



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : **Sciences de la nature et de la vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Option : **Pharmacologie-Toxicologie**

Thème:

Néphrotoxicité du nickel et l'effet protecteur de l'extrait d'une plante médicinale

Présenté par:

M^{elle} Insaf Difallah

&

M^{elle} Lidia Zerfaoui

Devant le jury :

M. Djabri Belgacem	Pr.	Université de Tébessa	Président
M. Gasmi Salim	MCB.	Université de Tébessa	Encadreur
Mm. Boussekine Samira	Pr.	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 23 Mai 2021

Résumé



RESUME

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet correcteur de l'extrait méthanolique obtenu à partir des feuilles de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis* contre la néphrotoxicité provoquée par le chlorure de nickel chez des rats de la souche Wistar Albinos. Pour cela, des expérimentations in vivo ont été effectués pendant 28 jours sur 20 rats males. Les rats ont été séparés en 4 groupes de 5 rats pour chaque un. Le premier groupe servant comme un témoin, non traités, le deuxième est traité (traitement orale) par le chlorure de nickel avec une dose de 10 mg/Kg/jours, le troisième est traité par l'extrait de la plante avec une dose de 100 mg/Kg/jour et le quatrième est traité par la combinaison de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* et le chlorure de nickel à une dose de 10 mg/Kg/jour pour chaque un.

Les résultats obtenus montrent que le NiCl₂ provoque une perturbation du métabolisme qui se traduit par une modification des paramètres métabolique confirmée par une augmentation de la concentration des protéines totales, et des paramètres enzymatique (tissu rénal) confirmée par une augmentation de la teneur en glutathion réduit (GSH) et en malondialdéhyde (MDA) ,une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) et une augmentation de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) (paramètres de stress oxydant).

Enfin, nous attendons que, l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* possède un effet protecteur antioxydant vis-à-vis la néphrotoxicité induite par le NiCl₂.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, Chlorure de nickel, néphrotoxicité, stress oxydant.

ABSTRACT

The objective of this work is to evaluate the corrective effect of the methanolic extract obtained from the leaves of the medicinal plant *Rosmarinus officinalis* against the nephrotoxicity caused by nickel chloride in rats of the Wistar Albinos strain. For this, in vivo experiments were carried out for 28 days on 20 male rats. The rats were separated into 4 groups of 5 rats each. The first group serving as a control, untreated, the second is treated (oral treatment) with nickel chloride with a dose of 10 mg / Kg / day, the third is treated with the plant extract with a dose of 100 mg / Kg / day and the fourth is treated with the combination of the extract of *Rosmarinus officinalis* and nickel chloride at a dose of 10 mg / Kg / day for each one.

The results obtained show that NiCl₂ causes a disturbance of the metabolism which results in a modification of the metabolic parameters confirmed by an increase in the concentration of total proteins, and of the enzymatic parameters (renal tissue) confirmed by an increase in the content of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), a decrease in the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) and an increase in the enzymatic activity of glutathione-S-transferase (GST) (oxidative stress parameters).

Finally, we expect that the methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* has an antioxidant protective effect against the nephrotoxicity induced by NiCl₂.

Key words: *Rosmarinus officinalis* , nickel chloride, nephrotoxicity , oxydative stress.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير التصحيحي للمستخلص الميثانولي المأخوذ من أوراق النبات الطبي اكليل الجبل ضد السمية الكلوية التي يسببها كلوريد النيكل في جرذان سلالة ويستار. لهذا تم اجراء تجارب في الجسم الحي لمدة 28 يوم على 20 فأر من الذكور. تم تقسيم الجرذان الى 4 مجموعات في كل مجموعة 5 جرذان. المجموعة الأولى جرذان شاهدة لم تعالج، المجموعة الثانية تعالج بمستخلص نباتي لنبته اكليل الجبل (العلاج عن طريق الفم) بجرعة 100ملغ/كلغ/يوم، الثالثة تعالج بكلوريد النيكل بجرعة 10ملغ/كلغ/يوم و الرابعة تعالج بمزيج مستخلص نبته اكليل الجبل و كلوريد النيكل بجرعة 10ملغ/كلغ/يوم لكل واحد.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن كلوريد النيكل يسبب اضطرابا في الأيض مما يؤدي الى تغيير في المعايير الأيضية مؤكدة بزيادة في تركيز البروتينات الكلية، و المعايير الانزيمية الخاصة بالنسيج الكلوي مؤكدة بزيادة في الغلوتاثيون المختزل (GSH) و (MDA) ، و انخفاض في النشاط الانزيمي للغلوتاثيون المؤكسد (GPx)، و زيادة في النشاط الانزيمي بالنسبة للغلوتاثيون الناقل (GST) (معايير الاجهاد التأكسدي).

أخيرًا ، نتوقع أن يكون للمستخلص الميثانولي لنبات اكليل الجبل تأثير وقائي مضاد للأكسدة ضد السمية الكلوية التي يسببها كلوريد النيكل.

الكلمات المفتاحية : اكليل الجبل، كلوريد النيكل، سمية الكلية، الاجهاد التأكسدي

Dédicace



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : mes enseignants **Dr GASMI SALIM** et **Mr SAKER HICHAM**

Mes très chers parents qui m'ont toujours donné leurs sentiments impressionnants, et qui n'ont jamais cessé de m'aimer. Mon héros **Difallah Mahmoud** et ma reine **Sifaoui Aïcha**

Mes chers aimés ; mes frères : **Zidane** et **Salah**.
Aux personnes les plus proches de mon cœur ; mes sœurs **Nadjoua**, **Sana**, **Imene** et surtout **Assia** qui m'as toujours encouragée.

Les petits adorables mes nièces et neveux.

Mes belles-sœurs et mes beaux-frères.

A ma belle-mère et mon beau père

A mon fiancé **Charaf**.

Toute ma famille. Mes amis.

Toutes mes collègues durant mes études.

Et enfin tous ceux qui m'aiment et qui j'aime.

Insaf

Dédicace

*Une dédicace particulière et sincère à nos enseignants **Dr GASMI***

SALIM** et **Mr SAKER HICHAM

Je Dédie ce modeste travail à celle qui a consacré sa vie et souffert pour veiller à mon bien être, à la source de ma réussite, Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction ..

*A ma chère et adorable mère "**GATTEL DALILA**" en témoignage de ma grande affection.*

*Et l'esprit mon cher père **AHMED**, pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites.*

*À mes frères **WALID** et **FARAH** et l'esprit mon cher frère **ROUDHOINE**.*

*A mes sœurs **HANA**, **LOUBNA** et surtout ma chère sœur **OULAYA** reconnaissance de leur affection toujours constante*

*À tous mes proches, mes amis, mes camarades de promotion surtout **OUMAIMA** et **AKILA**.*

À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la préparation de ce travail.

LYDIA

Remerciement



Remerciement

Nous remercions avant tout Allah tout puissant de nous avoir donné la force et la patience pour terminer ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur Dr Salim Gasmí qui nous a vraiment aidés durant la réalisation de ce mémoire ; nous exprimons à lui notre profond respect.

Nous exprimons également notre gratitude au notre co-encadreur M Hicham Saker, la personne qui nous a donné l'espoir, les conseils, le soutien et toute aide durant notre parcours.

A Mr Djabri Belgacem de nous avoir donné de son temps et accepté de nous honorer de sa présence et juger ce modeste travail.

Nous associons notre vif remerciement à M^{me} Samira Boussekine la chef Département de Sciences de la Nature et de la Vie ; ainsi qu'à tous ses travailleurs et cadres pour leur soutien.

Nous témoignons de la reconnaissance à tous nos enseignants aux qui nous n'avons pas trouvé les mots pour exprimer nos sentiments de respect. Merci.

Nous remercions profondément toute l'équipe du laboratoire de Biologie qui nous ont ouvert leurs portes et qui nous ont aidé par leurs information impressionnante.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce travail même avec les sentiments.

Sommaire



Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Dédicace

Remerciements

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 2

Partie I : Bibliographie

Chapitre I :Pharmacologie des plantes médicinales 3

I.Plantes medicinales 3

II.Utilisation et medecine traditionnelle 3

III.Description de la plante étudiée : *Rosmarinus officinalis* (romarin)..... 4

1.Generalites sur le romarin 4

2.Description botanique du plante 5

3.Description systematique du romarin 6

4.Aire geographique du romarin 6

5.Etude phytochimique du romarin 7

5.1.Principaux composés chimiques 7

5.1.1.Flavonoïdes : 7

5.1.2.Acides phénolique : 7

5.1.3.Acide rosmarinique 7

6. Propriétés pharmacologiques du romarin	8
Chapitre II : Toxicologie de nickel	10
I. Métaux lourds	10
1. Définition des métaux lourds	10
2. Risques des métaux lourds sur la santé :	10
II. Nickel	11
1. Définition du nickel	11
2. Propriétés du nickel	12
3. Utilisation du nickel	12
4. Effet du nickel	14
5. Toxicité du nickel	14
5.1. Toxicité aiguë	14
5.2. Toxicité chronique	14
Chapitre III : Stress oxydant	18
I. Définition du stress oxydant	18
1. Radicaux libres	18
1.1. Définition	18
2. Principales cibles biologiques des espèces oxygénées activées	19
2.1. Acide désoxyribonucléique	19
2.2. Protéine	20
2.3. Peroxydation des lipides	20
II. Défenses antioxydantes	20
1. Système antioxydant enzymatique	20
1.1. Superoxyde dismutase	20
1.2. Catalase	21
1.3. Glutathion peroxydase	21
1.4. Glutathion	21

Partie II : Pratique

I : Matériels et méthodes	23
1.Materiels.....	24
1.1.Objectif d'étude.....	23
1.2.Matériel végétal.....	23
1.3.Matériel biologique.....	23
2.Methodes.....	24
2.1.Méthode d'extraction.....	24
2.2.Traitement des rats.....	25
2.3.Sacrifices des rats et récupération des reins.....	26
2.4.Détermination des paramètres métaboliques et enzymatique.....	26
2.4.1.Préparation de l'homogénat.....	26
2.4.2.Dosage des protéines.....	26
2.4.3.Détermination des paramètres enzymatiques.....	27
2.4.3.1.Dosage de l'activité enzymatique du glutathion.....	27
2.4.3.2.Dosage de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase.....	28
2.4.3.3.Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion s-transférase.....	29
2.4.3.4.Dosage de catalase.....	30
2.4.3.5.Dosage du malondialdéhyde.....	30
II: Résultats et discussions	32
1.Resultats.....	32
1.1.Etude des biomarqueurs de croissance (taux des protéines).....	32
1.2 Etude des biomarqueurs de stress oxydatif.....	32
1.2.1.Glutathion réduit.....	33
1.2.2.Glutathion peroxydase.....	34
1.2.3.Glutathion- s- transférase.....	35
1.2.4.Catalase.....	35

1.2.5.Malondialdéhyde	36
2.Discussion	37
2.1.Discussion des paramètres de métabolisme.....	37
2.1.1.Effet de traitement sur la croissance.....	37
2.1.2.Effet de traitement sur les paramètres de stress oxydatif	37
2.1.2.1.Effet sur la glutathion réduit.....	37
2.1.2.2.Effet sur la glutathion peroxydase.....	38
2.1.2.3.Effet sur la glutathion- s- transférase	38
2.1.2.4.Effet sur la catalase.....	38
2.1.2.5.Effet sur le malondialdéhyde.....	39
Conclusion	41
Bibliographie	42
Annexe	48

*Liste des
tableaux*



Liste des tableaux

N°	Titre de Tableau	Page
01	Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle dans le monde	4
02	Classification de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	6
03	Propriétés physicochimique de nickel	12
04	Caractéristique de NiCl ₂	16-17
05	Evaluation de la concentration de protéines totale des rats dans les différents groupes expérimentaux.	32
06	Activités de la peroxydation lipidique et des enzymes antioxydantes dans les reins des rats testés et témoins	33

*Liste des
figures*



Liste des figures

N°	Titre de Figure	Page
01	Romarin, arbrisseau à feuillage persistant	5
02	Description de la plante de <i>Rosmarinus officinalis</i>	5
03	Fleurs et feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	6
04	Exemples des composés chimiques du <i>Rosmarinus</i>	7
05	Nickel du tableau périodique	10
06	Nickel en solution	11
07	Pièce de 1 euro contenant du nickel	13
08	Sources des radicaux libres	18
09	Principales espèces réactives dérivées d'oxygène (et de l'azote)	19
10	Aperçu des différentes espèces oxygénées activées et des antioxydants régulateurs de leur production	20
11	Localisation de la wilaya de Tebessa	23
12	Région d'El Hammamet	23
13	Conditions d'élevage des souches des rats wistar albomin	24
14	Etapes de la macération	25
15	Etapes d'extraction solide liquide	25
16	Sacrifice de rats	26
17	Dissection et prélèvement des reins	26
18	Variation de la concentration de protéines totales chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	32
19	Variation de l'activité de la glutathion réduct rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	34
20	Variation de l'activité de la glutathion peroxydase rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	34
21	Variation de l'activité de la glutathion- s- transférane rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	35
22	Variation de l'activité du catalase rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	36
23	Variation de l'activité de malondialdéhyde rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.	36

