



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Larbi Tébessi-Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de : Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Toxicologie

Thème

Investigation des effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de nickel chez la souris et évaluation de l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade.

Présenté par :

DJABER Sabrine

KENIOUA Maroua

Devant le jury :

Mme Boussekine S.	MCA	Université Larbi Tébessi-Tébessa Président
M. Djabri B.	Prof	Université Larbi Tébessi-Tébessa Rapporteur
M. Gasmi S.	MCB	Université Larbi Tébessi-Tébessa Examineur

Date de soutenance : 21/06/2020

Note : Mention :

RemeRciements

Louange à notre seigneur « ALLAH » qui nous a dotés de la merveilleuse faculté de raisonnement. Louange à notre créateur qui nous a permis d'acquérir le savoir. C'est à lui que nous adressons toute notre gratitude en premier lieu.

On adresse nos remerciements les plus sincères, nos respects et notre profonde gratitude à notre encadreur Prof DJABRI Belgacem pour son sérieux, ses idées lumineuses, ses conseils précieux et ses qualités de rigueur scientifique. Nous le remercions également pour l'inspiration ainsi que l'aide et le temps consacré à notre formation et à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier les honorables membres de jury, Dr. Boussekine et Dr. Gasmi qui ont acceptés de juger ce travail et d'apporter leurs précieuses critiques et suggestions.

Nous remercions sincèrement toutes les personnes qui nous ont aidés et encouragés lors de la l'élaboration de ce mémoire notamment Mme Slim Hanene pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Nous remercions notre compagnes féminines Derby et amis d'âge Que Dieu préserve notre amitié.

Enfin, nous tenons à remercier nos familles et surtout nosparents pour leur soutien et leur patience au cours de l'entièreté de mes études.

Dédicace

À ceux qui ont voué sa vie dans l'accomplissement d'un message fait par les papiers de la patience et incarné dans l'obscurité de l'éternité sous les projecteurs de l'espoir.

Ma maman bien-aimée, qui m'a appris que la volonté et la patience rendent l'impossible ... Vous m'avez appris le défi et m'avez encouragé à réussir. Que Dieu vous accorde une longue vie.

À cette personne à qui je demande à la superstar de m'amener sur la lune, pas même vers le ciel. Mon cher père, que Dieu prolonge ta vie et te fasse une couronne au-dessus de nos têtes. Merci de ne pas me couper les ailes non plus. Tu m'as plutôt appris à voler.

Pour ceux dans mon œil droit sont des rois et des sultans. Dans mon œil gauche, un médicament pour toutes les maladies de mes frères, mes proches et mon lien ... Merci d'être dans ma vie et je demande à Dieu de perpétuer votre sourire

À mes amis pour avoir toujours été présents dans mes moments de joie comme de peine et de m'avoir soutenue en me changeant les idées lorsque j'en avais besoin. Merci également à mes camarades de classe sans qui les années passées n'auraient pas été les mêmes. Certains d'entre eux sont devenus de très bons amis, aujourd'hui.

Et même ceux qui m'ont dit une fois que vous ne pourrez pas ... Je vous dis que j'ai pu avec la puissance de Dieu et ici je vous dédie cette humble œuvre.

À tous ceux qui ont aimé mon cœur et oublié ma plume

Sabrine

Dédicace

*Avec l'aide d'Allah, le tout puissant, ce travail est achevé
Je dédie particulier à mon cher Papa, qui a toujours été fier de moi, pour
son soutien sans faille, et à tous ce qu'il a pu m'apporter pour franchir
les obstacles les plus difficiles. Je tiens à lui exprimer ma plus vive
gratitude pour son aide financière et morale tout au long de ces années
d'études.*

A ma chère Mère,

*A qui je dois le meilleur de moi-même, pour m'avoir aidé à prendre mon
chemin dans la vie. Que tu trouves ici l'expression de ma profonde
gratitude pour tout ce que tu as fait. Je n'oublierai jamais ton amour et
tes sacrifices. J'espère être digne de ta confiance, et à la hauteur de tes
espérances.*

*Je dédie ce travail à mes frères,
sœurs, sœur ainée et mari, qui se tenaient à mes côtés à chaque instant de
mes moments de fatigue et m'encourageaient toujours.*

*Je dédie ce travail à ma grand-mère bien-aimée mes frères et mes tantes
et ils sont toujours à mes côtés.*

*Je dédie ce travail à ma tante, qui a un bon cœur et que ma m'oublie
jamais de prier et à ses filles.*

*Je dédie ce travail à l'honorable docteur DJABRI Belgacem qui a été un
père pour moi pour sa confiance, son soutien ses conseils et sa position
tout au long de mon parcours de recherche à ma côtés.*

*Je dédie ce travail au Dr Hanan pour son aide précieuse ses conseils et son
soutien constant pour moi.*

*Je dédie ce travail à l'université que m'a embrassé et à tous les
professeurs qui m'ont enseigné*

Je dédie ce travail à mes collègues d'étude.

Dédiez ce travail à de ireux amis.

Je dédie ce travail à ceux qui bon cœur.

*Je dédie ce travail aux personnes frustrées qui j'ai rencontrées et que je
n'ai pas rencontrées.*

Maroua.

Résumé

Les molécules de nickel sont des molécules à haut risque pour l'organisme d'humain et sont à l'origine des dommages causés par le stress oxydatif qu'elles engendrent. Il a également été constaté que les écorces de grenade peuvent aider à promouvoir la santé en général et à traiter certaines maladies lorsqu'elles sont ingérées en raison de leur teneur en composés phénoliques. Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité des nanoparticules de nickel (nano-NiO) chez les souris mâles *Mus musculus* de la souche BALB/Cet d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade (EMG).

Après une macération de 100g de la poudre d'écorce de grenade dans 1000 ml de méthanol pendant 72 h, l'EMG a été obtenu après évaporation du méthanol. L'étude expérimentale a été réalisée sur 18 souris traitées quotidiennement par gavage pendant 30 jours. Les souris ont été divisées en quatre groupes de 5 souris chacun sauf pour le groupe témoin où il y avait 3 seulement. Les souris de ce dernier groupe n'ont pas été traitées alors que ceux du second groupe ont été traités avec les nano-NiO (10 mg / kg de poids net). Le troisième a été traité avec l'EMG (500 ml/kg) et le quatrième a été traité par le mélange nano-NiO et EMG aux mêmes doses. Certains paramètres biochimiques ont été mesurés au niveau hépatique (glucides, protéines et lipide) et sanguin (FNS) et une panoplie de tests de comportement a été effectuée.

Le rendement en EMG était important (35,43%). Les résultats montrent que le traitement par les nano-NiO est associé à une réduction du gain de poids des souris lié à une augmentation de poids relatifs du foie. Parallèlement, le dosage des paramètres biochimiques a montré une augmentation significative de la concentration des glucides, protéines et des lipides totaux au niveau hépatique. Les nano-NiO sont à l'origine d'une perturbation significative de comportements des souris. De plus, les résultats hématologiques ont montré une augmentation du taux des éléments figurés du sang (augmentation de nombre des globules blancs, globules rouges et plaquettes). La plupart de ces paramètres ont été améliorés avec le traitement par l'EMG ce qui suggère de proposer ce dernier dans le schéma thérapeutique d'intoxication par les nano-NiO.

Mots-clés: nanoparticules de nickel, extrait méthanolique d'écorce, écorce de grenade, souris, stress oxydatif

ملخص

جزيئات النيكل هي جزيئات ذات خطورة عالية على جسم الإنسان تسبب الضرر الناجم عن الإجهاد التأكسدي وقد وجد أن قشور الرمان قد تساعد في تعزيز الصحة العامة وعلاج بعض الأمراض عند تناولها وذلك بسبب محتواها على المركبات الفينولية .

الغرض من هذه الدراسة هو تقدير سمية جزيئات النيكل على الفئران وتقييم التأثير الوقائي لقشور الرمان.

بعد نقع 100 غرام من مسحوق قشور الرمان في 1000 مل من الميثانول لمدة 72 ساعة، تم الحصول على مستخلص قشور الرمان بعد تبخر الميثانول.

هذه دراسة تجريبية أجريت في المختبر على 18 فأر تم علاجها يوميًا عن طريق الفم لمدة 30 يومًا. تم تقسيم الفأران إلى أربع مجموعات 5 فأران في كل مجموعة و3 في المجموعة الشاهدة: الأولى الشاهدة و لم تعالج والثانية عولجت بالرمان و جزيئات النيكل (10 ملغم / كغ منوزن الجسم) أما الثالثة فعولجت بمستخلص قشور الرمان (500 مل/كغ من وزن الجسم) والرابعة بمزيج الجزيئات النيكل ومستخلص قشور الرمان بنفس الجرعات. تم قياس بعض المعلمات الكيميائية الحيوية للأنسجة (الكربوهيدرات والبروتينات والدهون) , بعض اختبارات السلوك و مكونات الدم.

أظهرت النتائج أن العلاج باستخدام مستخلص قشور الرمان أظهرت النتائج أن حقن جزيئات النيكل مرتبط بانخفاض في الوزن مع زيادة نسبية في وزن الكبد في نفس الوقت، أظهر اختبار المعلمات البيوكيميائية زيادة كبيرة في تركيز الكربوهيدرات والبروتينات والدهون الكلية في الكبد.

تسبب جزيئات النيكل اضطراب كبير في سلوك الفأران بالإضافة إلى ذلك أظهرت نتائج أمراض الدم زيادة في مستوى العناصر المحسوبة في الدم (زيادة في عدد خلايا الدم البيضاء وخلايا الدم الحمراء والصفائح الدموية).

تم تحسين معظم هذه المعلمات مع العلاج بمستخلص قشور الرمان، مما يشير إلى أنه يمكن اعتبار مستخلص قشور الرمان علاج من التسمم بجزيئات النيكل ويجب اقتراحه للحد من سميتها .

الكلمات المفتاحية: جزيئات النيكل، مستخلص الايثانول لقشور الرمان، الفئران، المؤشرات البيوكيميائية، الإجهاد التأكسدي.

Abstract

Nickel molecules are high risk molecules for the human organism and are responsible for the damage caused by the oxidative stress they cause. It has also been found that pomegranate bark can help promote the health in general and to treat certain diseases when ingested because of their content of phenolic compounds. The aim of this study is to assess the toxicity of nickel nanoparticles (nano-NiO) in male mice *Mus musculus* of the BALB / C strain to assess the protective effect of the methanolic extract of the pomegranate bark (EMG).

After maceration of 100g of the pomegranate bark powder in 1000 ml of methanol for 72 h, the EMG was obtained after evaporation of the methanol. The experimental study was carried out on 18 mice treated daily by gavage for 30 days. The mice were divided into four groups of 5 mice each except for the control group where there were only 3. The mice of this last group were not treated while those of the second group were treated with nano-NiO (10 mg / kg of net weight). The third was treated with EMG (500 ml / kg) and the fourth was treated with the nano-NiO and EMG mixture at the same doses. Certain biochemical parameters were measured at the hepatic level (carbohydrates, proteins and lipid) and blood (FNS) and a range of behavioral tests was carried out.

The EMG yield was high (35.43%). The results show that the treatment with nano-NiO is associated with a reduction in the weight gain of the mouse with an increase in relative weight of the liver. At the same time, the assay of biochemical parameters showed a significant increase in the concentration of carbohydrates, proteins and total lipids in the liver. Nano-NiOs cause significant disruption in mouse behavior. In addition, haematological results showed an increase in the level of the figured elements of the blood (increase in the number of white blood cells, red blood cells and platelets). Most of these parameters have been improved with EMG treatment, which suggests that the latter should be proposed in the treatment regimen for lesioning with nanano-NiO.

Keywords: nickel nanoparticles, methanolic bark extract, pomegranate bark, mouse, oxidative stress

Liste des tableaux.

Tableau 01 : Espèces réactives de l'oxygène (Charles, 2012).....	5
Tableau 02: Principales sources des Espèces Réactives à l'Oxygène (Durackova <i>et al.</i> , 2008)	10
Tableau 03 : Propriétés physiques du Nickel (Wang <i>et al.</i> , 2009).....	16
Tableau 04 : Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique (Luther, 2004).	20
Tableau 05 : Composition biochimique de <i>Punica granatum</i> (Fournier <i>et al.</i> , 1948).....	27
Tableau 06 : Moyenne et écart-types des paramètres de la Formule de Numérotation Sanguine des souris les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	53

Liste des figures.

