-dépendantes.

III.2.3. Effet sur le taux de GPx

La GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ROS, elle est fortement dépendante de la concentration en glutathion, l'équilibre de ce système enzymatique peut être essentiel d'éliminer anion superoxyde et peroxydes générés dans les tissus (**Bray et Taylor, 1993 ; Jung et Henke, 1996**). GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés, et donc protège les cellules contre les dégâts générés par les polluants (**Pardeep et al, 2004; Leelavinothan et Kasinathan, 2011**). Et d'après nos résultats on observe une augmentation significative de l'activité GPx dans le tissu rénal chez les rats traités par le nickel.

Contrairement à nos résultats, d'autres études montrent une diminution des taux de l'activité GPx dans le tissu rénal chez les rats traités par le nickel. Cette diminution est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et de GSH dans la détoxification de nickel (**Käkelä et al., 1999 ; kusal et al ., 2001**). Ce qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la GPx (GPx a besoin du glutathion pour fonctionner correctement) (**Nielson, 1995**).

III.2.4. Effet sur le taux de GST

Concernant la glutathion S-transférase (GST), enzymes catalysant la conjugaison du glutathion (possède un groupement nucléophile -SH) à une grande variété de composés (porteurs de groupements électrophiles) et également impliquée dans le transport et l'élimination de composés réactifs qui effectuent d'autres fonctions antioxydants, L'activité de la GST a également été largement utilisé comme un biomarqueur de stress (**Fitzpatrick et al., 1997**). Cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et elle a une grande capacité à réduire les peroxydes lipidiques (**Griffith,1999 ; Iscanetal, 2002**) et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Hayes et Pulford, 1995**). D'après nos résultats on observe une augmentation significative de la GST dans les reins. Donc la GST est impliquée dans la détoxification et l'élimination de nickel et ces métabolites (**Das et al., 2007**).

Dans une autre étude, l'exposition des lapins au NiCl₂, CPF et leurs mixture son induit une augmentation significative de l'activité GST. L'augmentation de l'activité de GST est

hautement corrélée avec la diminution du taux de GSH, et une forme de défense qui traduit la détoxification des xénobiotiques dans l'organisme pour permettre son élimination, et une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dues aux radicaux libres et qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GST pour réduire son effet toxique, ces résultats sont confirmés par les études de (**Ognjanović et al., 2008**). Des études similaires ont révélé une induction de la GST chez le rat (**Hultberg et al., 2001**). L'induction de cette enzyme a été aussi rapportée chez Mollusques Bivalves tels que *Perna viridis* exposé à différentes doses du cadmium (**Kamel et al., 2012**). La réponse de l'activité de la GST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (**Oruç et Üner, 2000**)

III.2.5. Effet sur le taux de CAT

La catalase (CAT) représente la deuxième étape du système de défense enzymatique. Elle prend en charge le peroxyde d'hydrogène précédemment produit par les SODs et le métabolise en eau (**Chakrabarti, 1982**). Il joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant (**Cakmak et Horst, 1991**). Elle consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire(O₂). D'après nos résultats on observe une diminution significative de l'activité de CAT dans le rein chez les souris traitées au NPs-NiO comparativement au lot témoin. Cette diminution est concomitante à la surproduction du O₂•⁻ et H₂O₂ ce qui peut être l'origine de l'oxydation des composants cellulaires majeurs comme les lipides, les protéines et l'ADN causant leurs inactivations et leurs dégradations ultérieures (**Das et al., 2001**). Ce résultat suggèrent que le Ni induit indirectement une augmentation de H₂O₂, donc il est causé un cas de stress oxydatif. En effet, la diminution des activités CAT provoque une augmentation de H₂O₂. Ceci est en accord avec des études antérieures, réalisées sur des souris intoxiquées en présence de NPs (**Li et al., 2012 ; Niska et al., 2015**).

III.3. Effet des extraits EMR et EMG sur les paramètres biochimiques et du stress oxydatif.

D'une manière générale, les résultats de la présente étude n'ont pas montré une variation significative des différents paramètres biochimiques et du stress oxydatif en cas de traitement par l'EMG et l'EMR en comparaison avec les témoins. A notre connaissance, il n'existe pas d'études antérieures ayant pour problématique d'étudier la toxicité de ces deux extraits. Nous sommes les premiers à avoir pensé à étudier leur éventuel effet pro-oxydant. Pour cette raison, il nous a été très difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature et même d'expliquer les rares variations en comparaison avec les témoins.

II.4. Effet protecteur de l'EMR et l'EMG contre les NPs-NiO

Dans la présente étude, l'administration de l'extrait méthanolique de *Retama sphaerocarpa* en association avec les nanoparticules d'oxyde de nickel a légèrement ajusté les désordres biochimiques (lipides, glucides et protéines) et a légèrement amélioré le paramètre du stress oxydatif. Ce faible effet protecteur peut être dû soit au choix de la dose de l'EMRs administré au souris, soit à la durée du traitement, à la concentration de composé chimique localisé dans les différentes parties de la plante (tige, grain, feuille, rameaux..) extraite ou soit au choix de l'extrait. Cet effet protecteur probable est dû à l'activité antioxydante d'EMRs. En effet, **Boussehl et al., (2017)** ont rapporté des propriétés antioxydantes et antiglycation des extraits méthanolique et aqueux de fruit de *Retama sphaerocarpa*. L'extrait de méthanol présentait une teneur plus élevée en flavonoïdes. Ces extraits ont montré une activité antioxydante remarquable. L'extrait de méthanol a également induit une diminution importante de la formation de produits finaux de glycation avancée qui sont liés au stress oxydatif, à l'inflammation et à la résistance à l'insuline, ce qui suggère que cet extrait riche en flavonoïdes est capable de prévenir les réactions entre les sucres réducteurs et les protéines qui conduisent à une glycation non enzymatique. De même, **Javanoci et al., (1994)** ont trouvé que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. L'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres. D'autre part, des études ont déterminé expérimentalement que l'extrait méthanolique aqueux de graines de *Retama retam* est également actif comme agent hépato-protecteur pour réduire les altérations histopathologiques induites par la CCL4. Cet extrait pourrait également inverser l'augmentation des taux sériques pathologiques d'aspartate et d'alanine aminotransférase et de phosphatase alcaline (**Ganzalez et al., 2018**). De même, **Korriem et al. (2010)** a trouvé des résultats similaires pour la toxicité hépatique, sanguine, et rénale induite par le formol, la capacité de différents extraits de *Retama retam* a diminuée le cholestérol sérique ainsi que sa capacité à restaurer les niveaux sériques des enzymes hépatiques et à inverser les altérations histopathologiques. Une autre étude considérant l'extrait aqueux de *Retama retam* a rapporté des effets antihypertenseurs et diurétiques sur les rats hypertendus, en augmentant l'excrétion de sodium, de potassium et de chlorure, ainsi qu'en agissant comme une amélioration du taux de filtration glomérulaire (**Eddouks et al., 2007**). D'après la littérature, l'extrait aqueux a aussi un effet