*Liste des
abréviations*



Liste des abréviations

%	Pourcentage
A	Alpha
μ	Micro
μg	Microgramme
Adn	Acide désoxyribonucléique
Bbc	Bleu de coomassie
Bht	Butyle hydroxytoluène
Bsa	Albumine de sérum bovin
°c	Degré celsius
Cat	Catalase
Cdnb	1-chloro2,4-dinitrobenzène
Cee	Communauté économique européenne
Circ	Centre international de recherche sur le cancer
Cm³	Centimètre cube
Co	Monoxyde de carbone
Cr	Chrome
DI50	Dose létale 50
Dtnb	Réactif d'ellman (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acide)
Edta	Acide éthylène diamine tetra acétique
Eoa	Espèces oxygénées activées
Era	Espèces réactives d'azote
Ero	Espèces réactives d'oxygène
Etc.	Et cetera
E	Extrait
°f	Degré fahrenheit
G	Gramme
Gpx	Glutathion peroxydase
Gsh	Glutathion réduit
Gssg	Disulfure de glutathion (glutathion oxydé)
Gst	Glutathion s-transférase
HCl	L'acide chlorhydrique
H₂O	Monoxyde de dihydrogène
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
Insv	Institut national du sommeil et de la vigilance
J	Jour
K	Kelvin
Kg	Kilogramme
L	Litre
m³	Mètres cubes
Mda	Malondialdehyde
Mg	Milligrammes
Mix	Mixture
ml	Millilitre
Mol	Mole

Mt	Médecine traditionnelle
NaCl	Chlorure de sodium
Na²hpo₄	Hydrogénophosphate de sodium
Nh₂	Radical amino
Ni	Nickel
Ni₂⁺	Nickel cation
Nicl₂	Chlorure de nickel
O₂●	Anion super-oxyde
¹O₂	Oxygène singulet
Oh	Hydroxyde
Oms	Organisation mondiale de la santé
Pge₂	Prostaglandine e ₂
Ph	Potentiel hydrogène
Rfd	Dose de référence
<i>Rosmarinus</i>	Romarin officinal
Sh	Thiol
SOD	Superoxyde dismutase
SSA	Acide sulfosalicylique
T	Témoin
Tbs	Tampon tris-salin
Tca	L'acide tri chloro-acétique
Tris-HCl	Tris hydrochloride

Introduction



Introduction

Les métaux lourds sont, sous différentes formes, présents au sein de l'environnement. A l'état de traces, ils sont nécessaires aux êtres vivants, mais à concentration élevée, en revanche, ils présentent une toxicité plus ou moins forte. (Aranguren & al, 2008). Ils sont notamment utilisés dans de nombreux matériaux quotidiens, purs ou sous forme d'alliage. On peut ainsi les employer dans les aciers inoxydables, les matériaux du bâtiment, les munitions, les matériaux médicaux, la bijouterie... (Guillou & al, 2008-2009)

Parmi les métaux lourds qui est largement utilisés « le nickel ».Le nickel (Ni) est un métal blanc, brillant et dur, présent en faible quantité dans la croûte terrestre, surtout sous forme de minerais sulfurés, oxydés et silicatés. Il est couramment utilisé pour fabriquer des alliages de métaux solides et durables (aluminium, cuivre et fer). Il est retrouvé dans de nombreux objets courants comme les casseroles inoxydables, les pièces de monnaie, les piles rechargeables, les batteries nickel-cadmium. (INERIS, 2002)

Plusieurs études classe le nickel comme cancérogène possible, aussi le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés au nickel. Il se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre du rapport entre les radicaux libres et les systèmes de défense antioxydants dont dispose la cellule, avec comme conséquence l'apparition des dégâts souvent irréversible pour la cellule. (UCE, 2018)

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales comme le romarin (*Rosmarinus officinalis*) considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités à la fois antioxydants et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

Ainsi, Le présent travail s'intéresse à l'étude de l'effet protecteur d'une plante médicinale (*Rosmarinus officinalis*), vis-à-vis la néphrotoxicité induite par le nickel chez les rats de la souche Wistar Albinos.

1^{ère} Partie :
Synthèse
bibliographique



Chapitre I :
Pharmacologie des
plantes médicinales



CHAPITRE I : Pharmacologie des plantes médicinales

I. PLANTES MEDICINALES

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Elles sont utilisées depuis au moins 7.000 ans par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie (**Jean-Yves, 2010**).

La phytothérapie repose en partie sur une pratique traditionnelle basée sur l'utilisation ancienne et locale des plantes. Les plantes médicinales contiennent de nombreux principes actifs (plus de 250) qui ont des activités thérapeutiques (**INSV, 2015-2016**).

Depuis plusieurs années, divers produits de phytothérapie ont été mis sur le marché, et sous divers produits: comprimés, gélules (sous forme solide), liquides sous forme d'ampoules ou de flacons, etc (**INSV, 2015-2016**).

Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents (**Jean-Yves, 2010**).

II. UTILISATION ET MEDECINE TRADITIONNELLE

Selon l'OMS : « La médecine traditionnelle est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales ». En réalité, la médecine traditionnelle est un concept qui déborde largement le champ de la santé pour se placer au plus vaste niveau socioculturel, religieux, politique et économique. Dans les pays développés où la médecine traditionnelle n'a pas été incorporée au système de santé national, la médecine traditionnelle est souvent appelée médecine « complémentaire », « alternative » ou « non conventionnelle » (**OMS, 2014**).

Actuellement, selon les estimations de l'OMS, plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires (**OMS, 2014**).

Tableau 01 : importance de l'utilisation de la MT dans le monde (OMS, 2014)

Pays	Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle
Afrique	Utilisée par 80% de la population locale pour les soins primaires
Australie	Utilisés par 49% des adultes
Chine	Compètement intégrée dans les systèmes de santé. 95% des hopitaux ont des unités de médecine traditionnelle
Inde	Largement utilisée. 2860 hopitaux ont des unités de médecine traditionnelle
Japon	72% des médecins reconnaissent la médecine traditionnelle
Vietnam	Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 30% de la population se soignent par la médecine traditionnelle
Pays occidentaux	La médecine traditionnelle n'est pas intégrée dans les systèmes de soin moderne. France :75% de la population ont recours à la médecine traditionnelle. Etas-Unis : de 29à 42% de la population utilisent la médecine complémentaire.

III. DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIEE : *Rosmarinus officinalis* (Romarin)

1. GENERALITES SUR LE ROMARIN

Bien connu des anciens, notamment des Grecs et des Romains. Ces derniers en faisaient des couronnes d'où le nom arabe ikkil al-jabal (couronnes de montagne) traduit du latin (Naouaoui & al, 2019). Le romarin ou romarin officinal (*Rosmarinus officinalis*) est un arbrisseau appartenant à la famille des Lamiacées. Ses feuilles persistantes sont plus longues que larges, d'un vert sombre sur le dessus et blanchâtres en dessous. Ses fleurs varient du bleu pâle au violet. Il peut atteindre jusqu'à 1,50 m de hauteur. C'est peut-être l'une des plantes aromatiques les plus présentes dans les jardins des Français. (Marion & al, 2017).

D'autres hypothèses peuvent être à l'origine du nom « romarin ». Il pourrait venir du grec « rhops myrinos » (buisson aromatique). Son odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens d'où il tire son nom provençal « encensier » (Marion & al, 2017).



Figure 01 : Le romarin, arbrisseau à feuillage persistant

2. DESCRIPTION BOTANIQUE DU PLANTE

Le romarin peut atteindre 2 m de hauteur, en culture. On le trouve toute l'année, érigé au milieu des buissons méditerranéens : ses feuilles persistantes sont enroulées sur leurs bords. Elles sont beaucoup plus longues que larges, d'une couleur vert sombre, luisant sur leur face supérieure et à la teinte blanchâtre sur le dessous. Ses fleurs, le plus souvent d'une teinte bleu violacé (les blanches sont plus rares) s'agrègent en grappes courtes, de février à mai. (Martinat, 2018).

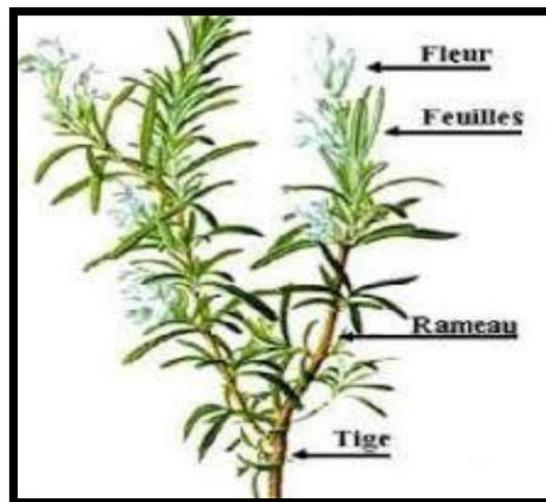


Figure 02 : Description de la plante de *Rosmarinus officinalis*

Le romarin se cultive dans un endroit ensoleillé, de préférence dans un sol calcaire. Cette plante apprécie les climats chauds mais supporte assez bien les gelées. Il est conseillé de tailler légèrement le romarin au printemps pour lui donner la forme désirée. Sa germination étant lente, il est préférable de le bouturer ou de le marcotter au printemps. Les premières sont récoltées à la floraison puis séchées. Les feuilles persistantes, peuvent se récolter en toute saison (Marion & al, 2017).

Il est caractérisé par de petites feuilles vertes foncées sur le dessus et vertes blanchâtres sur la face inférieure en forme d'aiguilles et à bords repliés. Les fleurs à corolle de couleur bleue claire ou lilas pâle sont disposées à l'aisselle des feuilles et forment des inflorescences en grappe courte, des tiges ligneuses subarrondies à écorce brun foncé (Fadi & al, 2011).



Figure 03 : Fleurs et feuilles de *Rosmarinus officinalis* (Marion & al, 2017)

3. DESCRIPTION SYSTEMATIQUE DU ROMARIN

La classification de la plante *Rosmarinus officinalis* est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Classification de la plante *Rosmarinus officinalis* (Youcef & al, 2018)

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales (labiales)
Famille	Lamiaceae
Genre	Rosmarinus
Espèce	Rosmarinus officinalis

4. AIRE GEOGRAPHIQUE DU ROMARIN

Les plus grandes cultures de romarin se trouvent en Espagne, en Tunisie, au Maroc, en Italie, en France, en Algérie et au Portugal, principalement pour en extraire de l'huile essentielle. Se développe bien dans les zones côtières, dans les endroits exposés aux vents salés ou à la sécheresse. La floraison commence dès le mois de février, parfois en janvier, et

se poursuit jusqu'en avril-mai. Certaines variétés peuvent fleurir une deuxième fois en début d'automne (Marion & al, 2017).

5. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DU ROMARIN

Dans la feuille, les composés chimiques retrouvés sont, par famille :

- acides phénols ou dérivés caféiques : acides caféique, chlorogénique et rosmarinique. L'acide rosmarinique est un ester de l'acide caféique et de l'acide α -hydroxy-dihydro caféique - flavonoïdes : hétérosides du lutéolol, du diosmétol, et flavones méthoxylées
- diterpènes tricycliques : acide carnosique et carnosol principalement
- triterpènes : acides ursolique et oléanique, et amyrine
- huile essentielle (Clementine & al, 2018).

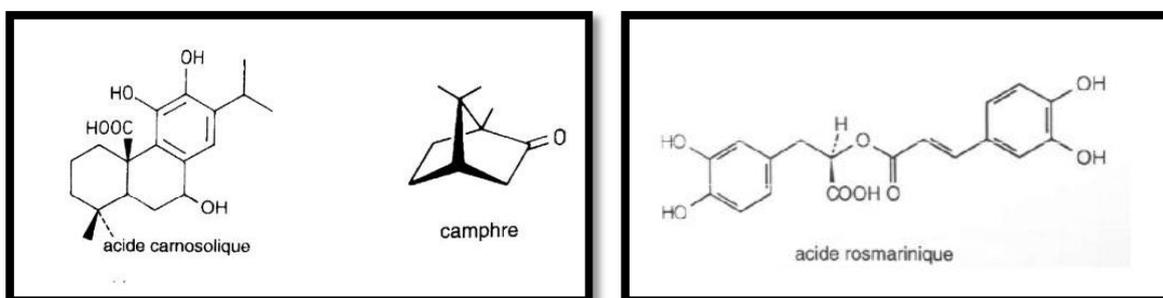


Figure 04 : Exemples des composés chimiques du *Rosmarinus* (Clementine & al, 2018)

5.1. Les principaux composés chimiques

5.1.1. Les flavonoïdes : Ce sont les pigments permettant aux végétaux d'être colorés, les protégeant ainsi des rayonnements ultra-violet. Les différents flavonoïdes présentent tout un éventail de propriétés: modulateurs enzymatiques, anti-inflammatoires, antispasmodiques, hépatoprotecteurs, hypotenseurs, antimicrobiens, ou encore antioxydants (Clementine & al, 2018).