Figure 01 : Schématisation de la balance entre les Espèces Réactives à l'Oxygène et les antioxydants(Sies, 1997).....	4
Figure 02 : Intermédiaires réduits de l'oxygène (les quatre étapes de réduction mono électronique de l'oxygène) (Gardès-albertetal., 2003).....	5
Figure 03 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	9
Figure 04 : Différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Poisson, 2013).....	12
Figure 05 : Systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).....	12
Figure 06 : Mécanisme d'action de nickel sur l'ADN (Snow et al., 1998).....	18
Figure 07 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Energie Atomique., 2005).....	19
Figure 08 : Utilisation des nanoparticules pour diverses applications. Figure réalisée.....	22
Figure 09 : Cinétique des nanoparticules.....	25
Figure 10 : Fruit du <i>Punica granatum</i> (Garnier et al., 1961).....	27
Figure 11 : Protocole d'extraction (Photo personnelle).....	33
Figure 12 : Prélèvement des foies (Photo personnelle).....	34
Figure 13 : Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al., 1966).....	41
Figure 14 : Planning des tests comportementaux pour l'étude chez la souris.....	35
Figure 15 : Dispositif expérimental de l'open-field (Photo personnelle).....	36
Figure16 : Dispositif expérimental de labyrinthe classique (Photo personnelle).....	37
Figure 17 : Dispositif expérimental de Piscine de Morris (Gasmi, 2018).....	39
Figure 18 : Photographie originale du dispositif du test de <i>Dark light box</i> . (Photo personnelle).....	40
Figure 19 : Variations du poids corporel des souris témoins et traités après 30j de traitements.	44
Figure 20 : Variations du gain de poids des souris témoins et traités après 30j de traitements.	45
Figure 21 : Variations des poids relatifs des foies chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	46

Figure 22 : Variations concentrations moyennes de protéines au niveau hépatique chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	47
Figure 24 : Variations concentrations moyennes de glucides au niveau hépatique chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	48
Figure 25 : Variations du temps rearing enregistré chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	49
Figure 26 : Variations du temps passé dans le labyrinthe classique (s) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	49
Figure 27 : Variations du temps passé dans la piscine de Morris (s) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	50
Figure 28 : Variations du temps passé dans le box noir (test Dark-Light) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.....	51
Figure 29 : Droite de régression exprimant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).....	75
Figure 30 . Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).....	75
Figure 31 : Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination)	76

Liste des abréviations

NIO	l'Oxyde de Nickel
NI	Nichel
ADN	acide désoxyribonucléique
NPs	Nanoparticules
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
EMG	Extraits méthanoliques des écorce de grenade
N	L'azote
Ca	Calcium
P	Phosphore.
Mg	Magnésium
Na	Sodium.
Zn	Zinc.
Cu	Cuivre
Mn	Manganèse.
ERO	Espèces Réactives à l'Oxygène
ERN	Espèces réactives à l'azote .
O2	Molécule d'Oxygène.
SOD:	Superoxydedismutase
GPX:	Glutathion peroxydase
CAT:	Catalase
XO	Xanthine oxydase.
ATP:	Acide gras polyinsaturés.
CO2	Groupement thiol.
DHA.	Acide déhydrascorbique
RL	Radicaux libres

Table des matières

REMERCIEMENTS	I
DÉDICACE	II
ملخص	IV
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
TABLE DES MATIÈRES	XI
INTRODUCTION	2
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. STRESS OXYDATIF	4
<i>I.1. Définition</i>	4
<i>I.2. Radicaux libres</i>	4
I.2.1. Types des radicaux libres.....	4
I.2.1.1. Espèces réactives à l'oxygène.....	5
I.2.1.2. Espèces réactives au nitrogène (ERN).....	6
I.2.2. Rôles des radicaux libres.....	7
I.2.2. Origine des radicaux libres.....	8
I.2.2.1. Origine endogène.....	8
I.2.2.2. Origine exogène.....	8
<i>I.3. Effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques</i>	10
I.3.1. Dommage de L'ADN.....	10
I.3.2. Oxydation des protéines.....	10
I.3.3. Peroxydation lipidique.....	11
<i>I.4. Système antioxydants</i>	12
I.4.1. Définition.....	12
I.4.2. Principaux systèmes antioxydants.....	12
I.4.2.1. Antioxydants endogènes ou enzymatiques.....	12
I.4.2.2. Antioxydants exogènes ou non enzymatiques.....	13
I.4.2. Modes d'action des antioxydants.....	15
I.4.3. Rôle protecteur des antioxydants contre le stress oxydatif.....	15
II. NANOPARTICULES DE L'OXYDE DE NICKEL	16
<i>II.1. Présentation de Nickel</i>	16

II.1.1. Définition.....	16
II.1.2. Propriétés physicochimiques du Nickel.....	16
II.1.3. Origine et localisation du Nickel dans l'environnement.....	17
II.1.4. Usages du Nickel.....	17
II.1.5. Distribution du nickel dans les tissus.....	18
II.1.6. Mécanisme d'action de nickel sur les cellules.....	18
II.1.7. Effets du Nickel sur l'organisme.....	19
II.1.8. Présentation de Nanoparticules de Nickel.....	19
II.1.9. Définition des nanoparticules métalliques.....	19
II.1.10. Sources des nanoparticules.....	19
II.1.11. Définition l'oxyde de nickel (NiO).....	20
II.1.12. Propriétés physicochimiques des nanoparticules.....	20
II.1.13. Synthèse des nanoparticules métalliques.....	21
II.1.14. Utilisation.....	21
II.1.15. Voies d'exposition.....	23
II.1.16. Principaux effets toxiques des nanoparticules sur la santé humaine.....	23
II.1.17. Voies d'entrée dans l'organisme.....	23
II.1.18. Toxicocinétique des nanoparticules après pénétration dans l'organisme.....	24
III. GRENADE.....	25
<i>III.1. Généralité sur la grenade.....</i>	<i>25</i>
<i>III.2. Origine géographique et aire de répartition de la grenade.....</i>	<i>25</i>
<i>III.3. Dénomination communes.....</i>	<i>26</i>
<i>III.4. Description botanique.....</i>	<i>26</i>
<i>III.5. Classification de Punica granatum.....</i>	<i>27</i>
<i>III.6. L'écorce de grenade.....</i>	<i>28</i>
<i>III.7. Composition des écorces de grenade.....</i>	<i>28</i>
<i>III.8. Usages thérapeutiques.....</i>	<i>28</i>
I.8.1. Prévention des maladies digestives.....	28
I.8.2. Propriétés anti-inflammatoire.....	28
I.8.3. Activité antioxydante.....	29
I.8.3. Activité antibactérienne.....	29
I.8.4. Propriété antiseptiques.....	29
<i>III.9. Méthodes d'extraction.....</i>	<i>29</i>
<i>III.10. Toxicité de grenade.....</i>	<i>30</i>

PARTIE PRATIQUE

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	32
<i>I.1. Matériels biologique.....</i>	<i>32</i>
I.1.1. Matériel végétal.....	32
I.1.2. Matériel animal.....	32
<i>I.2. Méthodes.....</i>	<i>33</i>
I.2.1. Préparation d'extraits méthanoliquesdes grenades.....	33
I.2.1.1. Protocole d'extraction.....	33
I.2.1.2. Calcul du rendement.....	33
I.2.2. Traitement des souris.....	34
I.2.3. Sacrifices et prélèvement du sang et des foies.....	34
<i>I.3. Dosage des métabolites.....</i>	<i>34</i>
I.3.1. Dosage des protéines.....	41
I.3.2. Dosage des lipides.....	42
I.3.3. Dosage des glucides.....	42
<i>I.4. Tests comportementaux.....</i>	<i>34</i>
I.4.1. Test d'Open-Field.....	35
I.4.2. Test de labyrinthe classique.....	36
I.4.3. Test de Piscine de Morris.....	38
I.4.4. Test de Dark-Light.....	39
<i>I.5. Détermination de la Formule de Numérotation Sanguine.....</i>	<i>43</i>
<i>I.6. Analyse statistique.....</i>	<i>43</i>
II. RÉSULTATS.....	44
<i>II.1. Rendement en EMG.....</i>	<i>44</i>
<i>II.2. Effets des nano-NiO et de l'EMG sur les paramètres de croissance des souris.....</i>	<i>44</i>
II.2.1. Effet sur le poids corporel.....	44
II.2.2. Effet sur le gain de poids.....	44
II.2.3. Effets des nano-NiO et de l'EMG sur poids relatif des foies.....	45
<i>II.3. Effets du nano-NiO et EMG sur les paramètres biochimiques au niveau des foies</i>	<i>46</i>
II.3.1. Effet sur le taux des protéines hépatiques.....	46
II.3.2. Effet sur le taux des lipides hépatique.....	47
II.3.3. Effet sur le taux des glucides hépatique.....	48
<i>II.4. Effet des NiO et EMG sur le comportement des souris.....</i>	<i>48</i>
II.4.1. Effet sur le test d'Open-Field.....	48
II.4.2. Effet sur le test de labyrinthe classique.....	49

II.4.3. Effet sur le test de Piscine de Morris.....	50
II.4.4. Effet sur le test de Dark –Light.....	50
II.5. Effet des nano-NiO et d’EMG la FNS.....	51
II.5.1. Effet sur le taux des globules blanc.....	51
II.5.2. Effet sur le pourcentage des lymphocytes.....	51
II.5.3. Effet sur le pourcentage des granulocytes.....	52
II.5.4. Effet sur le taux des globules rouges.....	52
II.5.4. Effet sur le pourcentage de l’Hématocrite(HCT).....	52
II.5.5. Effet sur le taux de des plaquettes.....	52
III. DISCUSSION.....	ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.54
III.1. Rendement en EMG.....	54 Erreur ! Signet non défini.
III.2. Effets des nano-NiO et del’EMG sur les paramètres de croissance des souris	Erreur !
Signet non défini.55	
III.2.1. Effet sur le poids corporel et le gain de poids.....	Erreur ! Signet non défini.55
III.2.2. Effets des nano-NiO et de l’EMG sur poids relatif des foies	Erreur ! Signet non
défini.55	
III.3.Effets du nano-NiO et EMG sur les paramètres biochimiques au niveau des foies	
.....	Erreur ! Signet non défini.56
III.4. Effet des NiO et EMG sur le comportement des souris.....	Erreur ! Signet non défini.57
III.5. Effet des nano-NiOetd’EMG la FNS.....	Erreur ! Signet non défini.58
III.6. Effet hépathoprotecteur de l’EMG.....	Erreur ! Signet non défini.58
CONCLUSION.....	61
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63
ANNEXES.....	74

Introduction

Introduction

C'est une vérité incontestable que la nanotechnologie est la bénédiction d'une nouvelle ère dans de nombreux domaines, y compris les applications industrielles et biomédicales (Kumari et al., 2013). Les nanoparticules, notamment ceux de l'oxyde de nickel (nano-NiO), ont suscité une attention mondiale exceptionnelle en raison de leurs nombreuses applications et de leurs effets néfastes. La fabrication et l'utilisation de produits à base de nanotechnologies dans le monde entier entraîne leur rejet dans l'environnement, contaminer les aliments et l'eau, entraînant finalement l'entrée dans le corps humain. Les enquêtes ont indiqué que l'absorption des nanoparticules pourrait se produire à travers le tractus gastro-intestinal par ingestion accidentelle ou par la consommation d'eau. On suppose que les nano-NiO sont ensuite transférés à divers tissus y compris le foie où ils s'accumulent et induisent une toxicité (Dumala et al., 2019).

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

Cette étude vise à évaluer les effets toxiques des nano-NiO et estimer l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade sur le foie des souris.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique comportant trois chapitres : le premier chapitre vise à présenter le stress oxydatif. Le second chapitre présente les nanoparticules de l'oxyde de nickel et le troisième chapitre est consacré à la présentation du grenadier.

La deuxième partie de ce travail consiste en une étude expérimentale qui comporte une description du matériel et méthodes ainsi qu'une présentation des résultats et leur discussion en comparaison avec des travaux et des résultats précédents.

Partie Bibliographique

I. Stress oxydatif

I.1. Définition

Le stress oxydatif ou stress oxydant, est un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante en faveur des oxydants (Pourrut, 2008). C'est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs capacités antioxydantes. L'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules (Favier, 2006).

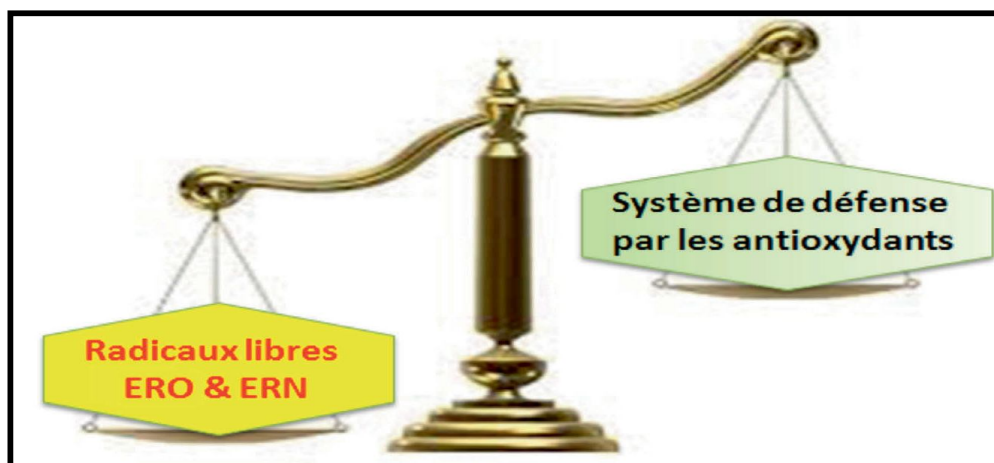


Figure 01 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants(Sies, 1997).

I.2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans ses orbitales (Tremellen, 2008). La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et que leur durée de vie est courte (Carange, 2010).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés(Evans et al., 2002):

-Addition d'un électron libre à un non radical : $NR + e^- \rightarrow R^\cdot$

-Perte d'un électron par un non radical : $NR - e^- \rightarrow R^\cdot$

-Scission homolytique d'une liaison covalente : $A-B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$.

I.2.1. Types des radicaux libres

Il existe deux grandes familles d'espèces réactives (Sies, 1991): les espèces réactives à l'oxygène (ERO) et les espèces réactives à l'azote (ERN).

I.2.1.1. Espèces réactives à l'oxygène

Les ERO sont une famille d'entités chimiques regroupant les dérivés non radicalaires et les radicaux libres oxygénés (Belkheiri, 2010). En effet, la molécule d'oxygène diatomique (O_2) ne réagit pas spontanément avec d'autres molécules, car elle contient 2 électrons non appariés (biradical). Pour permettre la réaction de l'oxygène avec les molécules organiques, il y a 2 possibilités: (1) la molécule organique est transformée en une monoradical (une molécule contenant 1 électron non apparié) par l'élimination de 1 électron (oxydation), et / ou (2) l'oxygène est converti en monoradical par l'addition de 1 électron (réduction) (Jean-Charles, 2012). Les EROs sont formés par réduction de l'oxygène en anion superoxyde (Turrens, 2003)

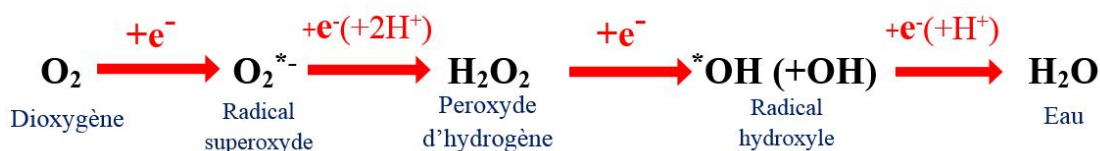


Figure 02 : Intermédiaires réduits de l'oxygène (les quatre étapes de réduction mono électronique de l'oxygène) (Gardès-albertetal., 2003).