hypoglycémique. En effet, l'administration orale d'une dose de 20mg/kg de l'extrait aqueux de *Retama retam* réduisait de façon significative le taux de glucose dans le sang des rats normaux ainsi que des rats diabétiques, cette hypoglycémie peut être expliquée par la stimulation de la libération d'insuline par le pancréas et la réduction de l'absorption intestinal du glucose (**El fennouni, 2012**).

Conclusion

Conclusion

Conclusion

L'utilisation des extraits de plantes sont encore aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde, qui permet de remédier à des problèmes du quotidien de manière naturelle. Notre travail avait pour objectif d'évaluer l'effet protecteur des extraits méthanoliques de l'écorce de grenade (EMG) et de *Retama spherocarpa* (EMRs) sur des souris mâles intoxiquées par les nanoparticules d'oxyde de nickel. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- Les taux des métabolites biochimiques au niveau rénal ont été perturbés par les NPs-NiO notamment une augmentation des taux de glucides, de protéines et de lipides par rapport aux témoins.
- Les NPs-NiO sont à l'origine d'une perturbation significative des paramètres oxydatifs des souris.
- Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de grenade a légèrement ajusté les désordres biochimiques (lipides, glucides et protéines) et a légèrement amélioré les paramètres du stress oxydatif chez les souris intoxiquées par les NPs-NiO.
- Cet effet régulateur est dû à la teneur élevée de l'EMG en polyphénols doués d'activité antioxydante. Ceci nous permet de proposer l'EMG dans tout schéma thérapeutique de l'intoxication par les NPs-NiO.
- Malgré que *Retama sphaerocarpa* possèdent un effet antioxydant très connu, les résultats de cette étude ne semblent pas être concluants quant à leur effet protecteur vis-à-vis l'intoxication par les nanoparticules d'oxyde de Nickel. Ce faible effet protecteur peut être dû soit à la dose administrée, à la durée du traitement ou à la partie de la plante utilisée. Ceci n'empêche pas de proposer l'EMRs dans quelconque schéma thérapeutique lors d'une l'intoxication par les NPs-NiO.

Afin d'approfondir les résultats dans la présente étude, il semble approprié de conduire des recherches futures axées notamment sur :

- Evaluer les effets d'une exposition chronique aux Nps-NiO sur une période plus longue avec d'autres doses afin de mettre en évidence leurs effets toxiques.
- Conduire cette recherche sur d'autres modèles biologiques et d'autres types d'extraits.
- Approfondir l'étude par des techniques plus complètes au niveau subcellulaire et moléculaire.

REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Reference bibliographique :

- **A.B. Kunz, J. Phys.** C141 (1981) 445.
- **A.J. Varkey, A.F. Fort,** Thin Solid Film 235 (1993) 47.
- **Adalis, D., Gardner, D.E. & Miller, F.J. (1978).** Cytotoxic Effects of Nickel on Ciliated Epithelium. *The American review of respiratory disease*, 118(2), 347-354.
- **Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C-G., Reed, J-D., Mukhtar, H. (2005).** Anthocyanin- and hydrolysable tannin-rich pomegranate fruit extract modulate MAPK and NF-Kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD- mice. *International Journal of Cancer*, 113:Pp 423-433.
- **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum* ; 74 : 636-643.
- **Aggarwal BB, Sundaram C, Prasad S, Kannappan R. Tocotrienols,(2010)** the vitamin E of the 21 st century: Its potential against cancer and other chronic diseases *biochemical pharmacology*; 80: 1613-1631.
- **Ahamed M, Ali D, Alhadlaq HA, Akhtar MJ (2013).** Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). *Chemosphere*;93(10):2514–22.
- **Ajaikumar K. B., Asheef M., Babu B. H., Padikkala J. (2005).** The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J of Ethnopharmacology*, 96: 171–176.
- **Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al.** Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and invasion of human prostate cancer cells. *J Med Food*. 2004 Fall;7(3):274-83.
- **Al-Said F.A., Opara U.L. Al-Yahyai R.A. (2009).** Physico-chemical and textural quality attributes of pomagranate cultivars (*Punicagranatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering* 90: 129-134
- **Anadn A., Martinez L., Diaz M., Bringas P., Fernandez M., (1991).** Effect of deltamethrin on antipyrene pharmaeokinetics and metabolism in rat. *Arch Toxicol* 65: 156-159./-5-A.R.L., Lausanne., mars 2010. Dr Méd. Dany Mercan Unilabs .
dany.mercan@unilabs.com