5.1.2. Acides phénolique : Ils sont retrouvés le plus souvent dans les tissus épidermiques des plantes et jouent un rôle de défense. Les phénols sont souvent de très bons antimicrobiens, fréquemment présents dans les huiles essentielles. Ils sont également capables de piéger les radicaux libres et sont donc d'excellents antioxydants (Clementine & al, 2018).

5.1.3. L'acide rosmarinique : est un polyphénol, dérivé de l'acide hydroxycinnamique, un des principaux composés actifs du romarin. Cette molécule a été étudiée notamment pour ses effets antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires et antiviraux (Mandja-Adédé & al, 2016).

L'acide rosmarinique est très bien absorbé par voie orale, et, est retrouvé majoritairement sous forme conjuguée dans le sang. Cependant, plus la concentration en acide rosmarinique est élevée lors de l'administration, plus sa forme intacte est importante par rapport à la forme conjuguée (**Clementine & al, 2018**).

- **Parties utilisées**

Ce sont les feuilles, les sommités fleuries, que l'on aura pris le soin de sécher, ou l'huile essentielle qui sont utilisées en phytothérapie (**Martinat, 2018**).

- **Principes actifs**

L'extrait de romarin est un antioxydant naturel issu des feuilles de romarin. Il contient plusieurs composés aux propriétés antioxydantes qui appartiennent à la classe des acides phénoliques, des flavonoïdes, des diterpénoïdes et des terpènes. L'extrait de romarin protège les matières grasses de l'oxydation (**Imen Kahouli, 2010**).

6. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUE DU ROMARIN

Le romarin stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire. Il est indiqué à ce titre dans l'insuffisance hépatique et en cas d'inflammation chronique de la vésicule. Il agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent, en calmant les spasmes d'origine digestive par son action spasmolytique sur les intestins et l'estomac. Par son effet relaxant sur les muscles lisses du système respiratoire. Il calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique (**Marion & al, 2017**).

Des tests in vitro ont confirmé que l'extrait de romarin et deux de ses composés, l'acide carnosique et l'acide rosmarinique ont des effets antitumoraux par différents mécanismes tels que l'induction de l'apoptose (auto-destruction cellulaire), la diminution de la viabilité cellulaire, la diminution de la prolifération cellulaire, etc (**Martinat, 2018**).

Il stimule les glandes corticosurrénales. Elles produisent une hormone de défense en réponse à un stress, un choc, à une agression par des agents infectieux. Plus globalement, on lui attribue des effets antiseptiques, antalgiques, antirhumatismaux, sudorifiques, diurétiques (réduction des risques de calculs rénaux ou de goutte et prévient les rhumatismes). Enfin, il peut aussi être utilisé dans les affections hépatiques et biliaires (**Baumann & al, 2019**).

L'acide rosmarinique, polyphénol hydrosoluble, permet de réduire significativement la production d'acide nitrique et de PGE2 dans des chondrocytes, il possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (**Clementine & al, 2018**).

CHAPITRE I : PHARMACOLOGIE DES PLANTES MEDICINALES

Des recherches ont montré que l'efficacité antioxydante des extraits de romarin in vitro, en raison de leur capacité à agir en tant qu'agents réducteurs et piègeurs de radicaux libres, en tant qu'inhibiteurs de la formation de d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Marion & al, 2017).

Chapitre II :
Toxicologie du
nickel



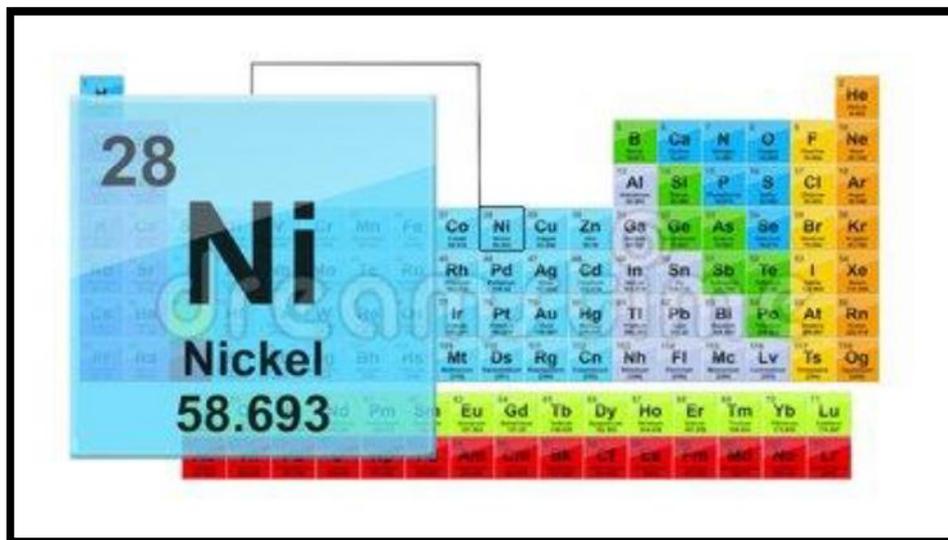
CHAPITRE II : Toxicologie du nickel

I. RAPPEL SUR LES METAUX LOURDS

1. Définition des métaux lourds

Un métal est une matière, issue le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, dotée d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant ainsi aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisables dans l'industrie, l'orfèvrerie... (Gérard & al, 2001)

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm³. (Gérard & al, 2001)



28	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Nickel									
58.693									

Figure 05 :Nickel du tableau périodique 28 (Dabsxl)

2. Les risques des métaux lourds sur la santé :

Depuis plusieurs années, les métaux lourds sont utilisés de manière exponentielle dans l'industrialisation, ce qui provoque une exposition élevée de la population et par conséquent augmente la prévalence d'effets néfastes sur la santé. (Lorena & al, 2019)

L'exposition de la population aux métaux lourds se fait par la consommation d'aliments contaminés mais également par l'eau et/ou l'air. Le corps humain n'est pas capable de dégrader ces éléments, ce qui peut mener à une intoxication. Certains métaux sont essentiels au corps humain, tandis que d'autres, comme le nickel, ne sont pas indispensables et peuvent provoquer des fortes toxicités, même à faible dose. Tandis qu'une exposition continue aux métaux lourds provoque une bioaccumulation dans divers organes (cœur, reins,

foie et cerveau). Ils interagissent avec des éléments du corps, tels que l'oxygène et les chlorures et provoquent la création de radicaux libres, donc un déséquilibre. Le stress oxydatif endommage finalement les protéines et l'ADN. Les métaux lourds peuvent perturber le fonctionnement des organes, l'activité de certaines enzymes et hormones essentielles et provoquer, à long terme, des troubles cardiovasculaires, des altérations neuronales et rénales, du diabète et augmenter le risque de cancer. (Lorena & al, 2019)

Une exposition à des fortes doses de métaux lourds est donc impliquée dans de nombreuses pathologies sévères comme l'insuffisance rénale. (Lorena & al, 2019)

II. Nickel

1. Définition

Le nickel est un métal de transition (ferromagnétique qui fait partie du groupe des métaux non-ferreux) dur, ductile et blanc argenté. Il réagit avec les acides mais pas avec les bases, c'est le 28^{ème} élément du tableau périodique. (Kaci & al, 2017)

Il peut exister dans plusieurs états d'oxydation (de +2 à +4), néanmoins, l'état d'oxydation +2 (Ni^{2+}) qui donne d'une manière générale des composés de couleur verte est le plus répandu dans l'environnement et les systèmes biologiques. (Kaci & al, 2017)

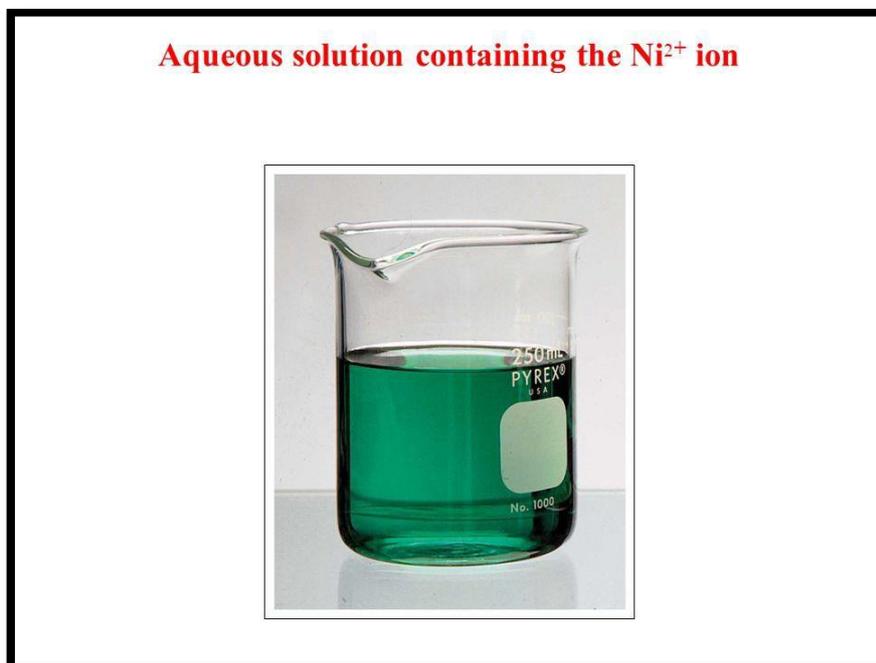


Figure 06 : Le nickel (Ni^{2+}) en solution (Cocker & al, 2016)

2. Propriétés du nickel

Tableau 03 : Propriétés physicochimique du nickel (Facility, 2014)

Symbole	Ni
Numéro atomique	28
Électrons par niveau d'énergie	2, 8, 16, 2
Masse atomique	58,69 u
Isotopes les plus stables	⁵⁸ Ni avec une durée de vie de plus de 4×10^{19} ans (68,077 %) ⁶⁰ Ni stable avec 32 neutrons (26,10 %) ⁶¹ Ni stable avec 33 neutrons (1,13 %) ⁶² Ni stable avec 34 neutrons (3,59 %) ⁶⁴ Ni stable avec 36 neutrons (0,91 %)
Série	métaux de transition
Groupe	10
Période	4
Bloc	D
Densité	8,9 g/cm ³
Point de fusion	1455 °C, 2651°F, 1728K
Point d'ébullition	2913 °C, 5275°F, 3186K

3. Utilisation du nickel

Le nickel n'est que très rarement utilisé pur. Cependant, il est présent dans de nombreux produits du quotidien sous forme d'alliages, c'est-à-dire de mélanges de métaux. On peut par exemple citer « l'inox », ou « acier inoxydable », qui est un alliage composé d'acier, de chrome et de nickel notamment. L'inox trouve son utilité dans le matériel médical,

les équipements ménagers (on parle souvent de couverts en inox par exemple) ou dans les outils de production. On en retrouve également dans les bâtiments ou dans les carrosseries de voitures, trains ou avions. Le nickel sert alors de revêtement électrolytique ou chimique : il permet de protéger les autres métaux (comme les aciers par exemple) contre la corrosion. (Yann, 2017)

Il est possible de retrouver du nickel, toujours sous forme d'alliage (parfois appelés « superalliages base nickel »), dans le domaine de l'électronique. En effet, certaines batteries rechargeables comme celles de nos téléphones ou de nos ordinateurs portables utilisent du nickel. Ces batteries contiennent le plus souvent des poudres de nickel, qui permettent également de réaliser des accumulateurs alcalins ou des piles à combustible. (Yann, 2017)

Le nickel est aussi présent dans certaines pièces de monnaie, comme les pièces de 1 et 2 euros notamment. Aux États-Unis, le terme de « nickel » désigne même une pièce de 5 centimes. (Yann, 2017)

Le nickel représente un bon exemple de métal dont l'utilisation s'étend dans les technologies modernes. En raison de la consommation accélérée de produits contenant du nickel, des composés de nickel sont libérés dans l'environnement à tous les stades de la production et de l'utilisation. (E, Salnikow K, & al, 2002)

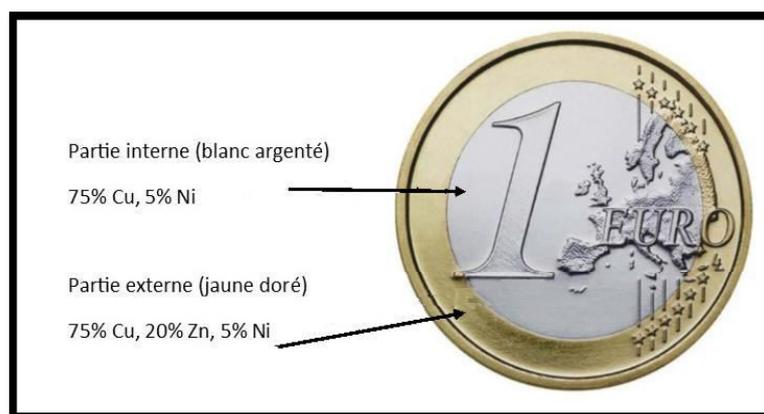


Figure 07: Pièce de 1 euro contenant du nickel (UTINAM)

4. L'effet du nickel

La dose de référence (RfD) pour le nickel (sels solubles) est de 0,02 milligramme par kilogramme de poids corporel par jour (mg / kg / j) basé sur la diminution du poids corporel et des organes chez le rat.