I.2.1.1.1. Type des espèces réactives à l'oxygène

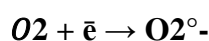
Les ERO (Tableau 01) tels que le radical hydroxyl (OH), le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et sa forme protonnée ($HO_2 \cdot$), le radical peroxy ($ROO \cdot$) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) sont des molécules hautement réactives (Chu et al., 2010).

Tableau 01 : Espèces réactives de l'oxygène (Charles, 2012).

Radicaux libres	Non radicalaires
Radical superoxyde	Peroxyde d'hydrogène
Radical hydroxyle	Oxygène singulet

a) Anion Superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Dans l'organisme, une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des ERO : l'anion superoxyde (Kœchlin-Ramonatxo, 2006 ; Al-Mamun *et al.*, 2007).

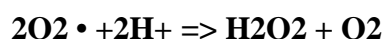


Partie Bibliographique

Donc c'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron. C'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000). L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ joue un rôle très important dans la génération de d'autres radicaux libres (Stief, 2003).

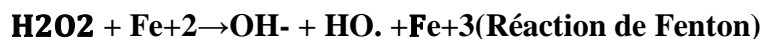
b) Radical peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui lui donnent naissance, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance (Halliwell, 1997). Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical (Halliwell *et al.*, 1984). Cette réaction est catalysée par le superoxyde dismutase.



c) Radical hydroxyl (OH)

Le radical est le plus dangereux dans l'organisme (Halliwell *et al.*, 1984 ; Vergely *et al.*, 2003). Il peut se former par réaction du peroxyde d'hydrogène avec un ion ferreux (réaction de Fenton) ou par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss) (Han *et al.*, 2001).



Le fer est essentiel dans les processus d'oxydation soit indirectement en catalysant les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss soit directement sous la forme d'espèces de type ferryl ou perferryl ($Fe^{3+}O_2^{\bullet-}$) (Sergent *et al.*, 2001).

d) Oxygène Singlet (1O₂)

C'est un oxygène moléculaire excité extrêmement réactif et de durée de vie limitée (Martini *et al.*, 2006), l'oxygène moléculaire l'état triplet (biradical) est plus stable que l'état singulier, ainsi l'oxygène singulier fait partie des EOR. Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers ERO ou en présence de la lumière (Sorg, 2004).

I.2.1.2. Espèces réactives au nitrogène (ERN)

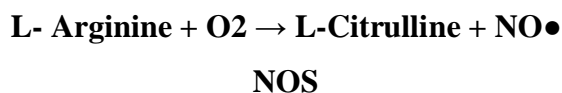
I.2.1.2.1. Définition

Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote c'est une le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'azote (ONOO) étant deux espèces bien connues (Tremellen, 2008).

I.2.1.2.2. Types d'espèces réactives au nitrogène

a) Oxyde nitrique

C'est un agent vasodilatateur^{7,8}. Il est synthétisé par les nitrososynthases (NOS) selon la réaction :



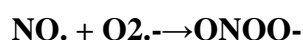
Le peroxy-nitrite est cytotoxique et oxydant pour les résidus méthionine, les thiols et les thioéthers. C'est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (Fang *et al.*, 2002). L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et capable d'entamer la lipide peroxidation (Halliwell, 1996).

b) Dioxyde d'azote (NO₂•)

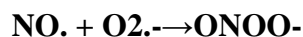
Formé à partir de la réaction du radical peroxy avec NO, le nitroxydioxyde est un puissant déclencheur de la peroxidation des lipides par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés.

c) Peroxyde nitrite (ONOO⁻)

La réaction du NO avec l'anion superoxyde donne naissance au peroxy-nitrite (Wiernsperger, 2003).



Le peroxy-nitrite est un dérivé d'oxygène très toxique qui provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL (Halliwell, 1997). Le peroxy-nitrite apparaît comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératifs et des lésions rénales. Le peroxy-nitrite est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Knight, 1999).



I.2.2. Rôles des radicaux libres

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Partie Bibliographique

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (Favier, 2003), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules (Touafek, 2010 ; Marfak, 2011). Plusieurs études (Cadet *et al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; Halliwelle *et Gutteridge*, 2007) ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

I.2.2. Origine des radicaux libres

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes.

I.2.2.1. Origine endogène

Une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres est la mitochondrie, organite utilisant de l'oxygène pour produire de l'ATP. Au cours de la respiration cellulaire, 95 à 99% de l'oxygène consommé est réduit en eau. Toutefois, 1 à 5% de l'oxygène est transformé en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons (Finaud *et al.*, 2006). Ainsi, la production de radicaux libres est proportionnelle à la consommation d'oxygène. De plus, les peroxysomes, les microsomes ainsi que les leucocytes tels les granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) et les macrophages sont d'importantes sources de production de radicaux libres (Zou *et al.*, 2008; Valko *et al.*, 2006). Les granulocytes et les macrophages, grandement impliqués dans le système immunitaire de par leur rôle à éliminer certains antigènes, sont munis d'un système NADPH-oxydase capable de produire des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Finaud *et al.*, 2006).

Parmi les facteurs endogènes, on retrouve également le stress psychologique, l'inflammation (infection, maladies chroniques), le cancer, l'ischémie-réperfusion et la mort cellulaire (Moller *et al.*, 1996).

I.2.2.2. Origine exogène

Partie Bibliographique

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve : (Figure 03). L'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, faible consommation d'antioxydants) (Hu *et al.*, 2006; Moller *et al.*, 1996).

Le CO₂ atmosphérique (Bentes de Souza *et al.*, 2004). Les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique (SO₂, NO₂, O₃, hydrocarbures), métaux environnementaux (métaux de transition tels le mercure, le fer, le cadmium et nickel, arsenic, amiante) (Valko *et al.*, 2006 ; Valko *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 1996). Les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), ils inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (Houston, 2007). Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène) peuvent induire un stress oxydatif (Moller *et al.*, 1996).

Les métaux toxiques comme le chrome, le vanadium, le cuivre peuvent induire la formation des RL. Le Fer libre (surcharges localisées ou généralisées) et le H₂O₂ très réactif fabriquent des radicaux hydroxyles eux-mêmes très réactifs (réaction de Fenton) (Beaudeau *et Vasson*, 2005).

Les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes) peuvent participer à la formation des RL (Moller *et al.*, 1996). Plusieurs autres systèmes enzymatiques produisent des radicaux libres au cours des réactions biochimiques (xanthine oxydase, hème oxygénase, cytochrome P450...).

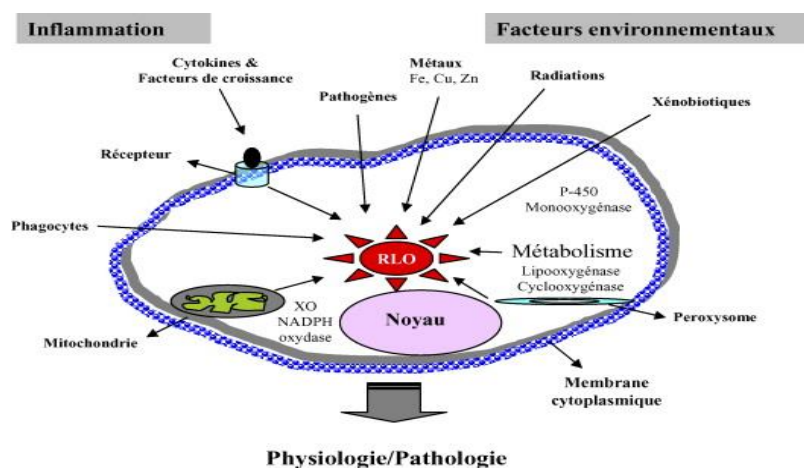


Figure 03 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène

(Afonso *et al.*, 2007)

XO : xanthine oxydase ; **P-450** : cytochrome P-450.

Tableau 02:Principales sources des ERO(Durackova *etal.*,2008)

Source endogènes	Source exogène
NADPH Oxydases	Tabagisme
Chaîne respiratoire mitochondrial	Cytokine pro- inflammatoire
Xanthine Oxydase	Chimiothérapie
Atherogénèse	Radiation ionisantes
Lipo-Oxygénase	Radiation UV
Phagocytes	Toxique environnementaux
Inflammation	Champs électriques
Etat d'ischémie –reperfusion	Xénobiotique pro –oxydant

I.3. Effets du stress oxydant sur les macromolécules biologiques

I.3.1. Dommage de L'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles que des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures de brins, des pontages (cross-links) inter et intra brin et des pontages protéine-ADN (Wang, 2008).

Une des lésions les plus étudiées est le 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) et son équivalent désoxyribonucléoside, le (8-oxodG) (Loft *et al.*,2008). Le 8-hydroxy-2'désoxyguanosine(8-OHdG) constitue également une lésion à l'ADN, causée par les ERO, très utilisée et sa grande stabilité en fait un bon marqueur de stress oxydatif (Matsumoto *etal.*,2008). Le 5-hydroxyméthyl-2'-désoxyuridine (HmdU) et le Cornet assaysontaussideuxbiomarqueurs sensibles et spécifiques couramment utilisés (Romieu *et al.*,2008).

I.3.2. Oxydation des protéines

Lorsque des radicaux libres réagissent avec des protéines saines, plus précisément avec le groupement radical (chaîne latérale) des acides aminés, il en résulte la formation de groupement carbonyles. Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, pour mesurer les dommages oxydatifs effectués aux protéines (DalleDonne *et al.*,2006 ; Chevion *et*

al., 2000). La grande stabilité chimique des protéines carbonylées en fait une cible intéressante pour les mesures en laboratoire. De plus, leur stabilité suite à un entreposage au froid de 10 ans a été démontrée (Dalle-Donne *et al.*, 2006). La quantification des protéines carbonylées est aussi un test sensible et spécifique (Romieu *et al.*, 2008). Parmi les marqueurs plasmatiques, on retrouve également la sulfoxydation de la méthionine et les produits de la tyrosine (Kadiiska *et al.*, 2005). Pour ce qui est de la possibilité de mesurer l'oxydation des protéines en examen de santé routinier, le dosage des produits de l'oxydation avancée des protéines serait une des rares méthodes à être à la fois simple et peu dispendieuse (Selmeç *et al.*, 2008).

I.3.3. Peroxydation lipidique

Alors que l'oxydation des lipides représente l'utilisation du substrat énergétique, la peroxydation des lipides est la dégradation des acides gras membranaires. Elle constitue par conséquent un indice de dommages oxydatifs effectués aux lipides. La peroxydation lipidique génère une variété de produits de décomposition relativement stables, principalement des aldéhydes tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxy-2-nonéanal, le 2-propéanal et les isoprostanes qui peuvent être mesurés dans le plasma et l'urine comme marqueurs indirects de stress oxydatif. Le dosage des F2-isoprostanes est actuellement considéré comme l'approche la plus rigoureuse pour évaluer les niveaux de peroxydation lipidique causée par les radicaux libres *in vivo*. Les données disponibles indiquent que la quantification des F2-isoprostanes dans le plasma ou dans l'urine donne un indice de stress oxydatif hautement précis et approprié (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Également, les hydroperoxydes lipidiques, les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique ainsi que les diènes conjugués sont largement utilisés comme marqueurs de peroxydation lipidique pouvant être mesurés dans le plasma (Kadiiska *et al.*, 2005; Vincent *et Taylor*, 2006).

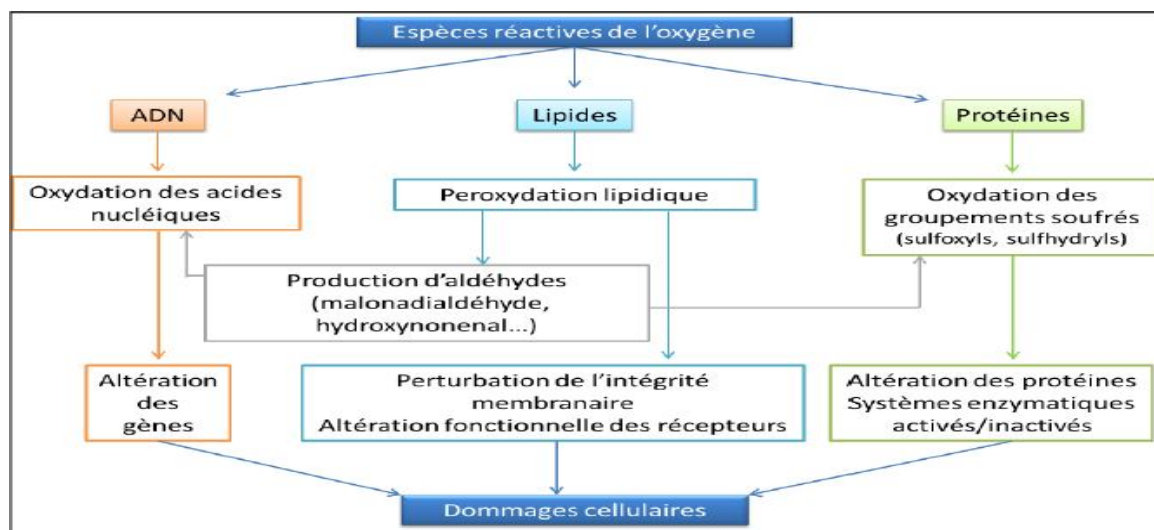


Figure 04 : Différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Poisson, 2013).

I.4. Système antioxydants

I.4.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par Halliwell comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1999).