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Anicka, K., Cempei, M.(2001).** Lipid peroxidation and selected antioxidants in rat liver after oral exposure to nickel (II) chloride Bromate. *Chem. Toksykol.* 34 (4). p : 291
- **ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2006.** Draft toxicological profile for aluminum. September 2006 draft for public comments. Washington (DC) :U.S.Department of Health and Human Services, Public Health Service.Accès : <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.html>
- **Attig, H., Dagnino, A., Negri, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., Banni, M (2010).** Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethalnickel concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73(7):** 1712-9.
- **Audrey, F., Dumax-Vorzet, M., Tate, R.W., Rhod, H., Elder, A., & Povey, C (2015).** Cytotoxicity andgenotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. *Mutagenesis* 30(5), 621–633.
- **Aviram, M.; Dornfeld, L. (2001).** Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure- *Atherosclerosis*: Pp 195-198.
- **Azzi A.** Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med*, (2007); 43: 16-21.
- **Bahi.K ,1991.** Contribution à l'étude de *Rétama monosperma* étude du système racinaire et recherche des associations de type *Rhizobium*.in In *Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de Rétama monosperma(boiss) : mémoire de magistère . UNIV.des sciences et de la technologie d'Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.*
- **Bai C, Capell T, Berman J, Medina V, Sandmann G, Christou P, Zhu C.** Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance. *Plant biotechnol J*, (2016), 14: 195-205.
- **Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A. et al. (1999).** Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett.* 107: 33-47.
- **Bartosz G. (2003)** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, **9**, 5-21.
- **Basu, A., Penugonda, K. (2009).** Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.* 67(1): Pp49-56.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Ben Amara, I., Troudi, A., Garoui, E.M., Hakim, A., Boudawara, T., Zeghal, K.M., Zeghal, N. (2011).** Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63. 553-561
- **Benbouzib H (2012)** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat. Annaba University. 87pp
- **Benmiloud-Mahieddine, R., Abirached-Darmency, M., Brown, S. C., Kaid-Harche, M., & Siljak-Yakovlev, S. (2011).** Genome size and cytogenetic characterization of three Algerian *Retama* species. *Tree genetics & genomes*, 7(5), 987.
- **Benoît Bock.(2013).** *Tela Botanica : Base de données Nomenclature de la flore en France. BDNFF, 4p.*
- **Blache D, Bouthillier D, Davignon J:** Acute influence of smoking on platelet behaviour, endothelium and plasma lipids and normalization by aspirin. *Atherosclerosis* 1992, 93(3):179-188.
- **Blinova, M.I., Iudintseva, N.M., Nikolaenko, N.S., Potokin, I.L., Raykhtsaurn, G., Borg, K., & Tjälve, H. (1988).** Effect of thiram and dithiocarbamate pesticides on the gastrointestinal absorption and distribution of nickel in mice. *Toxicology Letters*, 42(1), 87–98.
- **Boon CS, Mc Clements DJ, Weiss J, Decker EA.** Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2010; 50: 515-532.
- **Boullard B. (1997).** Dictionnaire plantes et champignons. Edition ESTEM, Paris, p : 380. ISBN : 2-909455-99-8.
- **Bray, T.M. et Taylor, C.G. 1993.** Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71. 746-751
- **Brigelius-Flohe R.** Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med*, 2009; 46: 543-54.
- **Cakmak, E.T., Horst.1991.** Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia plantarum*. 83. 463-468
- **Calin Sanchez A. et CarboneliBanaching A.A. (2012).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les L'aliment fonctionnel du fruit. Livre. Natural ontioxydantgranatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, p.77.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Calin Sanchez Angel & Carboneli Banaching Angel A. (2005).** La grenade cultivées en Espagne Punicalogine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, 77p.
- **Capasso L, Camatini M, Gualtieri M.** Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2014;226(1):28–34.
- **Carpy, SA., Kobel, W., Doe, J. 2000.** Health risk of low-dose pesticide mixtures: a review of the 1985–1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *J Toxicol Environ Health B* 3. 1–25.
- **Cavallo, D., Ursini, CL., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B and Iavicoli, S (2003).** Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol. In Vitro* **17(5-6):** 603-607.
- **Cemek M., Buyukben A., Buyukokuroglu M. E., Aymelek F. et Tur L. (2010).** Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 96: 113-118.
- **Cempel M and Janicka K.(2002).** Distribution of nickel, zinc, and copper in rat Organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol. Trace.Elem.Res.* **90 (1),** 215–226.
- **Chakrabarti SK, Bai JY (1999).** Role of oxidative stress in nickel–chloride-induced cell injury in renal cortical slices, *Biochem. Pharmacol.* **28,** 1501–1510.
- **Championnière Just Lucas.1850.** Journal de médecine et de chirurgie pratique: à l'usage des mediciens praticiens. Imprimerie de Crapelet (EDS), Paris, 21p.
- **Chen R, Seaton A.** A meta-analysis of painting exposure and cancer mortality. *Cancer Detect Prev.* 1998; 22(6):533–9.
- **Chen, X. et Schluesener, H.J. (2008).** Nanosilver: ananoproduct m medical application. *ToxicolLett,* 176(1), 1-12.
- **Chen, Z., Gallie, D.R., 2004.** The ascorbic acid redox state controlsguard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell Online* 16, 1143-1162.
- **Clémentine, (2013).** Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11. P. 124.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Clemmensen OJ, Menné T, Kaaber K, Solgaard P.** Exposure of nickel and the relevance of nickel sensitivity among hospital cleaners. *Contact Dermatitis*. 1981;7(1):14–8.
- **Commissariat à l’Energie Atomique, (2005).** Clefs du ce a n°52 : Le nanomonde, de la science aux applications. In : Angélique S.D., (2008). «Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques».Thèse de doctorat, Ecole Doctorale ABIÉS, 225P.
- **Costa M., Salnikow K., Cosentio Z. et al. (1994).** Molecular mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 102: 127-130.
- **Cotton, FA & Wilkinson, G (1988)** ‘Advanced Inorganic Chemistry’ A Comprehensive Text Wiley-Interscience New York NY John Wiley and Sons 783 798.
- **Crump KS.** Lung cancer mortality and diesel exhaust: Reanalysis of a retrospective cohort study of US railroad workers. *Inhal Toxicol.* 1999; 11(1):1–17.
- **D. Adler, J. feinleib,** *phys. Rev. B* 2 (1970) 3112.
- **D.E. Jonas, H.L. McLeod,** Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 375e386.
- **Das K.K., Gupta A.D., Dhundasi S.A. et al. (2006).** Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 17: 29-44.
- **Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008).** Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res.* **128**, 117-131.
- **Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 2005a; 1 - 405.
- **Dickinson, DA., Forman, HJ. 2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.*64 .1019-26
- **Djemli, S., Kechrid, Z., & Mohamed R. D. (2012).** Combined protective effect of zinc and vitamin C on nickel-induced oxidative liver injury in rats. *Annals of Biological Research,* 3(7), 3410-3418.
- **Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G. et Wilkinson, K.J. (2009).** Characterizing manufactured