Leur accumulation dans l'environnement peut représenter un grave danger pour la santé humaine. Parmi les effets connus du nickel sur la santé figurent les allergies cutanées, la fibrose pulmonaire, l'empoisonnement des reins et du système cardiovasculaire à des degrés variables et la stimulation de la transformation néoplasique. Le mécanisme de ce dernier effet n'est pas connu et fait l'objet d'une étude détaillée. Cette étude fournit une analyse de l'état actuel de la situation dans ce domaine. (E, Salnikow K, & al, 2002)

5. Toxicité du nickel

5.1. Toxicité aiguë

- **Chez l'animal**

Par ingestion : faible toxicité orale du Ni et oxydes mais les dérivés solubles :

- ❖ Syndrome dysentérique
- ❖ Atteinte tubulaire rénale
- ❖ Hypothermie convulsions
- ❖ Légère irritation cutanée

- **Chez l'homme**

20 travailleurs (ingestion de sulfate de nickel dans l'eau : 0,5 à 2,5 g de nickel)

- ❖ Nausées, vomissements
- ❖ Diarrhées
- ❖ Céphalées
- ❖ Sensations vertigineuses
- ❖ Gêne respiratoire, toux

Cèdent rapidement ou persistent quelques jours

23 patients après contamination accidentelle d'un bain de dialyse : idem

5.2. Toxicité chronique

- **Effets respiratoires** : largement étudiés :

Irritant :

- ❖ Rhinite
- ❖ Ulcération de la cloison nasale

- ❖ Anosmie
- ❖ Sinusite
- ❖ Allergies

Cas d'asthmes ± rhinites ± urticaires : rôle du Ni (nickelage électrolytique mais Cr, Co)

- ❖ Bronchite chronique
- ❖ Pneumoconioses
- **Effets cutanés**
 - ❖ Irritants (certains sels) surtout les composés solubles (Chlorure et sulfate de Nickel)
 - ❖ Dermatoses allergiques
 - ❖ Eczéma de contact (fréquent)
 - ❖ Rarement une urticaire
- **Toxicité rénale**
 - ❖ Atteinte rénale tubulaire : Nickelurie > 100 µg/L
- **Effets Cancérogènes**
 - ❖ Observations d'une augmentation de cancer broncho-pulmonaires, de cavité nasales, de sinus et de néphron etc
- **Reproduction :**
 - Chez l'animal
 - ❖ Nécrose des tubes séminifères chez le rat au sulfate de nickel
 - ❖ Tératogènes
 - Chez la souris :
 - ❖ Anencéphalie, exencéphalie
 - ❖ Fente palatine
 - ❖ Autres malformations squelettiques (**Bensefa & al, 2017_2018**)

Tableau 04 : Caractéristique de NiCl₂ (CEE, 1994)

Information sur les composants	<p>Nom chimique: Nickel(II) chlorure à 6 H₂O</p> <p>Synonymes : nickel chlorure hexahydrate</p> <p>Masse moléculaire: 237.66g/mol</p> <p>Formule brute: NiCl₂, 6H₂O</p>
Identification des dangers	<p>Toxique en cas d'ingestion.</p> <p>Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.</p>
Stockage	<p>bien fermé à l'abri de l'humidité dans un endroit bien ventilé accès réserve aux spécialistes à température ambiante (+15 à +25°C)</p>
Contrôle de l'exposition/protection individuelle	<p>Composés du nickel (aérosol respirable) : 0.05 mg/m³ en Ni dans la poussière totale</p> <p>Equipement de protection individuelle:</p> <p>Protection respiratoire: nécessaire en cas de formation de poussières.</p> <p>Protection des mains: nécessaire</p> <p>Protection des yeux: nécessaire</p> <p>Mesures d'hygiène industrielle: Enlever immédiatement tout vêtement souillé. Protection préventive de la peau. Se laver les mains et le visage après le travail.</p>
Propriétés physiques et chimiques	<p>Aspect: cristaux verts</p> <p>Couleur: vert</p> <p>Pureté minimum : 98%</p> <p>pH:100 g/l eau (20°C) environ 4.9 (°C)</p> <p>Température de fusion: 140°C (perte d'eau de cristallisation)</p> <p>Densité: environ 1,92 g/cm³</p> <p>Solubilité dans l'eau : 2540 g/l 5990 (20°C)</p>
Stabilité et réactivité	<p>Matières à éviter: acides forts.</p>
Informations toxicologiques	<p>Peut provoquer le cancer par inhalation. Susceptible d'induire des anomalies génétiques. Peut nuire au fœtus.</p> <p>Toxicité aigüe: DL50 (voie orale, rat) = 105 mg/kg</p> <p>Concerne les composés solubles du nickel en général :</p> <p>Le nickel inorganique exerce une action astringente sur les muqueuses. Des sensibilisations accompagnées de manifestations</p>

CHAPITRE II : TOXICOLOGIE DU NICKEL

	<p>allergiques peuvent survenir chez les personnes sensibles.</p> <p>Parfois apparition d'une dermatite du nickel.</p> <p>En fonction de leur solubilité dans l'eau, le nickel et ses composés présentent un effet plus ou moins cancérigène en cas d'inhalation, les composés du nickel facilement solubles ayant apparemment un effet plus faible.</p>
Considérations relatives à l'élimination	<p>Elimination selon les réglementations officielles de CEE en vigueur.</p>
Informations réglementaires	<p>Etiquetage selon les Directives CEE</p> <p>Symbole(s): T</p> <p>Type de danger(s) : Toxique</p> <p>Phrase(s)-R: 25-43 Toxique en cas d'ingestion. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.</p> <p>Phrase(s)-S: 24-37-45 Eviter le contact avec la peau. Porter des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette).</p>
Absorption	<p>L'absorption digestive du nickel est directement corrélée à la solubilité des composés, les plus solubles étant les mieux absorbés.</p> <p>Chez le rat, le pourcentage de nickel absorbé après gavage unique (10 mg de nickel en solution saline) est de 9,8% pour le chlorure de nickel, 80 à 90% des quantités de Ni récupérées dans les organes examinés ont été détectés dans les reins.</p>

Chapitre III :
Stress oxydant



I. Le stress oxydant

Le stress oxydant correspond à l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERA), résultant d'un déséquilibre entre la production excessive de ces espèces et la capacité des systèmes de défense antioxydants. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme (**Koechlin & al, 2006 ; 2001**).

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription (**Hare & al, 2004**).

1. Les radicaux libres

1.1. Définition

Un radical libre est un composé possédant un électron célibataire. Dans une molécule les doublets électroniques sont localisés dans des orbitales liantes, non liantes ou anti-liantes. L'orbitale d'un électron célibataire peut, de même, être liante, non liante ou anti liante, et ceci a des conséquences sur les propriétés chimiques et structurales du radical libre. Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte. (**Bouguerne, 2012**)

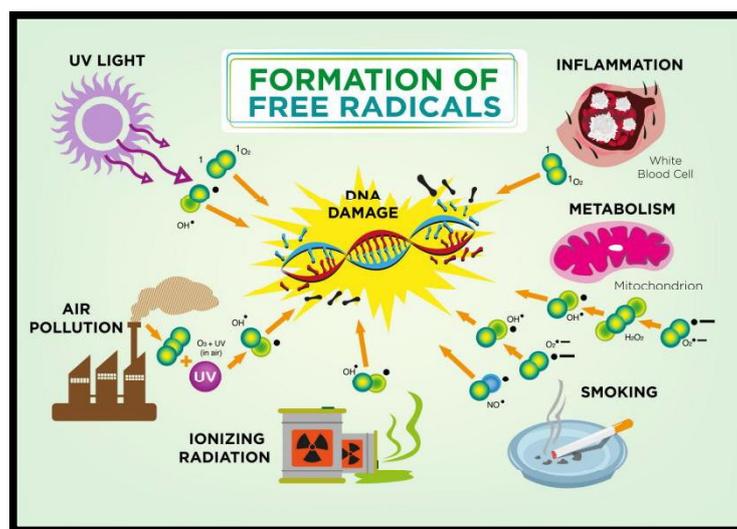


Figure 08 : Sources des radicaux libres (**Bayr, Hülya. 2005**).

Il existe deux grands groupes d'espèces réactives dérivées d'oxygène, utilisés dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires.

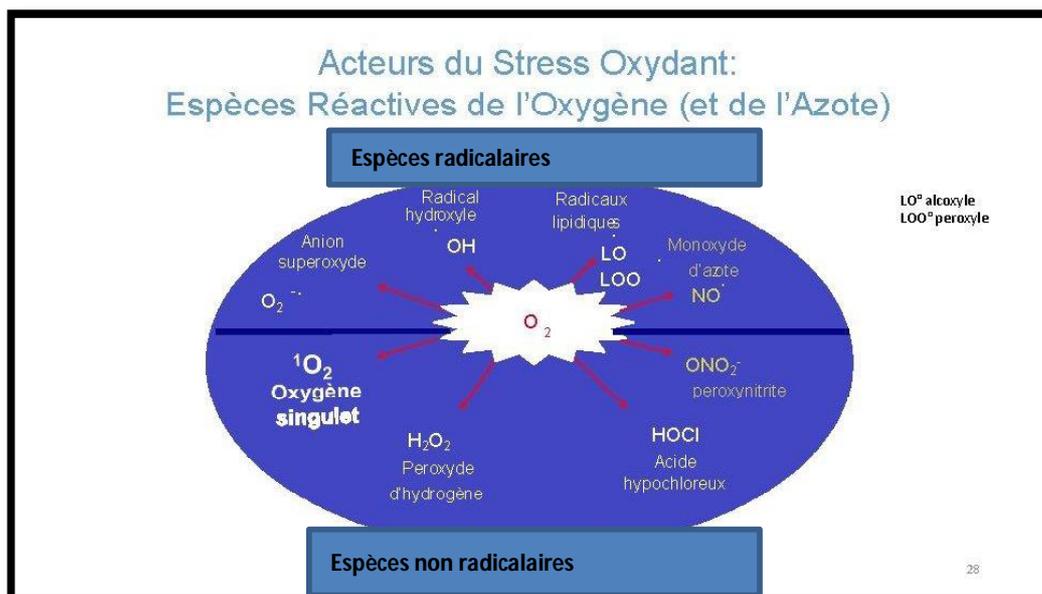


Figure 09 : Les principales espèces réactives dérivées d'oxygène (et de l'azote) (Lilya & al, 2014)

2. Principales cibles biologique des EOA

2.1. L'acide désoxyribonucléique ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\bullet\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguano-sine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Atkin & al, 2005).

2.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi tyrosine intra et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire. (Atkin & al., 2005).

2.3. Peroxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique (Halliwell, 1989).

II. Les défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion, catalase) (Hare, 2004).

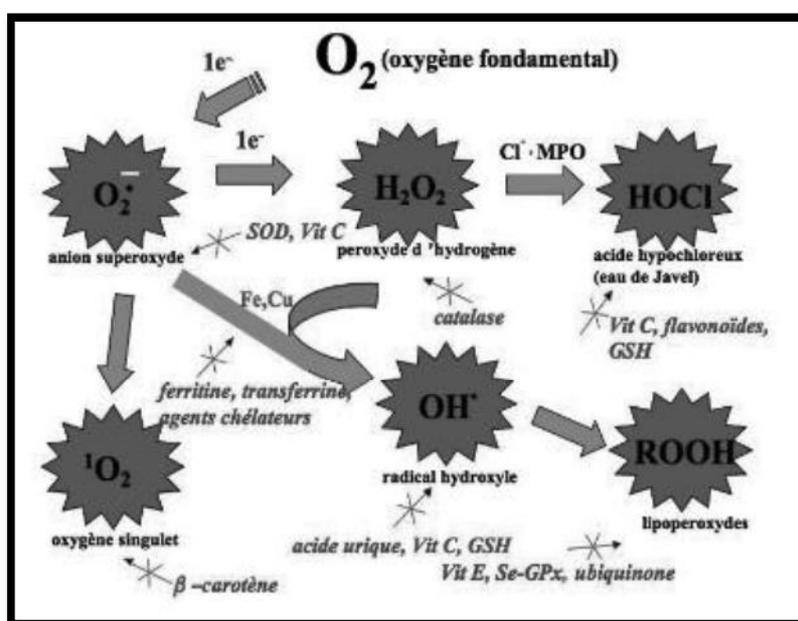
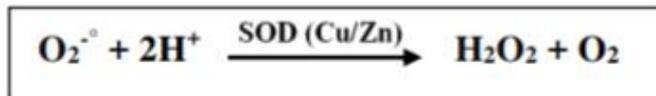


Figure 10 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production (Hare, 2004).