I.4.2. Principaux systèmes antioxydants

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation (Pincemail *et* Defraigne, 2004) (Figure 05). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des ERO pour minimiser le dommage oxydatif (Tang *et* Halliwell, 2010).

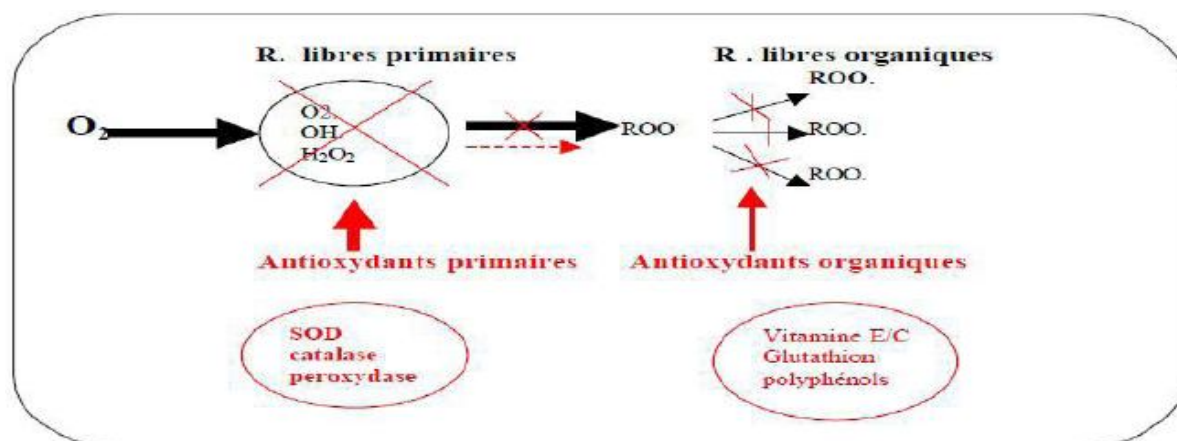


Figure 05: Systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).

I.4.2.1. Antioxydants endogènes ou enzymatiques

Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser : en un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes (le superoxydedismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), l'acide urique, les protéines à groupement thiols) et en un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonucléases et ligase et des macroxyprotéinases (Pincemail, 1998).

I.4.2.1.1. Superoxydedismutase (SOD)

L'enzyme superoxydedismutase (SOD) est impliquée dans la neutralisation des ions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme la peroxydite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). L'activité SOD constitue un élément essentiel dans le système cellulaire antioxydant pour protéger la matrice extracellulaire ainsi que les cellules des effets délétères de l' $O_2^{\bullet-}$ et de ses dérivés (Afonso *et al.*, 2007).

I.4.2.1.2. Glutathion peroxydase (GPX)

La fonction biochimique de la glutathion peroxydase est de réduire les hydroperoxydes lipidiques en alcools correspondants et de réduire le H_2O_2 libre en eau. Contrairement à la catalase, la peroxydase possède une haute affinité pour H_2O_2 et peut l'éliminer même lorsqu'elle est présente en faible concentration (Kohen *et al.*, 2002).

I.4.2.1.3. Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme tétramère constituée de quatre sous-unités identiques de 60 kDa, et ayant une masse moléculaire d'environ 240 kDa. CAT réagit très efficacement avec H_2O_2 pour former de l'eau et de l'oxygène moléculaire qui sont des composés stables (Matés *et al.*, 1999).

I.4.2.2. Antioxydants exogènes ou non enzymatiques

I.4.2.2.1. Glutathion

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (Haleng *et al.*, 2007). Le glutathion peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés (Jones, 2002).

I.4.2.2.2. Vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E, comme la vitamine C, est un antioxydant très efficace du fait de sa faible propension à être un donneur d'électrons. Elle agit principalement par le transfert direct d'atomes d'hydrogène (Njus and Kelley, 1991).

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (α , β , δ , γ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls α et δ tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (Vertuani *et al.*, 2004).

I.4.2.2.3. Acide ascorbique (vitamine C)

L'activité vitaminique, antiscorbutique de l'acide ascorbique résulte de la perte de la capacité de synthèse de ce composé par l'homme (Nishikimi *et al.*, 1994). Ce céto lactone hydrosoluble possède deux groupes hydroxyles qui lui confèrent la propriété réductrice par formation successive du radical ascorbyl et de l'acide déhydrascorbique (DHA).

Cette vitamine est capable de détoxifier une espèce radicalaire par piégeage de l'électron surnuméraire et stabilisation de cet électron par résonance, rendant la forme ascorbyl moins réactive que l'espèce radicalaire initiale (Buettner, 1993).

I.4.2.2.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes Ce sont principalement des pigments colorés présents dans les plantes et des microorganismes contiennent des doubles liaisons conjuguées et leur activité antioxydante découle de la capacité de ceux-ci à délocaliser les non appariés électrons Il y a principalement 2 classes de caroténoïdes: carotènes et xanthophylles.

Les carotènes sont caroténoïdes et xanthophylles hydrocarbonés contiennent oxygène sous forme d'hydroxyle, méthoxyle, carboxyle, groupes céto ou époxy (Rahman, 2007).

I.4.2.2.5. Bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex : hémoglobine). Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux peroxy ROO° et contre le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Powers *et al.*, 2008). La toxicité de la bilirubine par une augmentation de la formation d'oxygène singlet en présence de lumière (Halliwell *et al.*, 2007).

I.4.2.2.6. Oligoéléments

Les oligo-éléments sont des corps simples, inorganiques appartenant aux métaux ou aux métalloïdes, présents en très petite quantité dans l'organisme, et pour lesquels il a été démontré qu'ils sont nécessaires à la vie. Ils ne sont pas synthétisés par le corps humain, ils devront donc être obligatoirement apportés par l'alimentation. Parmi ceux-ci, le chrome, le cuivre, le fer, le fluor, l'iode, le molybdène, le sélénium, et le zinc sont dits essentiels car une carence en ces éléments est possible (Picaud, 2017).

I.4.2.2.7. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de composés poly- phénoliques à structure benzo- γ -pyrone largement représentée chez les plantes, responsables de plusieurs activités pharmacologiques. Ces substances ont été étudiées en raison de leurs avantages potentiels pour

la santé en tant qu'antioxydants, action induite par leurs groupes hydroxyle fonctionnels, qui sont: capable d'éliminer les radicaux libres (Pizzino et *al.*,2017).

I.4.2. Modes d'action des antioxydants

Les agents antioxydants interviennent directement sur la molécule oxydante par un échange d'électrons, ou en chélatant les métaux de transition, court-circuitant(Hellalz, 2011). Certaines molécules antioxydants ont pour action de dismuter les ERO ou de les piéger pour former des composés stables. Ces dernières sont d'ailleurs appelés piégeurs (**scavenger en anglais**). Grâce à leur petite taille (Combellas, 2005).

I.4.3. Rôle protecteur des antioxydants contre le stress oxydatif

Empêcher l'action de l'oxygène libre (RL) c'est-à-dire qu'ils sont capables d'empêcher autoxydation Eviter l'altération du produit au cours de son emploi, stockage compris, par des phénomènes d'oxydations permettre l'emploi de substance intéressantes mais fragiles, acide gras polyinsaturés, huiles végétales insaturée, acide amine soufrés (Marie –Claude *et al.*, 2006). Inhibe ou retard significativement l'oxydation d'une substance.

La prévention des dégâts par la mise à disposition d'électron (céruloplasmie, vitamine C , SOD , GSHPx) et la réparation des molécules de ADN (Zn , acide folique , niacine) (Berger, 2006).

II. Nanoparticules de l'Oxyde de Nickel

II.1. Présentation de Nickel

II.1.1. Définition

Le Nickel est un métal blanc brillant de numéro et de masse atomique respectivement 28 et 58.7, il est classé parmi les métaux de transition qui fait partie du groupe des métaux non-ferreux. Le Nickel sous forme d'ions, se présente essentiellement sous degré d'oxydation +2. Il peut se présenter au degré +3 et très exceptionnellement au degré +4. Au degré d'oxydation +2, le Nickel donne d'une manière générale des composés de couleur verte (Wang *et al.*, 2009).

II.1.2. Propriétés physicochimiques 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 ...).

Fiche de synthèse sur la criticité des métaux - Le nickel – Décembre- 2016-P8

Les principales constantes physiques utiles sont résumées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 03 : Propriétés physiques du Nickel (Wanget *al.*, 2009).

Symbole. Ni
Couleur blanc légèrement jaunâtre
Configuration électronique $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^8 4s^2$
Masse atomique 58,71 u
Masse volumique 8,907 g/cm ³
Température de fusion 1453 °C
Coefficient de dilatation 12,8.10 ⁻⁶ à 20 °C
Conductivité thermique 94 W.m ⁻¹ .K ⁻¹ à 0 °C
Résistivité électrique 7,2 μΩ.cm à 20 °C
Résistance à la rupture Rm 350 MPa

Limite d'élasticité Re 150 M Pa

Allongement A 30 % à 40 %

Température de curie 359 ° C

Dureté 150 HV

Cristallisation cubique à faces centrées

Champ coercitif H_c 280 à 480 A/m

Aimentation à surtension 0,61 T

II.1.3. Origine et localisation du Nickel dans l'environnement

Le nickel est largement distribué dans la nature, formant environ 0,008% de la croûte terrestre. Le noyau de la terre contient 8,5 % de nickel, les nodules profonds 1,5 %; les météorites contiennent de 5 à 50 %. Nickel (5). Les concentrations naturelles de nickel dans l'eau sont relativement faibles, soit 0,228–0,693 µg/litre, dans les réseaux d'eau douce en général moins de 2. Les sols agricoles contiennent du nickel à des concentrations de 3 à 1 000 mg/kg; dans 78 échantillons de sols forestiers du nord-est. Aux États-Unis, des concentrations de 8,5 à 15 mg/kg ont été signalées (6). La teneur en nickel est enrichie en charbon et en pétrole brut. Le nickel dans les charbons varie jusqu'à 300 mg/kg; la plupart des échantillons contiennent moins de 100 mg/kg, mais il y a une grande variation par région (SWAINE *et al.*, 1980). La teneur en nickel de pétrole brut se situe entre 1 et 80.

II.1.4. Usages du Nickel

Principaux usages dans le Monde (2015).

- Aciers inoxydables (inox) 67%
- Autres alliages ferreux au nickel 7%
- Alliages non-ferreux, superalliages 11%
- Galvanoplastie / nickelage (revêtements de surface) 8%
- Autres usages (batteries, catalyse, chimie, etc.) 7%

Usages des inox :

- Industries alimentaires et ustensiles domestiques 47%
- Chimie, pétrole, énergie 17%
- Bâtiment, construction 15%
- Transport 10%

- Equipement industriel 8%
- Autres 3%

Fiche de synthèse sur la criticité des métaux - Le nickel – Décembre- 2016-P8

II.1.5. Distribution du nickel dans les tissus

La distribution du nickel varie selon la voie d'administration (**Nielsen et al., 1993**). La distribution du nickel après l'exposition des rongeurs par voie orale s'effectue principalement dans les reins, mais aussi au niveau du foie, du cœur, des poumons, du tissu adipeux, du système nerveux périphérique, du cerveau et la moelle osseuse (**Borg et al., 1988**). De plus, chez l'homme le taux de Nickel dans le sérum augmente 2.5 -3 heures après l'ingestion des composés solubles de nickel

II.1.6. Mécanisme d'action de nickel sur les cellules

Une fois entré dans la cellule, les effets du nickel dépendent de sa solubilisation et des doses présentes d'ions Ni^{2+} . (**Hansen et al., 1984**). La capacité de captage par les cellules est directement corrélée à la capacité des dérivés du nickel à élever les taux intracellulaires. Les structures cristallines de Ni 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 hétérochromatiques. Il se forme alors des complexes ADN protéines et des cassures de brins (**Costa et al., 1981**). Une autre interaction est l'inhibition de la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs consécutive à la méthylation de l'ADN et aux modifications structurales de la chromatine (**Lee et al., 1995**). (Figure 06)

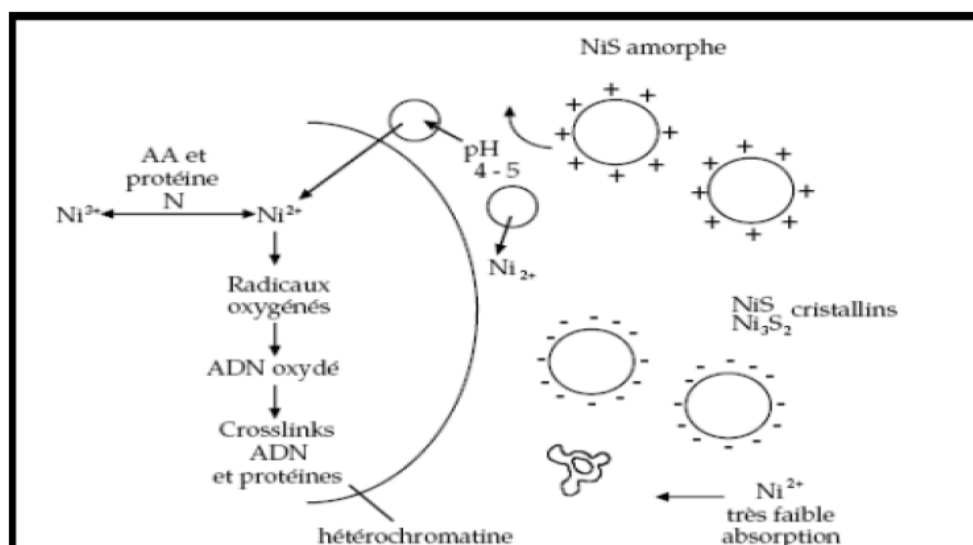


Figure 06: Mécanisme d'action de nickel sur l'ADN (**Snow et al., 1998**).