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol*, 43(19), 7277-7284.
- **Draper, H.H., Hadley, M. 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186. 241-431.
 - **Drobne, D. (2007).** Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arch Drug and chemical toxicology*, 36, 296-305.
 - **E. Avendano, L. Berggren, G.A. Niklasson, C.G. Granqvist, A. Azens,** Electrochromic materials and devices: Brief survey and new data on optical absorption in tungsten oxide and nickel oxide films, *Thin Solid Films*, **496** (2006) 30-36.
 - **Ece, A., Gurkan, F., Celik, F., Boşnak, M., Yel, S., Balik, H. & Erel, O. (2007).** Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clinical Biochemistry Journal*, 40(9-10), 634-639.
 - **EL-HAMROUNI A ; 2001 :** végétation forestier et pré forestier de la tunisie 220p.
 - **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 May;76(3):147-51.
 - **Espiard E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. TEC&DOCLavoisier, Paris, France, 181-182.
 - **Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G,** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol. Med.*, 1992, 13, p. 341.
 - **Favier, A. 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. *L'actualité Chimique*, 108-115
 - **Fawole O.A., Opara U.L. Theron K.I. (2011).** Chemical and phytochemical properties and antioxidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food Bioprocess Technology*.
 - **Fiche de synthèse sur la criticité des métaux - Le nickel – Décembre- 2016-P8**
 - **Nielsen, N.H & Menne, T. (1993).** Nickel sensitization and ear piercing in an unselected Danish population. *Contact Dermatitis*, 29(1), 16–21. doi:10.1111/j.1600-0536.1993.tb04530.x
 - **Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh A.R. 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2: 51–56