1. Système antioxydant enzymatique

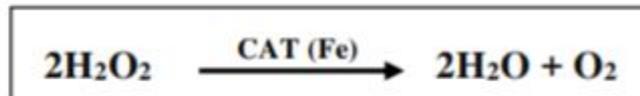
1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La Superoxyde dismutase est une enzyme métalloprotéine classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu-et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante "anti- $O_2^{\bullet-}$ " la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle permet par une réaction de dismutation de catalyser l'anion super-oxyde ($O_2^{\bullet-}$) en oxygène et en eau oxygénée. (Bouguerne, 2012)



1.2. Catalase (CAT)

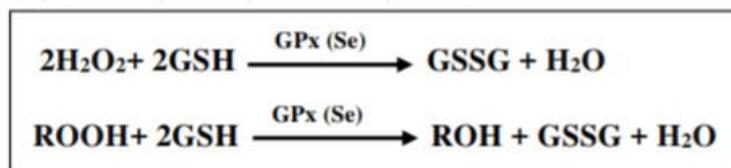
La catalase est une enzyme intracellulaire, synthétisée au niveau des globules rouges et du foie, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ qui est généralement produit par la SOD.



1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

La Glutathion peroxydase c'est une enzyme localisée dans la mitochondrie et dans le cytosol. Elle permet de réduire les hydro peroxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène.

L'enzyme possède une grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition, il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG). La GPx est donc en compétition avec la catalase pour le substrat H₂O₂ (Favier., 2003 ;Valko et al.,2006-2007).



1.4. Glutathion (GSH)

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (Bouguerne ,2012) .Le glutathion réduit est un tri peptide caractérisé par la présence d'un groupement sulfidryle, ce dernier est responsable de la réduction des radicaux libres selon la réaction suivante :



Le glutathion peut également réagir avec les ions Fe³⁺ et Cu²⁺ et ainsi limiter leur participation à la génération des radicaux libres par la réaction de Fenton (Valko & al ,2007)



2^{ème} Partie :
Partie
expérimentale



Chapitre IV :
Matériels et
méthodes



CHAPITRE IV : Matériels et méthodes**I. Matériels et méthodes****1. MATERIEL****1.1. Objectif de l'étude**

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche à l'université Larbi Tébessi-Tébessa, (2020 /2021) et au cours de cette étude, nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur d'extrait de la plante *Rosmarinus* sur la toxicité rénale induite par le nickel chlorure .

1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est représenté par les feuilles de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis* dans la région d'El-Hammamet, c'est une commune de la wilaya de Tébessa Nord-est algérien. Les feuilles fraîchement récoltés, séchés pendant 15 jours puis conservés jusqu'à l'extraction.

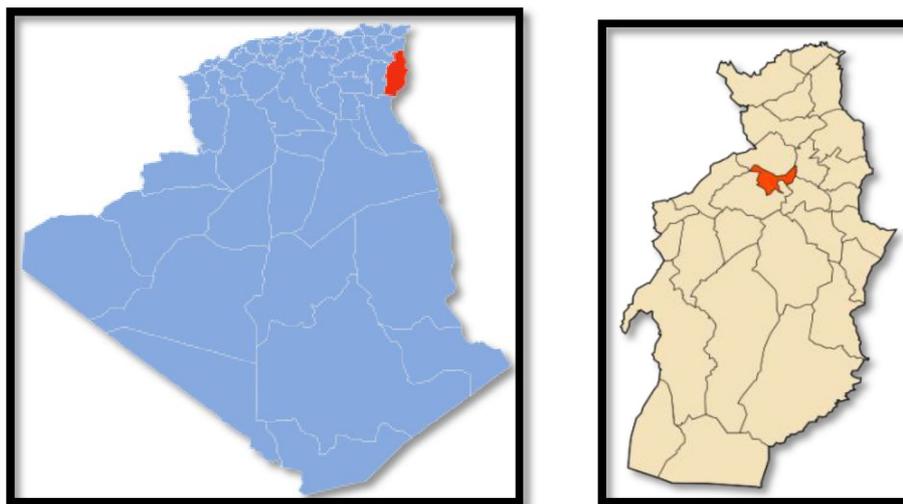


Figure 11 : Localisation de la wilaya de Tébessa **Figure12 :** la région d'El Hammamet

1.3. Matériel biologique

Il s'agit des souches de rats *Wistar* Albinos de sexe mâle, et dont le poids se situe entre 200±250 g, ils ont été fournis de l'institut Pasteur (centre d'élevage d'El-Kouba, Alger) .Les rats obtenus ont été répartis en cinq rats par groupe. Ils ont été soumis à une période d'adaptation de 10 jours dans notre animalerie, dont les conditions d'élevage sont les suivantes : les cages utilisés sont spéciaux en polyéthylène tapissés de litière constituée par des copeaux du bois renouvelés chaque jour jusqu'à la fin de l'expérimentation, équipés par des

biberons d'eau et un accès libre à la nourriture, la température de l'animalerie voisine de 25°C, une photopériode naturelle de 12/12H.



Figure 13 : Les conditions d'élevage des souches des rats *Wistar* Albinos (photo pers.,)

2. METHODES

2.1. Méthode d'extraction

☞ L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme végétal selon diverses techniques. Il s'agit dans notre étude d'extraire des substances (composés phytochimiques) présente dans un solide (mélange de feuilles sèches) pour la faire passer dans un solvant liquide (chloroforme, méthanol et eau).

☞ Extraction solide-liquide L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant.

☞ La macération : Dans ce processus, les feuilles sont placés dans un récipient avec le solvant et on laisse reposer à la température ambiante pendant une période d'au moins 3 jours en agitant fréquemment jusqu'à ce que la matière soluble soit dissoute. Le mélange est alors tendu, le marc (la matière solide humide) est pressé, et les liquides combinés sont clarifiées par filtration ou décantation après repos. (Florent, 2016)

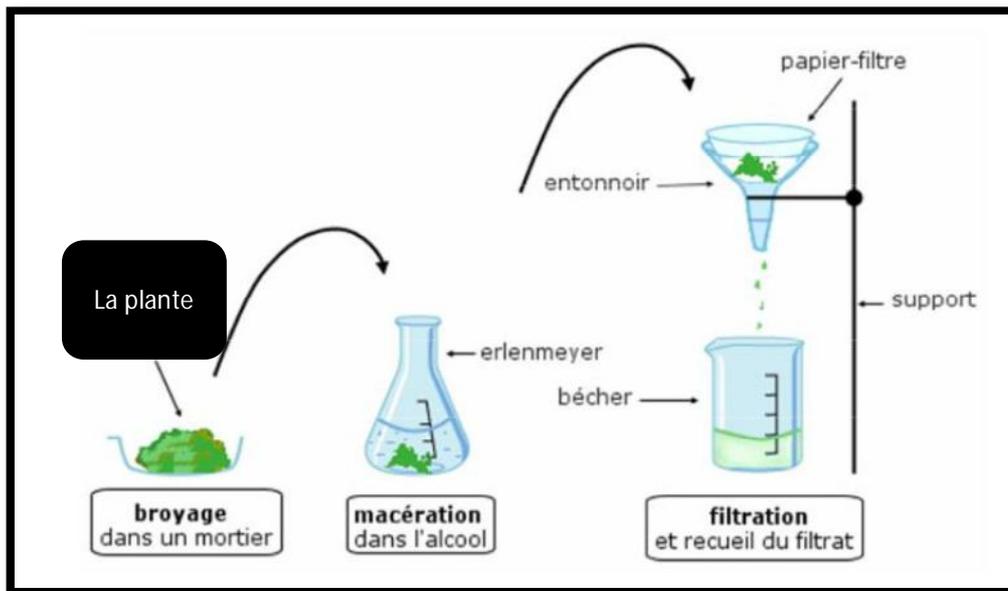
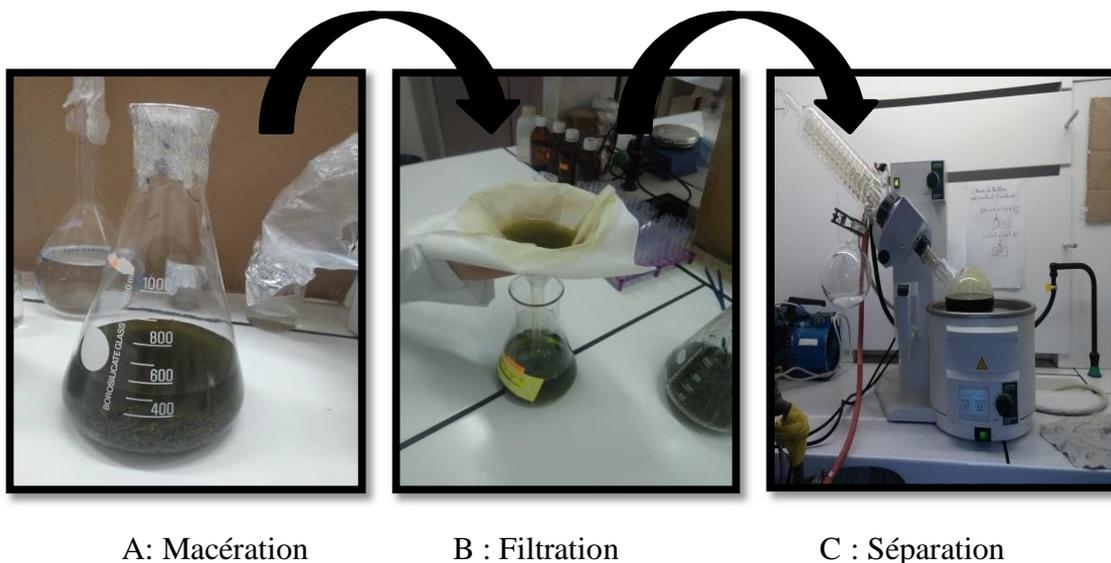


Figure 14 : Les étapes de la macération (Florent, 2016)



A : Macération

B : Filtration

C : Séparation

Figure 15 : Les étapes d'extraction solide liquide (photo pers,,)

2.2. Traitement des rats

20 rats ont été répartis en 4 groupes de 5 rats pour chacun, comme suit :

- ❖ Lot T : groupe témoin (T) non traités
- ❖ Lot N : groupe nickel (N) traité par chlorure de nickel à la dose de 10mg/kg/jour, voie orale pendant une durée de 28 jours.
- ❖ Lot E : groupe extrait (E) traité par l'extrait recevant 100mg/kg/jour, voie orale pendant une durée de 28jours
- ❖ Lot E+N : groupe mixture (E+N) traité par la mixture de nickel et l'extrait avec l'un l'autre (10mg/kg/j) pour chaque un pendant une durée de 28 jours.

2.3. Sacrifices des rats et récupération des reins

Après 28 jours de traitement, les rats des 4 groupes ont été sacrifiés par décapitation.



Figure 16 : Le sacrifice de rats (photo pers,)

Après une dissection abdominale longitudinale des rats sacrifiés, les reins sont prélevés, rincés avec l'eau physiologique à 0.9%, pesés puis conservés au congélateur à (-80°C) pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (GST, GSH, GPx, CAT, MDA et la protéine totale).



Figure 17: Dissection et prélèvement des reins (photo pers,,)

2.4. Détermination des paramètres métaboliques et enzymatique

2.4.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme des reins des différents rats étudiés, a été utilisé. Après le broyage et l'homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), le mélange est mis dans des glaçons et centrifugé (9000 tours/min, 4°C, 15 min), le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs, puis conservés à -80°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

2.4.2. Dosage des protéines

❖ Principe

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de (**Bradford 1976**) qui utilise la BSA comme standard et le BBC comme réactif. Les protéines présentes dans

l'échantillon réagissent par ses groupement amine (-NH₂) avec le BBC pour donner un complexe coloré en bleue. Le développement de la couleur de réaction reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon.

❖ **Protocole d'expérience**

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat
- Ajouter 5 ml du réactif coloré (BBC)
- Agiter et laisser le mélange pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur
- Lire l'absorbance de l'échantillon contre le blanc contenant l'eau distillée à une longueur d'onde de 595 nm. La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement tracé (0 → 1mg/ml de sérum albumine de bovin)

2.4.3. Détermination des paramètres enzymatiques

2.4.3.1. Dosage de l'activité enzymatique du Glutathion GSH

❖ **Principe**

Le dosage du glutathion est effectué selon la méthode 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 (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion.

❖ **Protocole d'expérience**

Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique) à 0.02M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.

- Prélever 0.8ml de l'homogénat déprotéinisé
- Ajouter 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%.
- Agiter et laisser pendant 15min dans un bain de glace.
- Centrifuger pendant 5min à 1000t/min.
- Prélever 0.5ml du surnageant
- Ajouter 1ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), pH 9.6.
- Ajouter 0.025ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser le mélange pour reposer pendant 5min à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance (A) à 412nm.

❖ Calcul :

$$[GSH] = \frac{D_0 \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5mgP,t} nMGSH/mgP,t$$

D0 : Densité1 optique.