II.1.7. Effets du Nickel sur l'organisme

L'exposition aux sels de nickel entraîne l'apparition d'effets systémiques sur les reins, le foie, les poumons, la mortalité néonatale et des effets sur le système immunitaire. Le rein et les poumons constituent les principaux organes cibles tant chez l'animal que chez l'homme (Ambrose *et al.*, 1976 ; Dieter *et al.*, 1988 ; Smith *et al.*, 1993).

II.1.8 Présentation de Nanoparticules de Nickel

II.1.9. Définition des nanoparticules métalliques

La particule est constituée de plusieurs atomes. Une particule est dite de taille nanométrique, lorsque sa dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Depuis quelques dizaines d'années, la communauté scientifique s'est beaucoup intéressée à ces objets nanométriques en raison de leurs propriétés physiques et chimiques améliorées ou nouvelles que dans une particule métallique dont la taille est de quelques centaines de nanomètres ou même de tailles micrométriques. La diminution de la taille des nanoparticules entraîne l'augmentation de la fraction d'atomes en surface et de l'énergie spécifique de surface, ainsi que la diminution du paramètre de maille ce qui influe considérablement sur les propriétés physiques du matériau (Wanget *al.*, 2009).

II.1.10. Sources des nanoparticules

Il existe en effet différentes sources de production des nanoparticules :

- Les sources naturelles (incendies, éruptions volcaniques, ...)
- Les sources accidentelles (feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage, ...)
- Les sources industrielles (nanoparticules manufacturées intentionnellement par l'homme) (Ophélie, 2008).

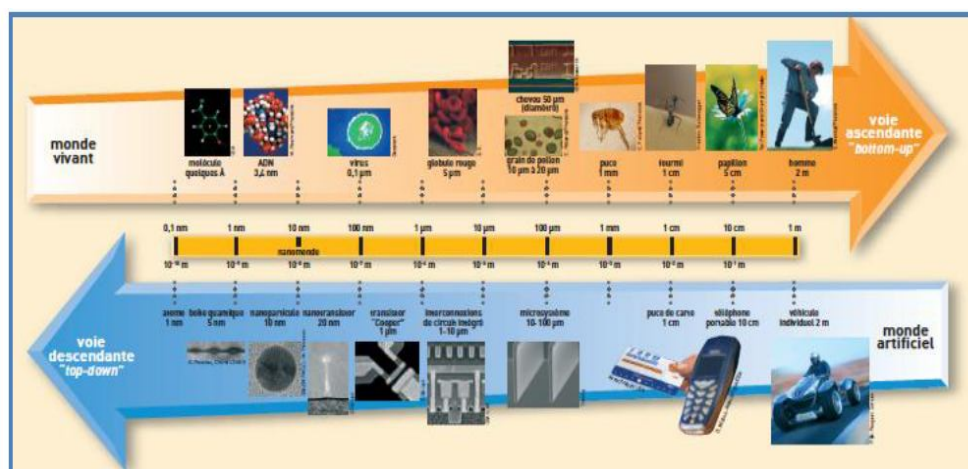


Figure 07 : Positionnement de la taille des nanoparticules sur l'échelle du vivant et des matériaux (Commissariat à l'Énergie Atomique., 2005).

II.1.11. Définition l'oxyde de nickel (NiO)

L'oxyde de nickel connu sous le nom de bunsénite (Taucet *al.*, 1974), c'est un oxyde très acide amélioré à doux. Il se présente sous forme d'une poudre grise verdâtre suivant le mode de préparation, plus ou moins dense et plus ou moins noire. L'oxyde de nickel de type granuleux (oxyde de nickel vert), appelé aussi protoxyde de nickel (Avendanoet *al.*, 2006) L'oxyde de nickel est un matériau de transition métallique et anti fer magnétique, bien étudié qui se constitue des électrodes positives cellules, applications antibactériennes. L'oxyde de nickel présente une sous structure (cubique corps centré, pérovskite, cubique face centré), thermodynamique stabilité, excellente stabilité chimique, le NiO est un matériau anodique et potentiel positive. Ils sont utilisés dans le dispositif électrochromique, la céramique colorante, les piles et des catalyseurs de réaction chimique (Amor *et al.*, 2014).

II.1.12. Propriétés physicochimiques des nanoparticules

Les propriétés physiques et chimiques des nanomatériaux peuvent différer des propriétés du matériau en vrac correspondant en raison d'effets quantiques et de surface qui dépendent de la taille. Le tableau 04 énumère quelques propriétés pertinentes des nanoparticules (Roduner, 2006).

Tableau 04: Évolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique (Luther, 2004).

Propriétés	Exemples
Catalytique	Efficacité catalytique élevée due au rapport surface/volume élevé
Electrique	Augmentation de la conductivité électrique des céramiques et des nanocomposites magnétiques ; Augmentation de la résistance électrique des métaux.
Magnétique	Augmentation de la coersivité magnétique, comportement superparamagnétique.
Mécanique	Augmentation de la dureté et de la solidité des métaux et des alliages, de la ductilité et de la superélasticité des céramiques.
Optique	Changement spectral de l'absorption optique et des propriétés fluorescentes, augmentation de l'efficacité quantique des cristaux semi-conducteurs.-
Stérique	Augmentation de la sélectivité Sphères creuses pour un transport

Partie Bibliographique

	spécifique de médicaments et une distribution contrôlée.
Biologique	Augmentation de la perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques (membrane, barrière épithéliale,...), augmentation de la biocompatibilité.

II.1.13. Synthèse des nanoparticules métalliques

De nombreuses techniques différentes ont été développées pour élaborer des nanoparticules métalliques, il existe deux stratégies générales pour obtenir des matériaux à l'échelle nanométrique (Shenhar *et al.*, 2003). l'une par voie physique et l'autre par voie chimique.

II.1.14. Utilisation

Les nanomatériaux sont actuellement utilisés dans une variété de domaines. De tels matériaux peuvent être employés en électronique, communication, optoélectronique, optique, catalyse, informatique et aussi en médecine pour les diagnostics et la radiologie. Les applications basées sur les propriétés optiques des nanomatériaux comprennent les détecteurs optiques, laser, capteur d'image, les cellules solaire, la photocatalyse...etc. En matière d'environnement, l'utilisation des nanomatériaux est envisagée pour la réduction des émissions de polluants, la purification des gaz et la production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer. Leurs usages en domaine de l'énergie en tant que barrière thermique nanostructurée (les aérogels), cellules photovoltaïques, des accumulateurs électriques et pour stockage de l'hydrogène (les nanotubes de carbone)...etc (Fruchart *et al.*, 2005).

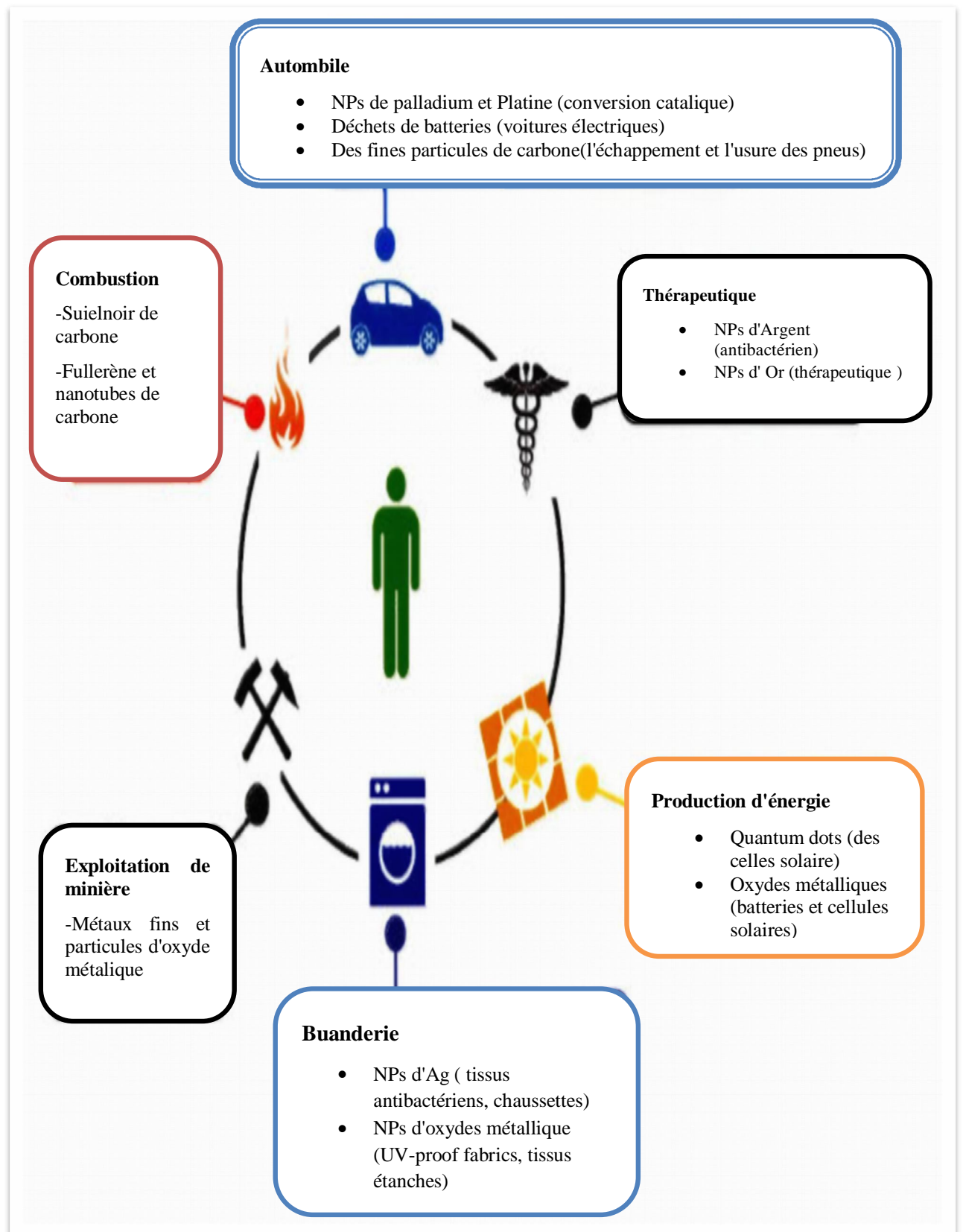


Figure 08 :Utilisation des nanoparticules pour diverses applications (Domingos et al., 2009).

II.1.15. Voies d'exposition

- Exposition aux nanomatériaux de façon directe (cosmétiques, médicaments, emballages alimentaires, textiles, vêtements, etc.) ou indirecte suite à l'usure ou à la dégradation de nanomatériaux et donc à la libération de nanoparticules présentes dans des pneumatiques, encres, textiles, appareils électroniques, carburants, etc.
- Les voies d'exposition potentielles sont l'inhalation, le contact cutané (notamment pour les cosmétiques), l'ingestion et la voie parentérale
- Il n'existe pas encore de quantification de l'exposition de la population générale. Les contaminations sont complexes... mélanges à faibles et moyennes concentrations

Les risques sanitaires des nano-objets09\ 11\P10

II.1.16. Principaux effets toxiques des nanoparticules sur la santé humaine

II.1.17. Voies d'entrée dans l'organisme

L'Homme peut entrer en contact avec les nanoparticules de trois façons : en les touchant (voie cutanée), en les ingérant (voie digestive) ou en les respirant (voie respiratoire).

- **L'appareil respiratoire** : Le dépôt des nanoparticules dans l'appareil respiratoire se fait essentiellement par diffusion (**Witschger et al., 2005**). La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules. Ainsi dans le cas de particules sphériques non agglomérées, l'intensité du dépôt en fonction de leur taille a pu être modélisée dans les différentes régions du tractus respiratoire : la région extra-thoracique (incluant la bouche, le nez, le larynx et le pharynx), l'arbre trachéo-bronchique (qui s'étend de la trachée aux bronches) et la région alvéolaire (constituée des bronchioles terminales et des alvéoles) (**Buzea et al., 2007; Yang et al., 2008**).
- **Le tractus digestif**: Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines : les premières qui peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments, et les secondes qui sont éliminées de l'appareil respiratoire par l'escalier mucociliaire. Seulement quelques études ont été menées sur ce sujet et montrent que les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale (**Janiet et al., 1994; Yamago et al., 1995**). Cependant, comme pour la translocation de la barrière alvéolaire, il existe très certainement des différences

- suivant la nature et la taille des nanoparticules. En effet il a été montré que l'internalisation des nanoparticules par les cellules intestinales dépend de ces deux paramètres (**Win et al., 2005**).
- **La voie cutanée:** Du fait de leur taille réduite, les nanoparticules pourraient avoir plus de facilité à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, en nerfs sensitifs et en cellules dendritiques. Cependant la plupart des études ne montrent pas (**Cross et al., 2007; La demann et al., 1999**) ou ne montrent qu'une faible pénétration de nanoparticules dans l'épiderme mais sans qu'il y ait passage dans le derme lorsque celui-ci est intact (**Alvarez-Román et al., 2004**). Ainsi l'épiderme semble être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanoparticules mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé. En effet quelques études mettent en évidence une pénétration dans le derme : celle-ci serait imputée à des lésions cutanée ou à une ouverture des follicules pileux et non à une diffusion dans l'épiderme (**Mavon et al., 2007; Tinkle et al., 2003**). Le passage ou non des nanoparticules par la peau n'apparaît donc pas clair et est probablement dépendant de leurs caractéristiques. De plus, il reste aussi à déterminer, en cas de pénétration, si les nanoparticules restent localisées dans le derme ou si ils transloquent par le sang ou encore les nerfs sensitifs (**Angélique, 2008**).

II.1.18. Toxicocinétique des nanoparticules après pénétration dans l'organisme.

Afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité des nanoparticules, il est nécessaire de déterminer le devenir de ces éléments dans l'organisme, c'est-à-dire leur cinétique. La cinétique regroupe l'ensemble du processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion).

Dans un premier temps la substance (médicament ou toxique) est absorbée. Cela correspond à son passage dans la circulation sanguine. Elle est ensuite distribuée aux différents organes et peut subir un métabolisme (ou biotransformation) au niveau du foie. Enfin elle peut être éliminée de l'organisme par voie rénale, biliaire ou fécale.