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Flora SJ, Mittal M, Mehta A.** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res*, 2008; 128, 501-523.
- **Fournier P. (1948).** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. *Paul Lechevalier* :Tome II : 291- 504.
- **Foyer, C.H., Harbinson, J., Mullineaux, P.M., 1994,** Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes photooxidative Stress Amelior. *Def. Syst. Plants* 1-42.
- **Foyer, C.H., Noctor, G., 2005a** Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant cell Online* 17, 1866-1875.
- **Gardner, D.E. (1980).** 'Dysfunction of Host Defenses Following Nickel Inhalation *Nickel Toxicology*, S.S. Brown et F.W. Sunderman F W Jr (éd.), Academic Press, Londres (Angleterre).
- **Geneviene ,M.(2012).** Se soigner avec les jus frais selon l' Ayreda. *Revue électronique n°143. Alternative (EDS), 3p.*
- **Grassian, V.H., O' Shaughnessy, P.T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M. et Gui, S., Zhang, Z., Zheng, L., Cui, Y., Liu, X., Li, N., ...Cheng, J. (2011).** Molecular mechanism of kidney injury of mice caused by exposure totitanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 195,365–370.
- **Griffith, O.W. 1999.** Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biol. Med.* 27: 922-935
- **Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ.** Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences.* 2006; 31: 455-464.
- **Gutteridge J.M. et Halliwell B. (1988).** Oxygen radicals and tissue injury. *FASEB.* 9-19.
- **H.J. Cho, K.H. Sohn, H.M. Park, K.H. Lee, B. Choi, S. Kim, J.S. Kim, Y.K. On, M.R. Chun, H.J. Kim, J.W. Kim, S.Y. Lee,** Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients, *Pharmacogenomics* 8 (2007) 329e337.
- **H.P. Klug, L.E. Alexandre.** "X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials", "Wiley", New York, 1974.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Haase, P., Pugnaire, F.I., Fernández, E.M., Puigdefábregas, J., Clark, S.C., Incoll, L.D. (1996).** Investigation of rooting depth in the semiarid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. by labelling of ground water with a chemical tracer. *J Hydrol* **177**, 23–31.
- **Halliwell B.** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 1990; 9: 1-32.
- **Hannun, Y. A. 1996.** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855–1859.
- **Hara, K., Zhao, Z.G., Cui, Y., Miyauchi, M., Miyashita, M. et Mori, S. (2011).** HigRadaToksikol, **58**(4), 471-478. implants with the different structure. *Tsitologiya*, **52**(10), 835-843.
- **Harber, L.T., Diamond, G.L., Zhao, Q., Erdreich, L., & Dourson, M.L. (2000).** Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **31**(2 Pt 1) : 231-41.
- **Harris, R.M., Williams, T.D., Hodges, N.J., Waring, R.H (2011).** Reactive oxygen species and oxidative DNA damage mediate the cytotoxicity of tungsten–nickel–cobalt alloys in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **250**: 19–28.
- **Hattiwale, S.H., Saha S, Yendigeri, S.M., Jargar. J.G., Dhundasi, S.A., & Das K.K (2013).** Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. *Biometals.* **26**: 329–336.
- **Hayes J.D. et Pulford D.J. (1995).** The glutathione *S*-transferase supergene family : regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**: 445-600.
- **Hfaïedh, N., Allaqui, M.S., Croute, F., Soleilhavoup, J.P., Jammoussi, K., Makni Ayadi, F., Kammoun, A. & El Feki, A. (2005).** Interaction du jeûne intermittent sur les effets cytotoxiques rénaux du nickel chez le rat pubère. *Comptes Rendus Biologies*, **328**(7), 648–660.
- **Hfaïedh, N., Allaqui, M.S., Croute, F., Soleilhavoup, J.P., Jammoussi, K., Makni Ayadi, F., Kammoun, A. & El Feki, A. (2005).** Interaction du jeûne intermittent sur les effets cytotoxiques rénaux du nickel chez le rat pubère. *Comptes Rendus Biologies*, **328**(7), 648–660.
- **H-L. Chen, Y-M. Lu, W.S. Hwang,** *Thin Solid Film*, **498** (2006) 266.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Hmid I. (2013).** Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade (*Punica granatum L.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de Doctorat présenté en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal, Maroc. p. 180.
- **Hmid, I. 2014.** Contribution à la valorisation alimentaire de la Grenade marocaine (*Punica granatum*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leurs jus vrais. Food and nutrition, archives ouvertes de l'université d'Anger
- **Ho W, Furst A.** Nickel excretion by rats following a single treatment. Proc West
- **Hultberg, B., Anderson, A., Isakson, A. 2001.** Interactions of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potential of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*. 56, 93–100
- **Hultberg, B., Anderson, A., Isakson, A. 2001.** Interactions of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potential of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*. 56, 93–100
- **Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K:** Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003, 10(23):2495-2505.
- **Iscan, M., Ada, A.O., Coban, T. 2002.** Combined Effects of Cadmium and Nickel on Testicular Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Rats, *Biological Trace Element Research*. 89: 178-190
- **Iserin P. (2001).** Encyclopédie des Plantes Médicinales : identification, préparation, soin. 2^{ème} édition, Larousse. 335p, ISBN: 2-03-560252-1.
- **Ito, H., Okamoto, K., Kato, K. 1998.** Enhancement of expression of stress proteins by agents that lower the levels of glutathione in cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1397, 223–230
- **J. Tauc,** Amorphous and Liquid Semiconductors, Plenum, London, (1974).
- **J.P. Tillement, R. Zini, P. d' Athis, G. Vassent,** Binding of certain acidic drugs to human albumin: theoretical and practical estimation of fundamental parameters, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7 (1974) 307e313.
- **Jacob C, Knight I, Winyard PG.** Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem.* 2006; 387:1385-1397.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **James, C.W., Lamaa, Sh.T., Simon, K.F., Chanc, M. H.W., Lam, M. M., Paul. K.S .2006.**Nickel-seleniuiinteraction-time dependentbiochemical alterations and metal decorporation IN RATS *Lam Environmental Pollution* 144 790_801
- **Jennifer BARAKA-VIDOT,(2014).** Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion - Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. l'université de la Réunion. P. 42.
- **Jensen SK, Lauridsen C.** Alpha-tocopherol stereoisomers. *Vitam Horm*, 2007; 76: 281-308.
- **Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W., 1992.** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* (1985) 73, 1854-1859.
- **Jung, K., Henke, W. 1996.** Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 613-617
- **Jurenka, J-S. (2008).** Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.* 2008 Jun; 13(2): pp128-44.
- **Kamel, N., Jebali, J., Banni, M., Ben Khedher, S., Chouba, L., Boussetta H. 2012.** Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82: 40-46
- **Kasprazk S Kazimirz, sunderman william slankiw konstanin (2003).**Nickel corcinogenesis laboratory of comparative carcinogenesis National cancer institute at frederick *Mutation Reaserch* 533(2003)67-97
- **Kassem, M., Mosharrafa, S. A., Saleh, N. A. M., & Abdel-Wahab, S. M. (2000).** Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*, 71(6), 649-654.
- **Katz, S.(2007).** Punica granatum: heuristic treatment for diabetes mellitus-*Journal of medicinal food*. Pp 213-217.
- **Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J. et Lead, J.R. (2008).** Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825-1851.
- **Kohen R, Nyska A:** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002, 30(6):620-650.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Krieger-Liszkay, A., 2005.** Singlet oxygen production in photosynthesis. *J, Exp. Bot.* 56, 337-346.
- **LAIRINI S.** - Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punicagranatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante (Enhancement of the aqueousextract of the bark of *Punicagranatum* fruit through the study of its antimicrobial and antioxidant activities)- . *Université Sidi Mohammed Ben Abdallah, 1Equipe Bioindustrie et Technologie Alimentaire. Laboratoire Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire, Ecole Supérieure de Technologie de Fès, Maroc.*
- **Landrier Jf.** Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Oleagineux Corp gras lipides*, 2011; 1: 83-87.
- **Lansky ,E.(2005).**Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel™ - . *Investigational new drugs* . pp 121-122.
- **Lansky E. et Newman R. (2007).** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.
- **Lee, Y.J., Lim, S.S., Baek, B.J., An, J.M., Nam, H.S., Woo, K.M., Cho, M.K., Kim, S.H., Lee, S.H (2016).** Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **42**:76-84.
- **Leelavinothan, P et Kasinathan, A. 2011.** Hepatoprotective role of naringin on nickelinduced toxicity in male Wistar rats.*Eur J Pharmacol.* 650: 364-370.
- **Levin G. M. (1994).**Pomegranete(*Punicagranatum*) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:31-37
- **Levine RL, Stadtman ER.** Oxidative modification of proteins during aging. *Experimen gerontol.* (2001); 36: 1495-1502.
- **Li A, Han L, Han CC.** Antioxidant and neuroprotective activities of essential oil, isolated from chinese herb pairs of *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. *J Appl Pharm Sci.* (2012);2(5):1–4.
- **Li, Q., Liu, H., Alattar, M., Jiang, S., Han, J., Ma, Y., & Jiang, C (2015).** The preferential accumulation of heavy metals in different tissues following frequent respiratory exposure to PM2.5 in rats. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep16936
- **Lou, J., Jin, L., Wu, N., Tan, Y., Song, Y., Gao, M., Liu, K., & Zhang., He, J (2013).** DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 533–540. doi:10.1016/j.fct.2013.01.053
- **Lu, S. C. (2013)**. "Glutathione synthesis." *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3143-3153. Lungato, L., Marques, M. S., Pereira, V. G., Hix, S., Gazarini, M. L., Tufik, S. and D'Almeida, V. (2013). "Sleep deprivation alters gene expression and antioxidant enzyme activity in mice splenocytes." *Scand J Immunol* 77(3): 195-199.
 - **Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggard, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G. et Dawson, K. (2011)**. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*, 5(9), 7503-7509.
 - **Lyubenova, L., Schroder, P., (2010)**. Uptake and effect of heavy metals on the plant detoxification cascade in the presence and absence of organic pollutants, in: *Soil Heavy Metals*. Springer; pp. 65-85.
 - **Mac Laren D.** Advances in sports and exercise science series. In: Close GL, McArdle F.(Eds). *Nutrition and Sport. Antioxidants and free radicals*. Chapter 8. Elsevier. 153-75, (2007)
 - **Mahmoud, K., Shalahmetova, T. & Deraz, S.(1995)**. Investigation Of Antioxidant System Activity In Rats Live Exposed To Ammonium Metavanadate And/ Or Nickel Sulfate. *Journal of Toxicology and Environmental*, 6(1): 24-32.
 - **Maire, R.** (1552-1987). *Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara)*. Volumes I à XVI. Lechevalier, Paris in *Encyclopédie biologique*.
 - **Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H.** Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14813-8.
 - **Masaki H.** Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci*, 2010; 58; 85-90.
 - **Mazzola, L. (2003)**. Commercializing nanotechnology. *Nature biotechnology*, 21(10), 1137-1143.
 - **Melgarejo, P., Valero, D. (2012)**. *International Symposium on the Pomegranate*. Edition Zaragoza. Ciheam. Spain. 337 p.
 - **Misra, M., Rodriguez, R. E., & Kasprzak, K. S. (1990)**. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1), 1–17. doi : 10.1016/0300-483x(90)90095-x