- 1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml 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 à412 nm).

- 0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

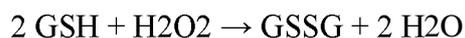
- 0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

On que la concentration de GSH est mesuré par apport à 1 mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagne par le dosage des protéines.

2.4.3.2. Dosage de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase GPx

❖ Principe

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de (Flohe et Gunzler, 1984), en utilisant du peroxyde d'hydrogène (H2O2) comme substrat. Elle est basée sur la réduction du (H2O2) en présence de glutathion réduit (GSH) pour former le (GSSG) sous l'action de la GPx selon la réaction suivante:



❖ Protocole d'expérience

-Prélever un volume de 0.2ml de cytosol/matrice.

-Ajouter 0.4ml de GSH 0.1mM et 0.2ml de tampon phosphate 0.067M, pH 7.8.

-Incuber au bain marie à 25°C pendant 05min.

-Ajouter 0.2ml d'H2O2 1.3mM pour initier la réaction et laisser pendant 10 min.

-Rajouter 1ml de TCA 1% (acide tri chloro-acétique) dans le but d'arrêter la réaction et laisser le mélange dans un bain de glace pendant 30min.

- Centrifuger durant 10min à 3000t/mn.

-Prélever un volume de 0.48 ml de surnageant.

-Ajouter un volume de 2.2ml de Na2HPO4 0.32M avec 0.32ml de DNTB 1mM.

- Mesurer la densité à 412nm chaque 30sec pendant 5min.

❖ Calcul :

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

Activité de GSH consommée / min / gr de protéine

Blanc = 0.04 micro mole de GSH réduit ----- DO_b

Extrait = 0.04 // // -----DO_e

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue) = DO_e – DO_b

$$X = \frac{(DO_e - DO_b) \times 0,04}{DO_b} = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée)}$$

$$\text{L'activité de la GPx} = X \times \frac{5}{\text{La concentration de protéine}}$$

2.4.3.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-Transférase (GST)

❖ Principe

L'activité enzymatique de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, cette méthode est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, généralement le CDNB (1-Chloro2,4-dinitrobenzène), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST. 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.

❖ Protocole d'expérience

-Centrifuger l'homogénat [échantillons +1ml de tampon phosphate (0.1M, pH6)] à 14000 t/min pendant 30 min.

-Prélever 200µl du surnageant

-Ajouter 1.2ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26mg CDNB, 153.65mg GSH, 1ml éthanol, 100ml tampon phosphate (0.1M, PH 6)].

-Lire les absorbances pendant une minute et chaque 15sec à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

❖ Calcul

$$GST \text{ (nmol GST /min/mgprotéine)} = \frac{DO(\text{min}) \times V_A}{e \times V_s} / \text{mgde protéine}$$

DO : Densité optique de l'échantillon /min.

DO/min blanc : Densité optique du blanc /min

e: Coefficient d'extinction molaire du CDNB = 9,6mM-1 cm-1

VA: Volume totale dans la cuve (0,2ml.Surnageant + 1,2mélange).

Vs: Volume du surnageant dans la cuve (0,2ml).

2.4.3.4. Dosage du catalase (CAT).

❖ Principe

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de (Cakmak et Horst (1991)). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon=39400 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{L}$ pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl de l'extrait enzymatique brut, 50 μl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3% et 2850 μl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

2.4.3.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA).

❖ Principe

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode (d'Esterbauer et al 1992). Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique pour former un complexe en couleur rose.

❖ Protocole d'expérience

- Prélever 375 μl de surnageant
- Ajouté un volume de 150 μl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl (150mM ; pH7.4) et un volume de 375 μl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Agiter puis centrifuger à 1000t/min pendant 10min.
- Prélever 400 μl du surnageant.
- Ajoute 80 μl du HCL 0.6M et 320 μl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).
- Vortexer et incuber au bain marie à 80°C pendant 10minutes.
- Lire les densités optiques des échantillons par spectrophotométrie à 530 nm.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$)

❖ Calcul

$$C \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{deprotéine} \right) = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd}$$

-C : Concentration en nmoles /mg de protéines

CHAPITRE IV: MATERIEL ET METHODES

- DO : Densité optique lue à 530 nm
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)
- Fd : Facteur de dilution: Fd = 0.2083.

Chapitres V :
Résultats et
discussions



II. Résultats et discussions

1. RESULTATS

1.1. Etude des biomarqueurs de croissance (Taux des protéines)

Tableau 05 : Evaluation de la concentration des protéines totale des rats dans les différents lots expérimentaux.

	T	E	N	E+N
Protéine	0,33±0,14	0,35±0,14	0,81±0,07 a*	0,34±0,05

* : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$)

a : Comparaison des lots traités par rapport au témoin.

Les résultats obtenus suite à l'évaluation de la concentration des protéines totale montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le lot traité par le N par rapport au lot témoin alors que pas de différence chez le lot traité par E et E+N

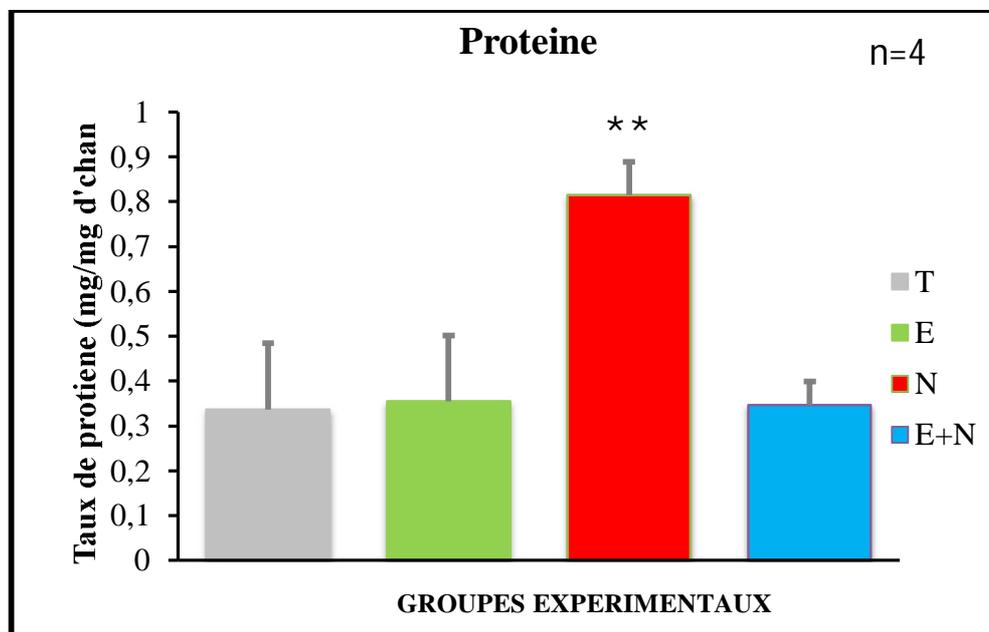


Figure 18: Variation de la concentration des protéines totales tissulaires chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

1.2. Étude des biomarqueurs de stress oxydatif

Les résultats obtenus pour la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes chez les animaux d'essai et de contrôle sont présentés dans le tableau

Tableau 06 : Activités de peroxydation lipidique et des enzymes antioxydantes dans les reins des rats testés et témoins

	T	E	N	E+N
GSH	2,88±1,31	3,13±2,81	17,70±2,95 a***	4,26±2,87
GPx	0,54±0,09	0,65±0,08	0,13±0,08 a***	0,47±0,06
GST	5,35±0,45	5,51±0,63	9,51±0,46 a*	5,98±0,34
Cat	1,61±0,21	1,51±0,18	0,26±0,20 a***	1,09±0,15
MDA	9,85±5,15	8,10±2,99	20,78±5,03 a***	13,04±4,68

* : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$)

** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$)

*** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$)

P : Seuil de signification.

a : Comparaison des lots traités par rapport au témoin.

1.2.1. Glutathion réduit (GSH)

Le taux en GSH montre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le groupe traité par le N au niveau des reins comparativement au groupe témoin, et significative ($p \leq 0,05$) chez le lot traité par E+N. En revanche, on enregistre une amélioration significative du taux en GSH chez le lot traité par E.

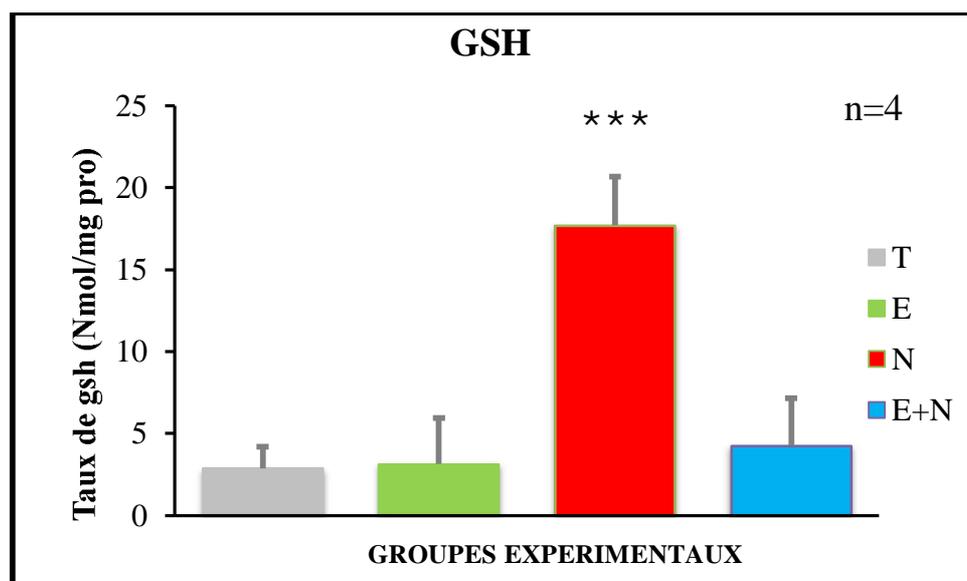


Figure 19 : Variation de l'activité de Glutathion réduit (GSH) rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

1.2.2. Glutathion peroxydase (GPx)

Une diminution très hautement significative ($p \leq 0.01$) de l'activité de glutathion peroxydase GPx rénal a été enregistrée chez les lots traités par le N par rapport au groupe témoin. Par contre, aucune variation significative chez le lot traité par E, et une diminution significative ($p \leq 0,05$) enregistrée chez le lot traité par la combinaison d'E+N comparativement au lot témoin.

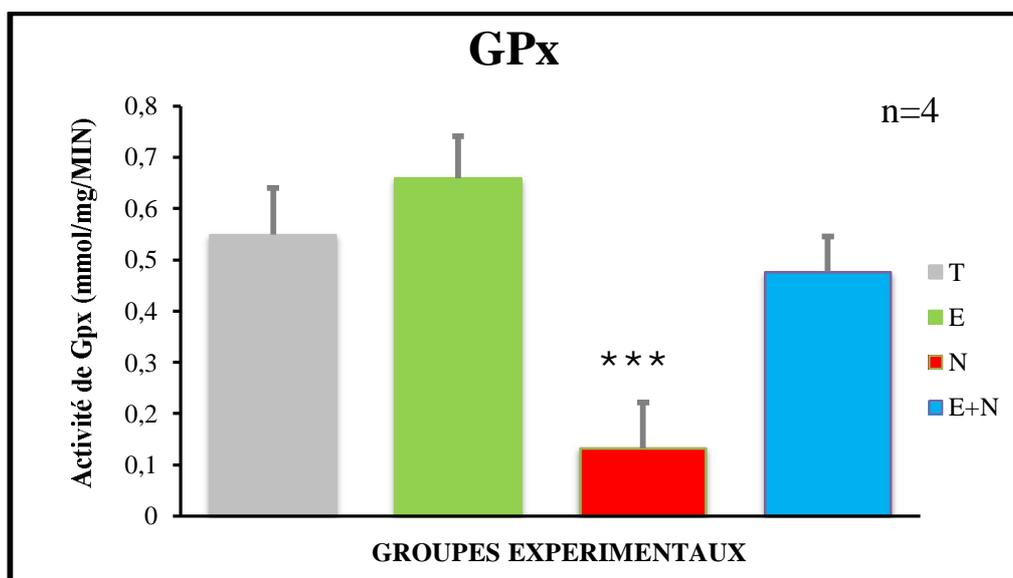


Figure 20 : Variation de l'activité de Glutathion peroxydase (GPx) rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

1.2.3. Glutathion- S- transférase (GST)

Nos résultats montrent une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de l'activité enzymatique de la glutathion-S- transférase (GST) rénal chez le lot traité par le N en comparaison avec le lot témoin .Nous avons enregistré également une augmentation non significative ($p \leq 0.05$) de l'activité enzymatique de la GST chez le lot traité par E+P par rapport aux lots témoins.