Pour les substances chimiques « classiques », la toxicocinétique peut être prédite par comparaison avec des analogues structuraux. En revanche, pour les nanoparticules, trop peu de données sont disponibles et une étude au cas par cas serait nécessaire afin de déterminer leur devenir dans l'organisme, chaque nanoparticule engendrant des effets différents. Cependant quelques hypothèses peuvent être émises (**Hagenset al., 2007**).

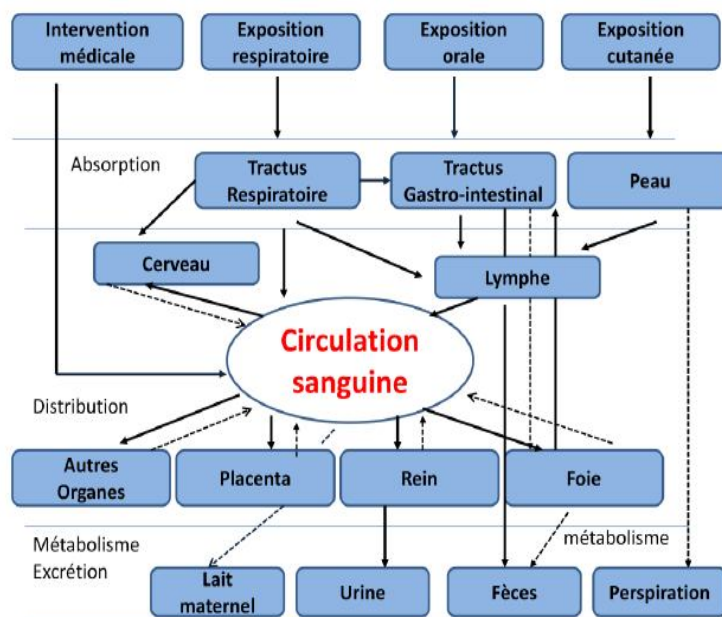


Figure 09 : Cinétique des nanoparticules.

Les flèches pleines représentent les hypothèses confirmées concernant les voies empruntées par les nanoparticules ; les flèches pointillées les voies non démontrées (**Hagenset *all.*, 2007**).

III. Grenade

III.1. Généralité sur la grenade

Le grenadier est un arbre ou arbuste buissonnant de 2,5 m de haut, légèrement épineux, au feuillage caduc et au tronc tortueux (**Lairini *et al.*, 2014**). La grenade, est une baie ronde, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre, très colorée, généralement de couleur rouge vif, à blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbrée ou encore de violet très foncé, selon l'espèce et le degré de maturité du fruit (**Sharrif *et al.*, 2012**). Les graines du fruit, qui constituent la partie comestible, sont enveloppées dans des loges séparées par des cloisons ténues et membraneuses de couleur blanche jaunâtre (**Qnaiset *al.*, 2007**).

III.2. Origine géographique et aire de répartition de la grenade

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 al.*, 2007**).

Partie Bibliographique

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, Fawoleet *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).

III.3. Dénomination communes

Selon Hmid(2013) la nomenclature de Grenadier est :

- Nom scientifique : *Punica granatum*
- Nom français : Grenadier
- Nom anglais : Pomegranate
- Nom espagnol : Granada
- Nom italien : Melograno
- Nom arabe : Roman

III.4. Description botanique

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

Il s'agit d'une baie ronde, cor-tiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutines et dur, de la taille d'unepomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre.Elle est surmontée des restes du calice,formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable. Son péricarpe, coriace et épais, est non comestible. Il forme une écorce dure appelée Malicorium,de couleurblancjaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé et d'un beau jaune àl'intérieur du fruit avec une saveur amère et astringente renferme de nombreuses grainescontenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes cesgraines possèdent un mésocarpe charnuet gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partiecomestible du fruit (Elodie.,2009).



Figure10 : Fruit du *Punica granatum*(Garnier *et al.*, 1961).

III.5. Classification de *Punica granatum*

- Embranchement: Spermaphytes
- Sous-embranchement: Angiospermes
- Classe: Magnoliopsida
- Ordre: Myrtales
- Famille: Punicaceae
- Genre: *Punica*
- Espèce: *Punica granatum*(Spicheger *et al.*, 2004).

Tableau 05 :Composition biochimique de *Punica granatum* (Fournier *et al.*, 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	(Fournier <i>et al.</i> , 1948).

Partie Bibliographique

	• Stérol	
--	----------	--

III.6. L'écorce de grenade

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée « malicorium », il s'agit de la partie dure de fruit. Elle représente environ 50% du poids total de la grenade (**Calinet al., 2005**). Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtre sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient incrustées. Ces fragments sont de consistance coriace, ils sont formés d'un parenchyme de cellules à paroi minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et de faisceaux fibro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente (**Wald, 2009**).

III.7. Composition des écorces de grenade

La concentration en macronutriments des écorces de grenades varie en fonction de plusieurs facteurs (variétés, climat, nature du sol, etc.) ; elle est moins importante que celle rapportée pour le fruit. Selon (**Mirdehghanet al., 2006**), la teneur en K > N > Ca > P > Mg > Na, mis à part le calcium qui est plus abondant dans les écorces ainsi que le sodium qui lui a une teneur équivalente. Pour ce qui est des micronutriments présents dans les écorces de grenade, les teneurs sont équivalentes à celle du fruit et qui sont représentés par le Bore qui représente la plus grande concentration (environ 22,2mg/kg), suivis du Fe (14,5mg/kg). Les minimales concentrations sont notées pour le Zn, le Cu et le Mn (11,75, 8 et 6 mg/kg respectivement).

III.8. Usages thérapeutiques

I.8.1. Prévention des maladies digestives

L'écorce, la peau et les feuilles sont utilisées pour calmer les perturbations gastriques et les diarrhées dus aux problèmes digestifs (**Debjitet al., 2013**). Selon (**Al-Yahya, 2005**), l'extrait aqueux de l'écorce de grenade *Punica granatum* contient des substances qui réduisent la diarrhée par inhibition de la motilité intestinale ainsi que l'accumulation de fluide intestinales. Les écorces du fruit sont utilisées aussi 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 la pharmacopée française depuis 1937 (**Cutrayet al., 2010**).

I.8.2. Propriétés anti-inflammatoire

L'extrait de l'écorce de grenade possède aussi des propriétés anti inflammatoire et anti ulcérigénique (**Ghazalehet *al.*, 2013**).

I.8.3. Activité antioxydante

L'extrait aqueux de l'écorce de grenade est caractérisé par un pouvoir antioxydant. 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**) .

I.8.3. Activité antibactérienne

L'écorce du fruit de *Punica granatum* possède, *in vitro*, une activité antimicrobienne remarquable sur des souches pathogènes tel *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E coli*, et aussi *Candidum geotricum* et *Penicillium expansum*. 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 en alcaloïdes (**Prashanth, 2001**).

I.8.4. Propriété antiseptiques

Une autre étude publiée par (**Al-Saeedet *al.*,2015**), a révélé l'efficacité de l'extrait éthanoïque de l'écorce de grenade dans le traitement des plaies infectées par des champignons chez les lapins, prouvant la propriété antiseptique de l'écorce de grenade. Egalement, l'extrait iso flavonoïdes de l'écorce de grenade peut avoir un effet significatif sur l'amélioration des paramètres reproductifs chez les males des lapins.

III.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 heures. 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 (**SAFIet al.,2017**).

III.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 cancérogène (**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 applications et molécules bioactives est le laboratoire de toxicologie, du département de Biologie.

I.1. Matériels biologique

I.1.1. Matériel végétal

L'étude porte sur l'écorce de grenades (*Punicagranatum*) récoltées au cours du mois d'octobre 2019 dans la région de Hammamet à Tébessa. Les grenades récoltées étaient saines et ne possèdent aucune lésion. 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.



Figure11: (Kumari et al., 2012).

I.1.2. Matériel animal

Dix-huit les souris mâles adultes *Mus musculus* de la souche BALB/Cont 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 deux 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

Partie Pratique

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 noté.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation d'extraits méthanoliques des grenades

I.2.1.1. Protocole d'extraction

Protocole d'extraction Les fruits de grenadier (*Punicagranatum*) sont récoltés le mois d'Octobre 2019 dans la région de Hammamet à Tébessa. L'écorce a été séparée manuellement, séché à l'air libre et à l'abri de la lumière, puis broyé à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine nécessaire à la préparation de l'extrait.

100 g de poudre a été macéré dans 1000ml du méthanol 1: 10 (v / v) pendant 72h à température ambiante, la macération a été répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. L'extrait a été récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, le méthanol est éliminé du filtre par évaporation rotative dans un rotavapor (BÜCHI). L'extrait a été conservé pour l'utilisation ultérieure.



Figure12 : Protocole d'extraction(Photo personnelle)

I.2.1.2. Calcul du rendement

Le rendement en extrait méthanolique a été déterminé par le rapport entre la masse d'extrait obtenu et celle de la matière sèche utilisée selon la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse d'extrait (g)}}{\text{Masse de la matière végétale utilisée (g)}} \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle d'épicarpes

Poids = 300.02

300.02-264.59

R= 35.43 %

I.2.2. Traitement des souris

Les souris ont été réparties en 4 lots de 5 souris chacun sauf le lot témoin contenait 3 souris seulement. Les nanoparticules d'Oxyde de Nickel (nano-NiO) ainsi que l'extrait méthanolique des grenades (EMG) ont été administrés par gavage quotidien pendant 1 mois. Le traitement des souris a été effectué comme suit :

- ✚ **Lots n°1(T)** : ne traitait pas témoins .
- ✚ **Lots n°2(N)**: souris traités par les nano-NiO à une dose de 10 mg/kg de poids (Dumala *et al.*, 2018 ; Dumala *et al.*, 2017)
- ✚ .
- ✚ **Lots n°3(P)**: souris traités par l'EMG à une dose de 500 ml/kg de poids (Snehal *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2009 ; Salwe *et al.*, 2015).
- ✚ **Lots n°4(P+N)**: souris traités par la combinaison des NiO et EMG aux mêmes doses.

I.2.3. Sacrifices et prélèvement du sang et des foies

Après période de traitement de 30 jours, toutes les souris ont été sacrifiées par décapitation. Le sang a été immédiatement collecté dans des tubes EDTA. Ensuite, ces tubes ont subi une centrifugation de 3000 tours/min pendant 15 min afin de récupérer le plasma qui va servir pour déterminer la FNS. Après dissection, les foies ont été récupérés, pesés puis conservés dans un papier aluminium au congélateur à -45°C jusqu'à l'analyse.



Figure 13 : Prélèvement des foies (Photo personnelle)

I.3. Tests comportementaux

Les tests comportementaux visant à évaluer les capacités motrices, cognitives et émotionnelles des souris témoins et ceux soumis aux différents traitements par les nanoparticules de Nickel et l'extrait méthanolique de grenade. Ces tests comportementaux ont été effectués après 30 jours de traitement.

Partie Pratique

Dans la présente étude, une batterie des tests a été effectuée :

- Open-Field (OF),
- Labyrinthe Classique (LC),
- Dark-Light (D-L),
- Piscine de Morris (PM).

L'ensemble des tests a été effectué 05 jours avant le début du sacrifice. Tous les tests ont été réalisés en lumière du jour durant la journée. Le comportement des animaux a été filmé et enregistré à l'aide d'un caméscope.

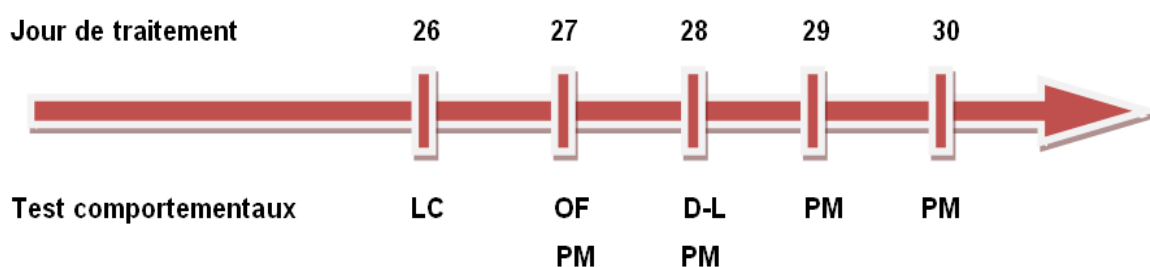


Figure 14 : Planning des tests comportementaux pour l'étude chez la souris

I.3.1. Test d'Open-Field

- **Principe du test**

Le test d'Open-Field permet d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire ainsi que l'état émotionnel de l'animal (Zhang *et al.*, 2007). L'Openfield est caractérisé par les mouvements horizontaux et verticaux des animaux dans la cage d'expérimentation. L'Openfield constitue un environnement stressant pour le souris. Il s'agit en effet d'un animal nocturne qui préfère les espaces confinés, clos et peu éclairés, et est effrayé par les grands espaces, où il va peu au centre et longe les murs (Daubié-Albanese, 2011).

- **Dispositif du Test**

L'Openfield utilisé était une boîte transparente en verre carrée et ouverte (50×50×40cm) (Figure 22).



Figure15 : Dispositif expérimental de l'open-field (Photo personnelle).

- **Procédure**

L'observation des souris commence quelques secondes après l'introduction des souris dans la cage d'observation. Une souris anxieuse évite le centre du terrain qui est ouvert, et reste à la périphérie. Chaque souris était initialement placée dans le coin supérieur gauche (Carré n°1 dans la photo), la tête orientée vers le coin. Son comportement a été observé pendant 3 minutes pour mesurer la distance parcourue, entre chaque essai on nettoie la cage avec l'éthanol 10%.

- **Variabesmesurées**

La variable qui peut être mesurée est le nombre de redressements réalisés par l'animal.