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Morton J. (1987)**. Pomegranate. In: Fruits of warm climates. Miami, Florida. p. 352–355.
- **Mouffok S.** Effets toxiques du chlorure de Nickel sur la déterminisme de la reproduction chez la rate gestante de souche Wistar. Mémoire de Magister en biologie cellulaire et physiologie animales. Université El Hadj Lakhdar-Batna; (2008).
- **Murphy Cowan M .(2004)**. Plants as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582
- *n°143. Alternative (EDS), 3p.*
- **Nielson F. (1995)**. Other trace elements. In: Ziegler EE, Filer LJ, editors. Present knowledge in nutrition. 7th ed. Washington. DC: ILSI Press. 353-77.
- **Niska K, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I.** CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicol Vitr.* (2015);29(4):663–71.
- **Obone, E., Chakrabarti, S.K., Bai, C. & Kalick, M.A. (1999)**. Toxicity And Bioaccumulation Of Nickel Sulfate In Sprague-Dawley Rats Following 13 Weeks Of Subchronic Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 57(6), 379–401.
- **Ognjanović, B.I., Marković, S.D., Pavlović, S.Z., Zikic, R.V., Stajn, A.S., Saicić, Z.S . 2008.** Effet de l'exposition chronique de cadmium sur le système de défense antioxydant dans certains tissus de rats : effet protecteur du sélénium. *Physiol Res.* 57 (3) : 403-11
- **Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL, Geiszt M:** Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant* (2007), 22(5):1281-1288.
- **Oruç, E.Ö., Üner, N. 2000.** Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 127: 291–296.
- **Oukabli A., Bellaji M., Chahbar A., Elkacemi A., Lahlou M. et Allabou M. (2004)**. Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum L.*) conduits dans la région de Meknès. *Al Awama* 3: 111.
- **Oukabli, A. (2004)**. Le grenadier: Des variétés performantes pour la culture. Dans : Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA. Transfert de Technologie en

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Agriculture. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et des Pêches maritimes, n0123.