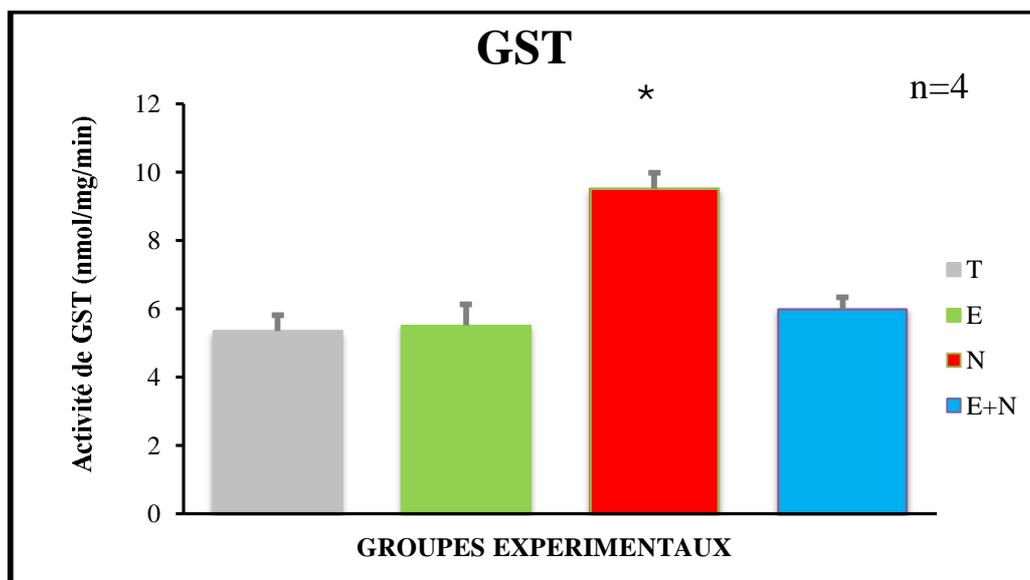


Figure 21: Variation de l'activité de (GST) rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

1.2.4. Catalase(CAT)

Une diminution hautement significative de 6% de l'activité de la catalase rénale a été observée chez le même groupe d'animaux par rapport à la valeur témoin.

En revanche, l'activité de la catalase rénale a également été réduite à 24% dans le groupe de co-exposition qui a reçu E+N.

Les activités de la catalase dans les reins de rats traités avec l'E seul n'étaient pas significativement différentes de celles du témoin.

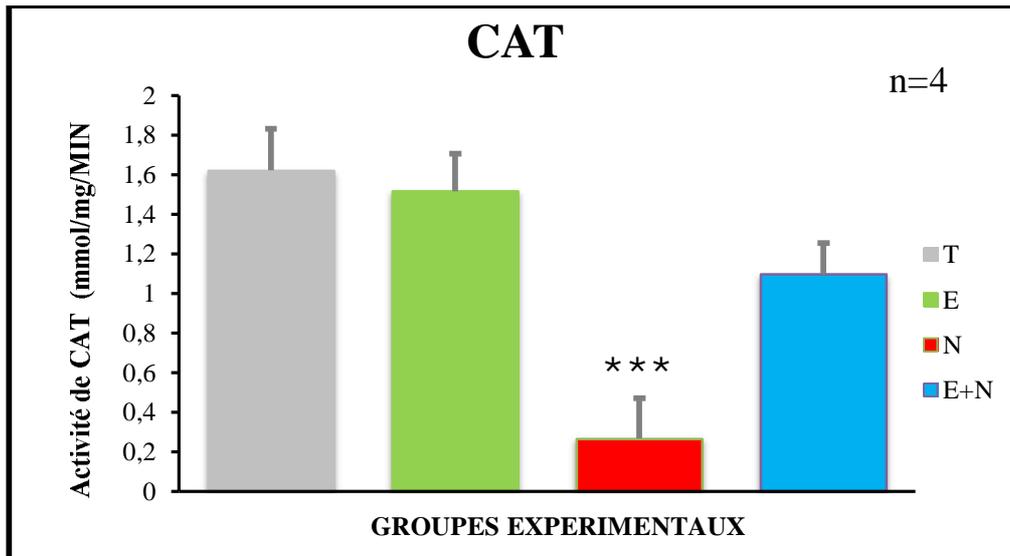


Figure 22: Variation de l'activité de (CAT) rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

1.2.5. Malondialdéhyde (MDA)

Nous avons obtenu, suite au traitement des rats par le N, une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de MDA dans les reins enregistrée par rapport au groupe témoin et une augmentation significative ($p \leq 0,05$) enregistrée chez les lots traités par E+N et une diminution non significative enregistrée chez le groupe traité par E.

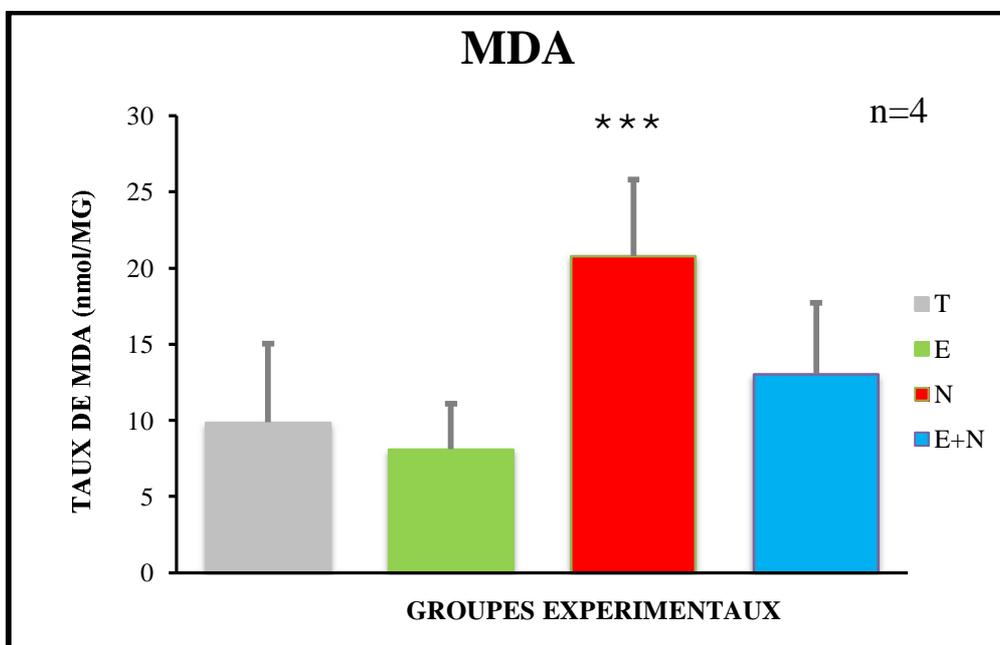


Figure 23: Variation de l'activité de (MDA) rénal chez les rats témoins et les rats traités après 28 jours.

2. DISCUSSION

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du «stress oxydant» qui est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés à des xénobiotiques dans l'environnement, parmi lesquels, on retrouve les métaux lourds.

Cette partie a pour objectif de faire la synthèse des résultats obtenus lors de traitement des rats wistar par le chlorure de nickel. Les effets toxiques de ce métal sur les reins ainsi que l'effet correcteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sont mise à l'évidence par l'investigation des paramètres métaboliques, paramètres enzymatiques. Cette expérience nous a permis de mettre en évidence les relations entre l'exposition à un métal lourd et les effets toxiques qu'ils induisent en fonction de la matrice d'exposition au niveau des reins. Les résultats de notre étude ont montré que le traitement orale des rats par le NiCl₂ pendant 28 jours a entraîné une néphrotoxicité et a engendré une perturbation des paramètres métaboliques et enzymatiques.

2.1. Discussion des paramètres de métabolisme

2.1.1. Effet de traitement sur la croissance

Les résultats actuels ont montré que le nickel a provoqué une augmentation hautement significative de protéines totales. De même, (Mongi et al. 2011) ont signalé une augmentation de protéine chez le rat et cette toxicité pourrait être attribuée à ses radicaux libres induits dommages oxydatifs. De plus cette augmentation pourrait être dû à l'induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation sous l'effet du stress oxydatif (Nahid et al., 2015) le Nickel peut modifier le métabolisme des protéines et les acides aminés et leurs synthèses (Pari et Amudha, 2011)

Nos résultats démontrent le rôle bénéfique du *Rosmarinus* sur la fonction rénal, d'où nous avons enregistré une normalisation après le traitement des rats par l'association de (E+N).

2.1.2. Effet de traitement sur les paramètres de stress oxydatif

Les métaux lourds provoquent l'augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) générant ainsi le stress oxydatif dans les reins.

2.1.2.1. Effet sur la glutathion réduit (GSH)

Dans la première série d'analyse, les indices de néphrotoxicité au niveau des reins ont été considérés. Le glutathion joue un rôle important dans les mécanismes de détoxification de la cellule et constitue la première ligne de défense antioxydante. Le glutathion réduit a donc un rôle de protecteur des cellules contre les actions toxiques (Saka & al ,2002).

Les changements des taux de GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Senouci & al, 2009). Les taux en GSH ont augmenté chez le groupe traité au NiCl₂ au niveau des reins comparativement aux témoins.

Cette augmentation reflète la participation du GSH à la défense cellulaire contre les ERO. A l'inverse, les dommages oxydatifs ont été réduits suite à la supplémentation de l'extrait.

2.1.2.2. Effet sur la glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une enzyme antioxydant clé qui règle le niveau des ROS (la GPx est capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydro peroxydes résultants de l'oxydation des acides gras insaturés) et donc protège les cellules contre les dégâts générés par le nickel (Coogan & al, 1989 ; 1977). Et d'après nos résultats on observe une diminution de l'activité GPx dans le tissu rénal chez les rats traités par le chlorure de nickel. Cette diminution est due principalement à une surproduction de peroxyde d'hydrogène (Käkelä, & al, 1999 ; 2001). En effet, l'augmentation de la peroxydation lipidique affaiblit aussi bien le fonctionnement des membranes par la baisse de leur fluidité que l'activité des enzymes membranaires et cytoplasmiques.

A l'inverse, Après l'addition du *Rosmarinus officinalis* cette diminution est significativement neutralisée par rapport au témoin.

2.1.2.3. Effet sur la glutathion S-transférase (GST)

La glutathion S-transférase est une enzyme ayant un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et la protection contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (Hayes & al, 1995).

D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de la GST dans les reins, donc la GST est impliquée dans la détoxification et l'élimination de nickel et ces métabolites (Das & al, 2007).

2.1.2.4. Effet sur la catalase (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).

Dans les tissus rénaux le NiCl₂ diminue les activités du catalase (CAT) ce résultat suggère que le NiCl₂ induit indirectement une augmentation de H₂O₂, donc il est causé un cas de stress oxydatif.

2.1.2.5. Effet sur le malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des indicateurs les plus fréquemment utilisés de la peroxydation lipidique où il est produit lors de la peroxydation des lipides polyinsaturés **(Valérie 1999)**.

Notre étude montre une augmentation très hautement significative du taux du MDA, est causée après a une peroxydation lipidique qui mène à une désintégration de la membrane cellulaire favorisant la mort cellulaire ce qui explique le phénomène de la néphrotoxicité. Cette élévation est en accord avec les travaux de **(Abdel-Daim & al ,2015)** qui ont montré une augmentation de la teneur rénale en MDA indiquant une augmentation des lipides peroxydation qui implique le stress oxydatif rénal.

La formation de résidus de la peroxydation lipidique (MDA) résultant d'une augmentation intracellulaire d'ERO.

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 & al, 2010 ; 1990)**.

Après l'addition du *Rosmarinus officinalis* cette augmentation est significativement neutralisée par rapport au témoin.

L'amélioration remarquable des paramètres de stress oxydatif après le traitement par l'extrait de *Rosmarinus officinalis* peut expliquer comme suite: la plante possède une activité antioxydant basé sur l'élimination des radicaux libre et la restauration de la présence de la balance oxydants/ antioxydants durant la toxicité induite par ce métal. La présence des polyphénols et des flavonoïdes dans la *Rosmarinus officinalis* pourrait être responsable de l'activité antioxydante. Les flavonoïdes sont des composés de métabolisme secondaires le plus important de la plante modulant la peroxydation lipidique. Les groupes phénoliques de polyphénols peuvent accepter un électron pour former les radicaux phénoxyles relativement stable, ce qui perturber les réactions d'oxydation en chaine des composants cellulaire **(Guillouty. 2016)**.

Conclusion



Conclusion

L'utilisation des métaux lourds soulève un certain nombre de préoccupations environnementales et sanitaires. Il est peut-être le temps que la population ainsi que les autorités responsables prennent conscience de ce problème pour bien le gérer par l'utilisation prudente de ces produits toxiques. À travers le travail que nous avons abordé, on peut conclure que :

L'administration orale de NiCl₂ (10 mg/kg/jour) pendant 28 jours a provoqué une perturbation des paramètres de la fonction rénale chez les rats. Cette perturbation est associée à une altération des reins. De plus, le statut antioxydant a été affecté, suggérant ainsi que le NiCl₂ altère le système antioxydant au niveau rénal ce qui génère un état de stress oxydant.