I.3.2. Test de labyrinthe classique

- **Principe du test**

Pour élucider le comportement de mémorisation et d'apprentissage en cas de l'animal stressé, nous avons procédé à la réalisation d'une expérimentation d'anxiété (test de labyrinthe classique) (Jaako-Movits *et al.*, 2005).

- **Dispositif du Test**

Ce test est réalisé dans une enceinte de forme carrée (120x120x35 cm) en plastique comportant plusieurs passages en labyrinthe de taille identique (25x35 cm) de longueur variable selon le croisement, comportant aussi une zone de départ et une autre d'arrivée (figure 23). Ce labyrinthe est déposé sur une table de hauteur 90 cm (Jaako-Movits *et al.*, 2005).

- **Procédure**

Les souris témoins montrent habituellement un passage de courte durée dans le labyrinthe entre le point de départ et celui d'arrivée. Ceci suggère que le comportement d'exploration va se traduire par un temps supérieur passé dans les centres de voies de passages, qui seront considérés comme aversifs ou anxiogènes pour l'animal stressé ; alors que le comportement de fuite va être observé lorsque l'animal passera plus de temps dans le point de départ ou les coins, qui seront associées à un refuge (Ku lliJaako-Movits *et al.*, 2005).



Figure16 : Dispositif expérimental delabyrinthe classique (Photo personnelle)

- **Variabesmesurées**

Pour évaluer le degré d'anxiété des animaux, on mesure le temps passé entre le point de départ et celui d'arrivée en secondes. Ainsi, le principe du test repose sur le fait qu'un animal qui explore plus de temps les coins ou les places de dépôt initial, est considéré comme anxieux. La durée du test est de 10min, et entre chaque essai le labyrinthe est nettoyé avec de l'éthanol 10% (Jaako-Movits *et al.*, 2005).

I.3.3. Test de Piscinede Morris

- **Principe du test**

La piscine de Morris (tenant son nom de Richard Morris qui l'a conçu en 1984), est un dispositif aquatique circulaire très utilisé en neurosciences comportementales pour évaluer la mémoire spatiale du rongeur. Le but de ce test est d'évaluer si les animaux sont capables de s'orienter et de nager rapidement vers une plate-forme, rendue invisible après opacification de l'eau, pour échapper à une situation aversive qu'est l'eau froide en s'aidant de repères visuels (Morris, 1984). Des signaux (plus, moins, points noirs, ...), sont répartis aux alentours de la piscine, pour permettre à l'animal de se diriger vers la plate-forme plus facilement. La position de la plate-forme reste inchangée (Daubié-Albanese, 2011).

- **Dispositif du Test**

Le dispositif adapté au souris est constitué d'un bassin circulaire en plastique, de 50 cm de diamètre et de 30 cm de profondeur, rempli d'eau à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sur une hauteur de 15 cm (Figure 10). L'eau est opacifiée avec du lait en poudre. La plate-forme mesurant 20 cm de diamètre est immergée à 1 cm sous la surface de l'eau et a été placée à équidistance du bord et du centre du bassin. Le bassin est virtuellement divisé en 4 quadrants et la plate-forme est placée au centre du quadrant nord-est. Des formes géométriques (plus, moins, points roses et verts) ont été disposées aux alentours du bassin (nord, est, sud, ouest respectivement), constituent des repères visuels permettant à l'animal de se repérer et de mémoriser l'emplacement de la plate-forme (Daubié-Albanese, 2011).

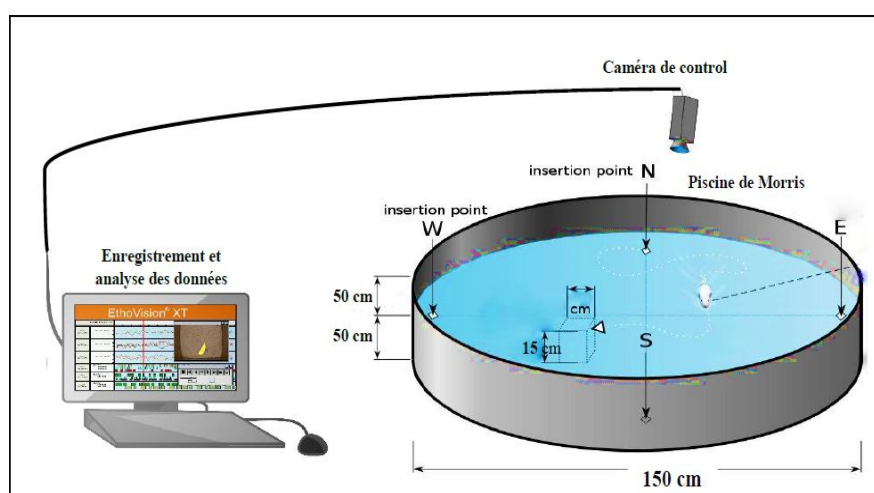




Figure 17 : Dispositif expérimental de **Piscine de Morris** (Gasmi, 2018)

- **Procédure**

Le test a été réalisé sur 4 jours consécutifs d'entraînement suivi d'un test de mémoire. Nous avons commencé le test 5 jours avant le sacrifice des animaux. Dans chaque test, des souris ont été placées dans l'eau pour une durée de nage maximale de 3 minutes. Une fois les souris trouvent la Plateforme, elle y sont maintenue pendant 15 secondes. Si les souris ne trouvent pas la plateforme durant les 3 minutes, le test est terminé. Les souris ont été séchées à l'aide d'une serviette éponge et remis dans sa cage après chaque essai (Daubié-Albanese, 2011).

Vingt-quatre heures après la dernière séance d'entraînement, un test de la mémoire de référence spatiale a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales avec opacification de l'eau (ajout de lait en poudre) pour rendre la plate-forme invisible.

- **Variables mesurées**

Les variables mesurées sont le temps nécessaire en seconde pour atteindre la plateforme (Daubié-Albanese, 2011).

I.3.4. Test de Dark-Light

- **Principe du test**

Le test Dark-light est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les endroits lumineux.

- **Dispositif du Test**

Le dispositif comprend deux compartiments un compartiment sombre (box noire fermé) et un autre lumineux (box blanc ouvert) séparés par une cloison dans laquelle il y a une ouverture centrale.

Partie Pratique

- **Procédure :**

Les souris ont été individuellement placées au milieu du compartiment sombre. Leur comportement est enregistré pendant 5 minutes en prenant en considération le nombre d'entrées dans le compartiment lumineux et le temps passé dans ce dernier.



Figure 18 : Photographie originale du dispositif du test de *Dark light box*. (Photo personnelle)

- **Variables mesurées**

Mesure le nombre d'entrées dans le compartiment lumineux et le temps passé dans le compartiment sombre.

I.4. Dosage des métabolites

Le dosage des différents métabolites (protéines, lipides et glucides) contenus dans le foie des souris a été réalisé selon le procédé de **Shibkoet al. (1966)**. Après broyage et centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn), le surnageant **I** a été récupéré afin de doser les lipides. Le culot **I** quant-à-lui a été récupéré et mélangé avec 1 ml 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 13**).

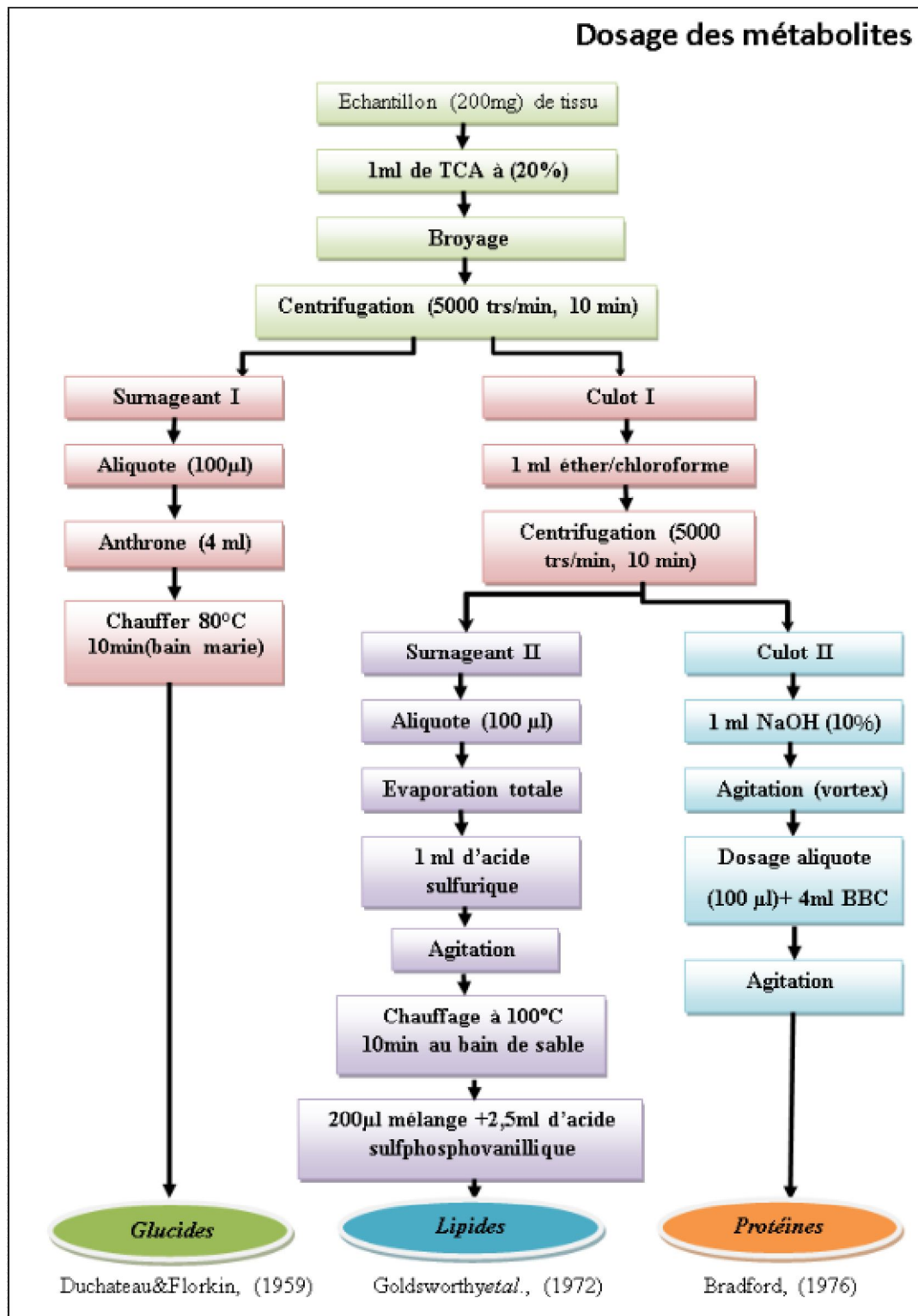


Figure 13 : Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al., 1966).

I.4.1. 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

Partie Pratique

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 bleu de coomassie.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

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

I.4.2. 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 ajoutée 1ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les chauffés un bain marie (100°C pendant 10min) de chaque tube 200µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5ml de réactif.

Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530nm.

I.4.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau *et* Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distille) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard. La méthode consiste à additionner a une fraction aliquote 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml de réactif d'Anthrone. Après chauffage du mélange dans un bain marie à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe, L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la quantité de glucide présent dans l'échantillon.

La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère du glucose (1 mg/ml).

I.5. Détermination de la Formule de Numérotation Sanguine

L'hémogramme ou numération de la formule sanguine (FNS) permet de comptabiliser tous les éléments du sang : globules rouge (hématies), globules blanc (leucocytes) et les plaquettes. Cet examen permettant d'apprécier des paramètres qualitatifs du sang, est l'un des examens biologiques les plus courants prescrit dans le cadre d'un bilan sanguin. Il permet d'évaluer l'état de santé général de l'animal en cas de suspicion d'anémie ou d'infection, ou pour vérifier l'état nutritionnel et l'exposition à des substances toxiques.

L'hémogramme automate est réalisé par l'appareil électro médical (compteur coulteur); il ne demande aucune intervention manuelle pour l'aspiration de l'échantillon. Les dilutions, les mesures ; les calculs, l'affichage et la sortie des résultats. La dilution se fait automatiquement à partir d'un sang total prélevé sur EDTA dans un liquide isotonique et tamponné, dépourvu de particules.

I.6. Analyse statistique

Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage en utilisant Excel.

L'analyse statistique des données est effectuée par le test ANOVA à un seul facteur suivi par le test de Tukey pour la comparaison entre les différents lots entre eux. Cette analyse a été faite grâce au logiciel Minitab (Version 16). Les différences sont considérées comme :

- Significative lorsque ($P < 0,05$).
- Hautement significative lorsque ($P < 0,01$).
- Très hautement significative lorsque ($P < 0,001$).
- Avec p : seuil de signification.

II. Résultats

II.1. Rendement en EMG

La préparation des extraits à partir d'écorces de la grenade a été effectuée par le solvant méthanol. Cette extraction a permis d'obtenir extraits brut : l'extrait méthanolique. Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la poudre d'écorces, le rendement était 35,43%.

II.2. Effets des nano-NiO et del'EMG sur les paramètres de croissance des souris

II.2.1. Effet sur le poids corporel

Les valeurs moyennes du moyennes du poids corporel (mesuré le dernier jour du traitement) chez les souris témoins est traités par le NiO et les EMG sont représentées dans la **Figure 19**. Nos résultats montrent que l'administration de l'EMG ne modifie pas significativement les moyennes du poids comparées aux témoins (30,4 g vs 32 g). En revanche, l'administration des nano-NiO diminue de façon non significative ($p>0,05$) le taux moyen de poids (g) en comparaison avec les souris témoins (29,6 g vs 32 g). La combinaison des EMG et des nano-NiO est associée à une augmentation non significative du poids des souris en comparaison avec les témoins: (34 g vs 32 g respectivement).