- **Ozenda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition. Paris : CNRS. 662 p.
- **Palozza P, Simone R, Picci N, BUzzoni L, Ciliberti N, Natangelo A, Manfredini S, Vertuani S.** design, synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radic Biol Med*, 2008; 44: 1452-1464.
- **Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, Aronson W, Hong J, Barnard RJ, et al.** Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* (2006) Jul 1;12(13):4018-26.
- **Pardeep, S., Garg, M. L., & Dhawan, D. K. (2004).** Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 150(2), 199–209.
- **Pardeep, S., Garg, M.L., Dhawan, D.K. 2004.** Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 150: 199-209.
- **Pari L and Amudha K (2011).** Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology* **650**, 364–370
- **Pari, L & Amudha, K (2011).** Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur. J Pharm.* **650 (2011):** 364–370.
- **Pari, L. & Prasath, A. (2008).** 'Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats ' *Chemico-Biological Interactions* 10:1016
- **Pontanier R., M'Hiri A., Akrimi N., Aronson J. et Le Floc'h E., 1995.** –l'homme peut-il refaire ce qu'il a défait ?. *John Libbey Eurotext* , Paris pp. 161-186.
- **Powers S., Jackson M. (2008).** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **88**: 1243-1276.
- **Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008.** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88, 1243-1276.
- **PRASHANTH D., ASHA M.K., et al.** - Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. 2001. N°72. P 171-173.
- **Qian F, Pang HL, Xu XR, Zou ZY, Dong PC, Xiao X, Wang X, Sun TT, Dou HL, Lin XM.** Effect Of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2012; 119: 2290-2297.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Quezel et Santa;1962.** Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I.P156-162.
- **Rao C.V. (2004).** Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research*, **555**, 107-119.
- **Reichel F-X. (2010).** Guide pratique de toxicologie. 2e édition. De Boeck, Bruxelles. 202, 203, 148.
- **Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M.** Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*, (2007); **52**: 2015-2021.
- **Rondeau P, Singh N, Caillens H, Bourdon E:** Oxidative Stresses Induced by glycated human or bovine serum albumins on human monocytes. *Free Radic Biol Med* (2008), **45(6)**:799-812.
- **Rosenblat M, Hayek T, Aviram M.** Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006 Aug;**187(2)**:363-71.
- **Rouabhi R., Gasmi S., Boussekine S., Kebieche M., (2015).** Hepatic oxidative stress induced by zinc and opposite effect of selenium in oryctolagus cuniculus *Journal Environ Anal Toxicol* **5**: 289-298
- **Rudolf,E., Cervinka,M., 2010.** Zinc pyrithione induces cellularstress signallingand apoptosis in Hep-2 cervical tumor cells: the role of mitochondria and lysosomes. *Biometals***23**, 339–354
- **S. Gover, G.Hodes, J. phys.** Chem. **98** (1994) 538.
- **Saad, H. (2013).** Développement de bio-composites à base de fibres végétales et de colles écologiques. Thèse. Doct. Fac. Chimie, Université. Pau et des Pays de l'Adour, 107- 109 pp.
- **SAFI, A., & BENBRAHIM, R. (2017).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques d'extrait des écorces de Punica granatum (Grenade).
- **Schubert SY, Lansky EP, Neeman I.** Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1999 Jul;**66(1)**:11-7.
- **Seeram, N-P., Lee R., Heber, D. (2004).** Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clin Chim Acta*; **348(1-2)**: Pp 63-8.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Serrano E, Diaz J, Acosta F, Palenciano CG, Parrilla P, Carbonell LF:** Oxidative stress during ischemia-reperfusion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2000, 32(8):2651.
- **Shallaby A, monayer IM, Etman MA, El Habibi AM, youssdef MP. 1972.** Germination of some desert medicinal plant under different condition. Inst. Bull, ARE, 22N2? 433P I bouredje.n, 2005, Etude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Retama monosperma* (boiss) ; mémoire de magistère. UNIV .des sciences et dde la technologie d"oran Mohammed Boudiaf (U.S.T.O) Oran.
- **Siddiqui MA, Ahamed M, Ahmad J, Majeed Khan MA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Alrokayan SA.** Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):641–7.
- **Spichiger R.-E., Savolainen V. V., Fig M. et Jeanmonod D. (2002).** Botanique systémique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. 2ème éd., Presse Polytechniques et universitaires, Lausanne, p : 286- 287. ISBN : 2-88074-502-0.
- **Squier TC.** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimen gerontol.* 2001; 36: 1539-1550.
- **Stover E. and Mercure F. w., 2007.** The pomegranate : a new look at the fruit of paradise. *Hort Sci.* 42:1088-1092 stress during ischemia-reperfusion in liver transplantation. *Transplant Proc* 2000, 32(8):2651.
- **Sunderman F W, Jr & Oskarsson , A (1988)** 'Nickel 'Metals and their Compounds in the Environment E. Merian (éd.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinhem (R.F.A.) 119.
- **Touati Razika, A.O.Santos Sonia, Silvia M. Rocha, Kamel Belhamel, Armando J.D Silvestre(2015)** *Retama spherocarpa* an unexploited and rich source of alkaloids, un saturaterfattyacids and othervaluable phytochemicals. *Industrial corps and Products.*69 (2015)238-243.
- **Traber MG, Atkinson J.** Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med,* 2007; 43;4-15.
- un saturaterfattyacids and othervaluable phytochemicals. *Industrial corps and Products.*69 (2015)238-243.
- **UNESCO ; 1960** Recherche sur la zone aride XIII- Les plantes médicinales des régions arides, Pb Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la