L'administration de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* concomitance avec le NiCl₂ a fait diminuer le niveau de la toxicité, en modulant les niveaux des biomarqueurs de stress oxydant, et en régulant l'activité des enzymes antioxydantes : diminution de la concentration du MDA, élévation du taux de la Glutathion peroxydase (GPx) et de la Glutathion-S-Transferase (GST), et aussi une diminution du glutathion réduit (GSH) dans les reins. Cette combinaison a aussi révélé une amélioration du taux de protéine totale.

Les résultats indiquent clairement que l'extrait de la plante joue un rôle protecteur important vis-à-vis la toxicité rénale provoquée par ses composés et qu'il a un effet antioxydant très puissant.

En effet, il ressort du présent travail que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* est un produit fort intéressant et riche en possibilités thérapeutiques.

Nos résultats sont pour nous remarquables car ils ouvrent dans le future des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet néphrotoxique et antioxydant de l'extrait de la plante et d'avancer vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires intervenant dans les effets pharmacologiques observés.

*Référence
bibliographique*



Bibliographie

-A-

1. **Aranguren, Matías Miguel Salvarredy. (2008).** Contamination en métaux lourds des eaux de surface et des sédiments du Val de **Milluni** (Andes Boliviennes) par des déchets miniers. Approches géochimique, minéralogique et hydrochimique pp3. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse.
2. **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 sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1712–1719.
3. **Atkin Mark, Gasper Amy, Ullegaddi Raj , Hilary Powers. 2005,** — Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 51, 2138-2144.

-B-

4. **Baumann, Véronique. (2019).** *Rosmarinus officinalis* - Romarin en phytothérapie.
5. **Bayr Hülya. (2005).** Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), S498-S501.
6. **BENSEFA-COLAS, Dr Lynda. (2017_2018).** Nickel p.12-20.
7. **Bouguerne Benaissa., 2012.** Conception et synthèse de dérivés phénolique hautement fonctionnalisés et étude leurs propriétés biologiques vis à vis de maladie cardiovasculaire. Thésedoctorat, Université detoulouse III ,pp256 .

-C-

8. **CEE, I. La Directive Européenne. (1994).** Chlorure de nickel.
9. **Chakrabarti s.k., BAI C.** Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 58,1501, 1999.
10. **CLEMENTINE, BOULADE. (2018).** Thèse, :lamiaceae : Caractéristiques et interets therapeutiques a l'officine. Toulouse.
11. **Cocker, Johanne. (2016).** Chapter 20. Transition Metals and Coordination Chemistry. Récupéré sur <https://slideplayer.com/slide/2776393/>

-D-

12. **Dabsxl.** (s.d.).
13. **Das, K. K., Das, S.N., Dhundasi, S. A.** Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. In Indian Journal of Medical Research, vol. 128, 2008, no. 4, pp. 412–425.
14. **Denkhaus; Salnikow K. (2002).** Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. Récupéré sur pubmed.

-E-

15. **Eramet, S. (1996, Avril 10).** Métallurgie du nickel. Récupéré sur Ti Techniques de l'ingénieur.

-F-

16. **Facility, Thomas Jefferson National Accelerator (2014).** Office of Science Education, It's Elemental - The Periodic Table of Elements.
17. **Fadi, Zakaria. (2011).** Le romarin Rosmarinus officinalis Le bon procédé d'extraction Pour un effet thérapeutique optimalthese pp45.
18. **Favier, A.,2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualitéchimique 108-115.
19. **Florent, Tahouo Sekpa. (2016).** Procédures d'extraction globale des composés phytochimiques pour l'évaluation analytique des médicaments à base de plantes. these thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie.

-G-

20. **Gérard, Miquel. (2001).** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé p.60. Récupéré sur sénat.
21. **Guillou, Maëla LE. (2008-2009).** Diagnostic et cartographie des risques de pollution de l'environnement (eau, plantes, sol), par les métaux lourds, autour de fermes camelines, au Kazakhstan pp 13. Rapport de stage de seconde année.
22. **Guillouty Amandine (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. université toulouse iii paul sabatier faculté des sciences pharmaceutiques. tou3/2103.

-H-

23. **Halliwell, Barry., 1989.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. Br J Exp Pathol.70,pp.737 - 757.
24. **Hayes, J. And Pulford, D., 1995.** The glutathione s-transferase supergene family: regulation of gst and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part ii. critical reviews in biochemistry and molecular biology, 30(6), pp.521-600.
25. **Hoefler, C. (2018).** Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, antihépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques.

-I-

26. **Imen Kahouli. (2010).** Effet antioxydant d'extraits de plantes (*laurus nobilis* L., *rosmarinus officinalis*, *origanum majorana*, *oléa europea* L.) dans l'huile de canola chauffée pp40. mémoire présenté à la faculté des études supérieures de l'université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en génie agroalimentaire pour l'obtention du grade de maître es sciences (m.sc.).
27. **INERIS. (2002).** Institut national de l'environnement industriel et des risques. métaux - mercure. Rapport final: Laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air.
28. **INSV. (2015 2016).** Les plantes médicinales. Institut européen des substances végétales.

-J-

29. **Jean-Yves, Chabier. (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie.
30. **Joshua M Hare. The new england journal of medicine, 2004 .** Nitroso-redox balance in the cardiovascular system 351, 2112-2114

-K-

31. **Kaci , Bara. (2017).** Dépôt de nanoparticules de nickel sur un substrat p.02.
32. **Koehler-Ramonatxo 2006, Halliwell 2001.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. nutrition clinique et métabolisme, 20(4), pp.165-177.

Liste des références

33. **Lilya, Boucelha et Reda, Djebbar. 2014.** Les espèces réactives d'oxygène (ROS). Faculté des sciences biologique, université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB).

-L-

34. **Lorena, Joliat. (2019).** Quels sont les impacts sur le statut en métaux lourds ...? P.26. Récupéré sur TBSC.

-M-

35. **MANDJA-ADÉDÉ, Edgar. (2016).** Le romarin et l'acide rosmarinique : intérêts thérapeutiques. Universitaires européennes.
36. **Marion, Leplat. (2017).** Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. These presentee et publiquement soutenue devant la faculte de pharmacie de marseille.
37. **Marion, Leplat. (2017).** These: Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Marseille.
38. **Martinat. (2018).** Romarin : propriétés, bienfaits, utilisations.
39. **Mohandas, J., Marshall, J. J., Duggin, G. G., Horvath, J. S., & Tiller, D. J. (1984).** Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. *Biochemical Pharmacology*, 33(11), 1801–1807. Doi : 10.1016/0006-2952(84)90353-8.

-N-

40. **Naouaoui, Salma. (2019).** Néphrotoxicité des plantes médicinales. Thèse de doctorat Université Cadi Ayyad pp162.

-O-

41. **OMS. (2014).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle.

-R-

42. **Reijo Käkälä, Anne Käkälä, Heikki Hyvärinen. 1999.** Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 123(1):27-37. Prot

-S-

43. **Saka Saad., Aouacheri Ouassila., Abdennour Cherif., 2002.** The capacity of glutathione reductase in cell protection from the toxic effect of heated oils. *Biochim.*; 84: 661-665.
44. **Salma, N. (2019).** Néphrotoxicité des plantes médicinales. Thèse de doctorat Université Cadi Ayyad pp162.

-T-

45. **Taleb-Senouci, Douja., Ghomari, Hanane., Krouf, Djamil., Bouderbala, Sherazede., Prost, Lacaille-Dubois., And Bouchenak, Malika., 2009.** Antioxidant effect of Ajugaiva aqueous extract instreptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 16(6-7), pp.623-631.

-U-

46. **UCE. (2018).** Unité Cancer et Environnement : Nickel et ses composés.
47. **UTINAM, I. (s.d.).** Récupéré sur <https://www.utinam.cnrs.fr/?Nickel>

-V-

48. **Valérie HILTENBRAND 1999.** Place de la peroxydation lipidique dans les effets deleteres des uv-a : mise en evidence des haptenes amino-imino-propene interets potentiels des antioxydants lipophiles en cosmetologie. Universite joseph fourier 1 faculte de pharmacie de grenoble.
49. **Valko, Marian., Leibfritz, Dieter., Moncol, Jan., Cronin, Milan., Mazur, Mark. And Telsler, Joshua., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), pp.44-84.

-W-

50. **Walid Khitri, N. L. (2016).** Plantes antilithiasiques utilisées en médecine traditionnelle dans la ville d'Oran, Algérie.

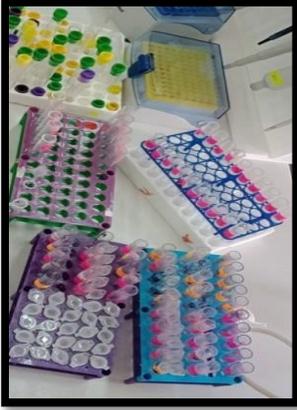
-Y-

51. **Yann. (2017).** Le nickel : élément chimique de numéro atomique 28 (symbole Ni). Récupéré sur Superprof.
52. **Youcef, Benbott Mourad et Bouali. (2018).** Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master en Biologie. Etude des activités biologiques de *Rosmarinus officinalis* L des régions Ouargla et Ain M'Lila.

Annexe



Annexe1 : Les appareils utilisés :

Photos d'appareil	Nom d'appareil
	<p>Pipette : utilisé pour transporter un volume mesuré de liquide.</p>
	<p>Tubes de prélèvement et eppendorfs : Tube de prélèvement : Le sang prélevé est réparti dans différents tubes selon les analyses à effectuer.</p> <p>Eppendorfs : sont de petits tubes munis d'un capuchon à visser ou à clipser. Ils sont en matière plastique, le polypropylène, capable de résister aux hautes températures, aux basses températures ou aux solvants organiques.</p>
	<p>Mortier et Pilon : Le mortier est un récipient permettant de broyer des matières que l'on veut transformer en pâte ou en poudre grâce à l'action d'un pilon.</p>



Fiole :

bouteille de verre à col étroit utilisée pour agiter un mélange, de conserver une solution ou de limiter l'évaporation.



Balance de précision :

Les balances de précision sont des équipements de base d'un laboratoire, utilisées dans tous les domaines de la biologie, principalement pour la préparation de réactifs et de colorants, et pour la pesée de certains produits biologiques à analyser.



Bain marie :

Liquide chaud dans lequel on met un récipient contenant ce que l'on veut faire chauffer.



Centrifugeuse :

Appareil permettant de soumettre des corps, des substances à une rotation très rapide pendant des intervalles de temps variables pour séparer ses composants.



Spectrophotomètre :

La spectrophotométrie est une méthode d'analyse qui permet de déterminer l'absorbance d'une substance chimique en solution, c'est-à-dire sa capacité à absorber la lumière qui la traverse. L'absorbance d'une substance chimique dépend de la nature et de la concentration de cette substance ainsi que de la longueur d'onde à laquelle on l'étudie.



Agitateur magnétique :

permet d'homogénéiser un mélange de façon automatique en utilisant le champ magnétique.



Réfrigérateur :

Sa fonction est de maintenir, dans un environnement contrôlé (espace réfrigéré), divers fluides et substances, afin qu'ils soient maintenus en bon état.



Évaporateur rotatif :

Utilisé pour évaporer rapidement des solvants après avoir été utilisés dans une extraction ou dans un milieu réactionnel. le plus souvent, l'évaporation du solvant est menée sous pression réduite (afin d'accélérer l'étape) que l'on obtient au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide. L'évaporateur rotatif est souvent appelé, par abus de langage, Rotavapor ou "Büchi" (noms de deux marques très courantes).

Annexe2 : Préparation des solutions

- **Solution du GSH (0.1 mM)**

Dissoudre 3.073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée

- **Solution TCA 1%**

Dissoudre 1g de TCA dans 100 ml d'eau distillée

- **Solution DTNB (0.1mM)**

Dissoudre 100 mg de DTNB dans 250ml de méthanol absolu

- **Solution de *Bradford***

100 mg de bleu de coomassie G250+50ml éthanol 95%+100 ml d'acide ortho phosphorique à 85%, agiter 30 mn puis compléter le volume à 1 litre par l' H₂O (durée de conservation 1mois)

- **Solution TBS : Tris (50mM), NaCl (150mM) et pH 7,4 :**

Dissoudre 8,775 g NaCl dans un litre d'eau distillé, puis poser 6,057 Tris et compléter le volume à 1 L par la solution NaCl 150 mM et ajuster le pH à 7,4 en ajoutant HCl ou NaOH.

- **Solution TCA-BHT(TCA20%, BHT 1%) :**

Dissoudre 20g TCA dans 100 ml d'eau distillé pour obtenir la solution TCA 20% , puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20 % et agiter à chaud.

- **Solution HCl 0.6 M :**

51.56 ml d'HCl pur et compléter le volume à 1 L par l'eau distillé.

- **Solution TRIS-TBA (TRIS 26 mM ; TBA 10 mM)**

Dissoudre 3,149 g TRIS dans 1 L d'eau distillé, puis poser 17.299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution TRIS (26mM).