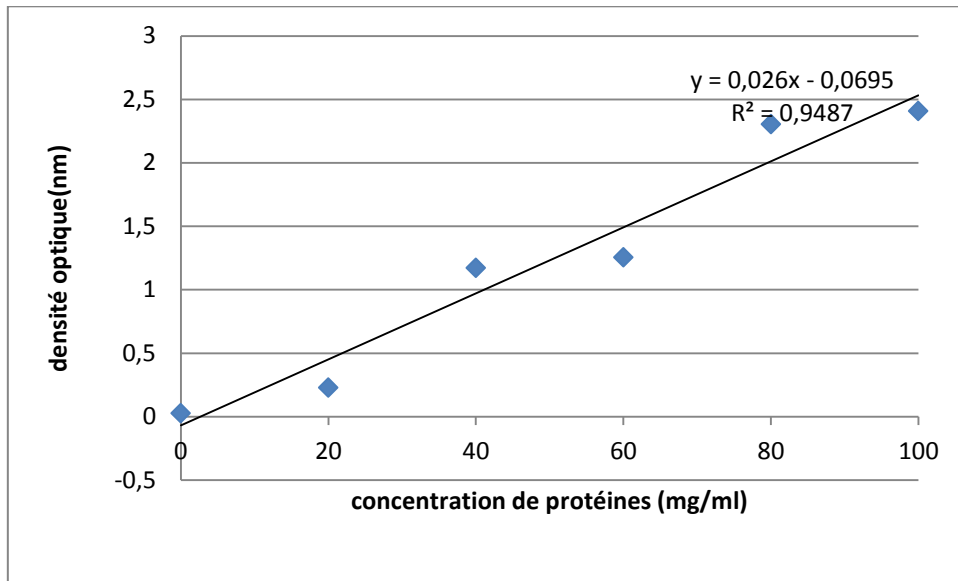
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- culture, place de Fontenoy, Paris -7e Imprimeries Oberthur, Rennes Unesco 1960 S.59/III.17/99p Vienne, 1995 in- Nanson.A, 2004.
- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MT., Mazur, M., Telser, J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Bio.* 39, 44-84.
 - **Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006).** "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40.
 - **ValkoM, RhodesCJ, MoncolJ, IzakovicM, MazurM (2006).**Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**:1–40.
 - **Wald E.(2009).** Le Grenadier (*Punicagranatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse. doc. Fac. Phar., Univ. Henri Poincaré-Nancy, 147 p.
 - **Wald, E. (2009).** Le grenadier (*Punica granatum L.*): plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse. doc. Fac. Phar., Univ. Henri Poincaré-Nancy, 147 p.
 - **Whanger, P.D. 1973.**Effects of dietary nickel on enzyme activities and mineral content in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*;25: 323-31
 - **Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV:** Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* (1991), 10(5):339-352.
 - **Xiel J., Funakoshi T., Shimada H. et Kojima S. (1995).** Effects of chelating agents on testicular toxicity exposure to nickel in mice caused by acute. *Toxicology*.103: 147-155.
 - **Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP, Zhao B.** Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;263(1):81–8.
 - **Zohary M, 1962.** Plant life of Palestine and Jorda 163, 3515-523, DOI; 10.1126/science. 136.515.523.

LES ANNEXES

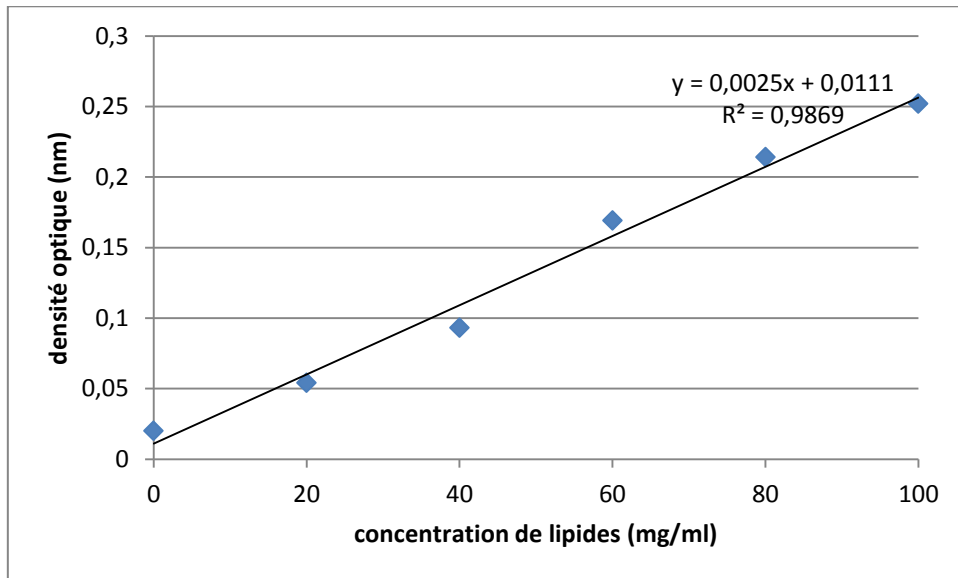
LES ANNEXES

Annexes 01



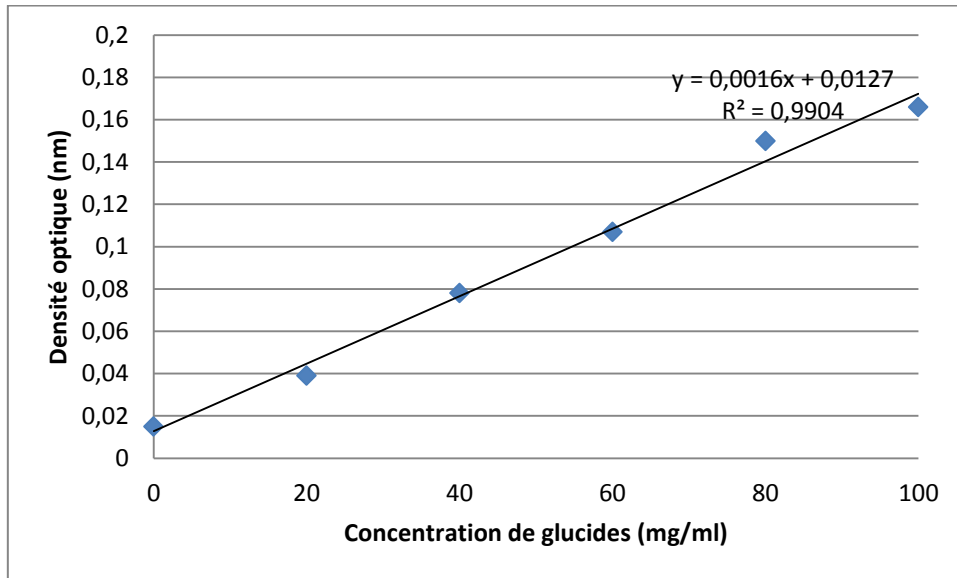
Annexe 01 : Courbe d'étalonnage du taux des protéines

Annexes 02



Annexe 02 : Courbe d'étalonnage du taux des lipides

Annexes 03



Annexe 03 : Courbe d'étalonnage du taux des glucides