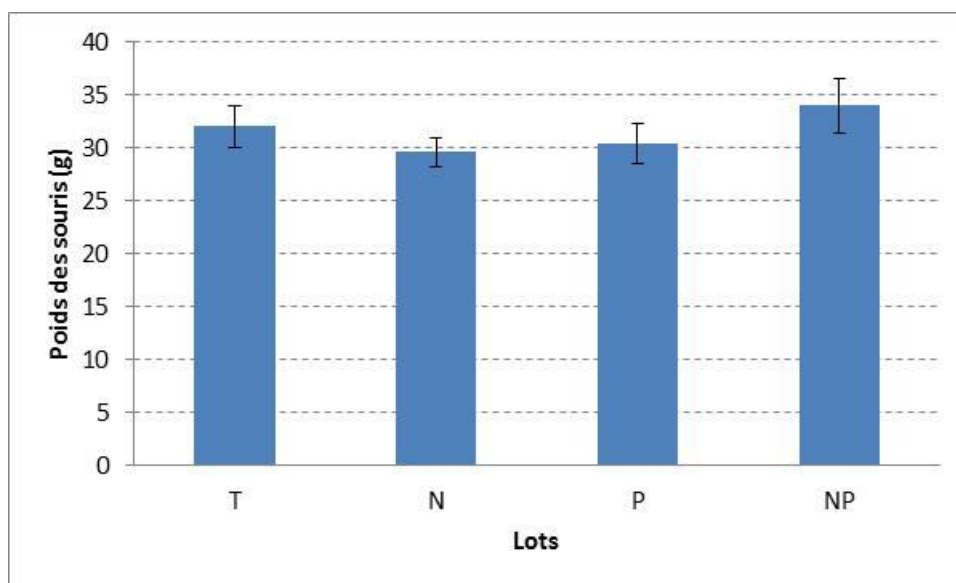


Figure19 : Variations du poids corporel des souris témoins et traités après 30j de traitements.

Le poids est mesuré le dernier jour du traitement.

II.2.1. Effet sur le gain de poids

La figure 20 présente la moyenne du gain de poids enregistré chez les souris témoins est traités par le nano-NiO et l'EMG. Nos résultats montrent que l'administration de nano-NiO diminue significativement ($p<0,05$) la moyenne du gain de poids comparée aux témoins

(2,40 g vs 8,67 g respectivement). L'administration de l'EMG diminue également de façon significative ($p < 0,05$) la moyenne du gain de poids en comparaison avec les souris témoins (4,80 g vs 8,67 g respectivement). Cependant, cette diminution est significativement moins accentuée comparé aux valeurs enregistrées chez le lot traité par la nano-NiO. La combinaison de l'EMG et des nano-NiO est associée à un gain de poids identique à celui du lot traité par l'EMG seul (4,80 g).

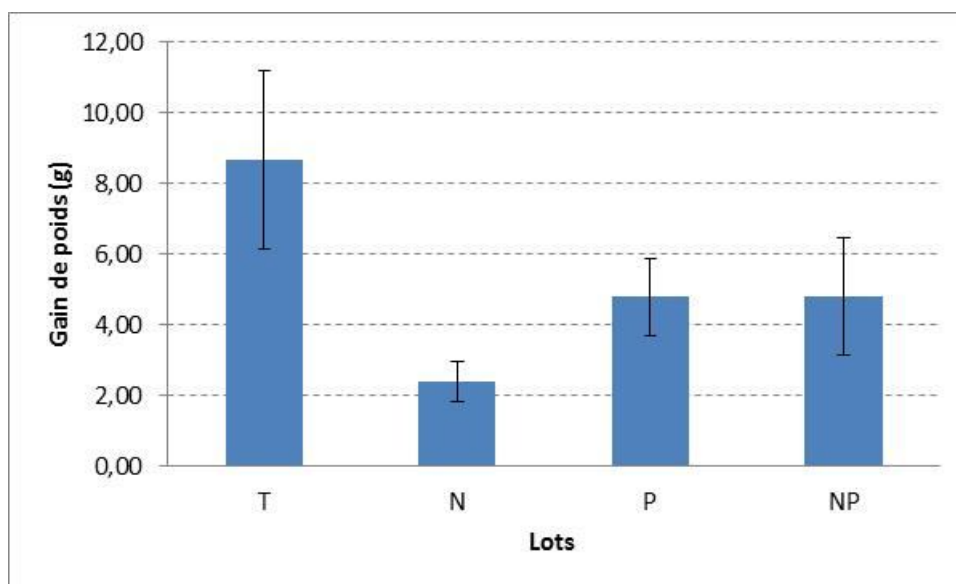


Figure 20 : Variations du gain de poids des souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.2.1. Effets des nano-NiO et de l'EMG sur poids relatif des foies

Les variations des poids moyens des foies des souris témoins et traités sont représentées dans la **Figure 21**. Nos résultats montrent que le poids des foies a significativement augmenté chez les souris traitées par rapport aux témoins surtout pour le lot traité par les nano-NiO (5,10% vs 3,64%). Chez le lot traité par la combinaison de l'EMG et des nano-NiO, le poids des foies reste significativement augmenté en comparaison avec les témoins (5,67% vs 3,64%).

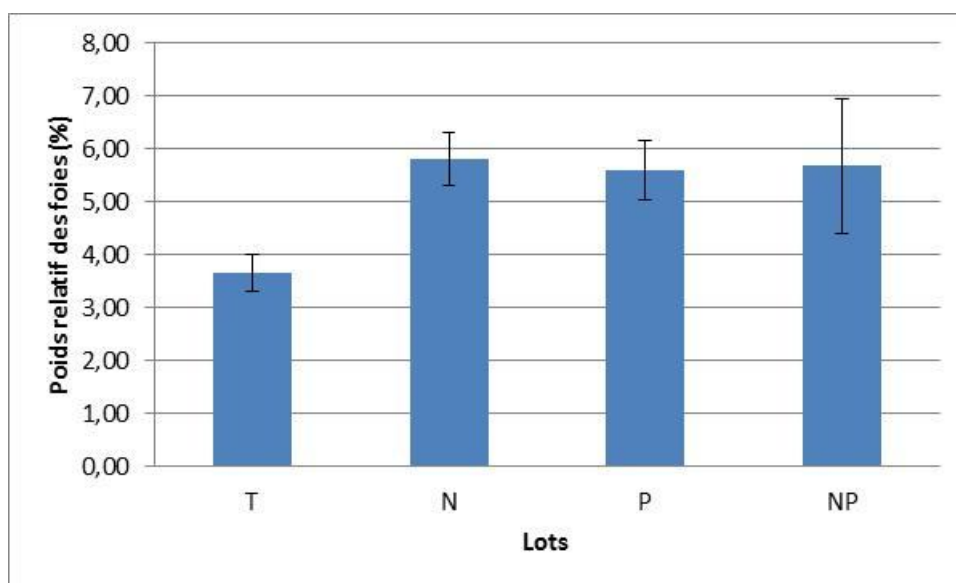


Figure 21 : Variations des poids relatifs des foies chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.3. Effets du nano-NiO et EMG sur les paramètres biochimiques au niveau des foies

II.3.1. Effet sur le taux des protéines hépatiques

La figure 22 représente les variations des taux moyens de protéines chez les souris témoins et traité par le nano-NiO et les EMG. Les résultats de cette étude indiquent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation non significative ($p > 0,05$) du taux du moyen des protéines hépatiques comparée aux souris témoins (1,75mg/L vs 1,22 mg/L respectivement). L'administration d'EMG quant-à-elle ne modifie pas le taux du moyen des protéines hépatiques ($p > 0,05$) par rapport à celui des rats témoins (1,33mg/L vs 1,22 mg/L respectivement). La combinaison d'EMG et du nano-NiO diminue les taux du moyen des protéines hépatiques on comparaison avec le lot traité uniquement par les nano-NiO (1,60mg/L vs 1,75mg/L respectivement).

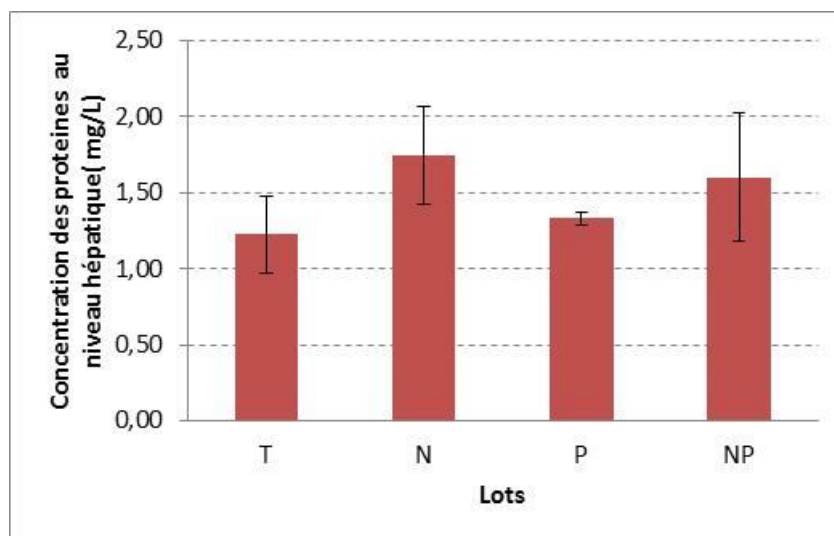


Figure22: Variations concentrations moyennes de protéines au niveau hépatique chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.3.2. Effet sur le taux des lipides hépatique

Les variations du taux moyen de lipides au niveau hépatique chez les souris témoins est traités sont présentées dans la Figure 23. Nos résultat montrent que l'administration des nano-NiO chez les souris provoque une augmentation non significative du taux moyen des lipides hépatiques ($p > 0,05$) par rapport aux souris témoins (1,06 mg/L vs 0,42 mg/L). Par ailleurs, Chez le lot traité par l'EMP, nous n'avons pas enregistré de modification notable en comparaison avec le témoin (0,38 mg/L vs 0,42 mg/L). L'administration des nano-NiO avec l'EMP provoque une augmentation plus accentuée du taux moyen des lipides hépatiques mais elle reste non significative comparée aux témoins (0,75 mg/L vs 0,42 mg/L).

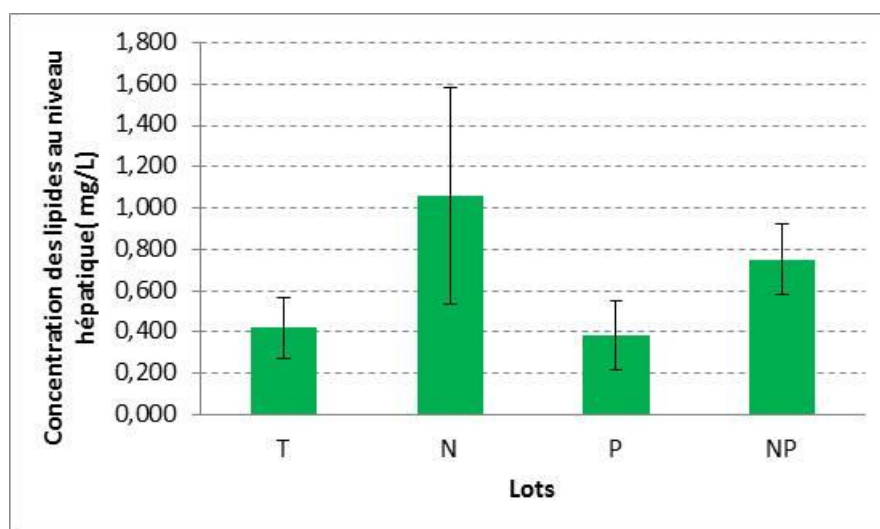


Figure23 : Variations concentrations moyennes de lipides au niveau hépatique chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.3.3. Effet sur le taux des glucides hépatique

Les variations du taux moyen de glucides au niveau hépatique chez les souris témoins est traités sont présentées dans la **Figure 24**. Nos résultats montrent que le taux moyen de glucides au niveau hépatique a augmenté chez les souris traitées par les nano-NiO en comparaison avec les témoins (1091,02 mg/L vs 536,92 mg/L) et le lot traité par l'EMG (1004,86 mg/L vs 536,92 mg/L). Cette augmentation est très hautement significative ($p \leq 0.001$). Par ailleurs, dans le lot traité par la combinaison des nano-NiO et l'EMG, le taux de glucides prend une valeur proche des témoins (700,81 mg/L vs 536,92 mg/L).

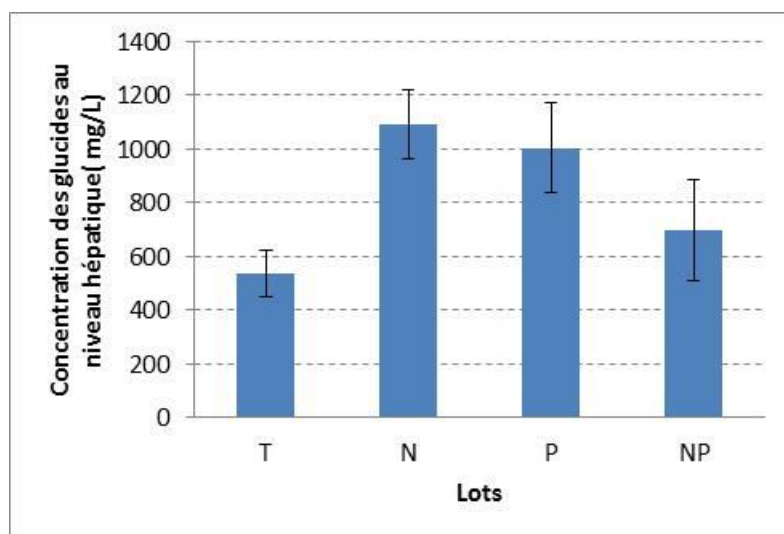


Figure 24: Variations des concentrations moyennes de glucides au niveau hépatique chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.4. Effet des NiO et EMG sur le comportement des souris

II.4.1. Effet sur le test d'Open-Field

Les variations du nombre de redressements effectués par les souris témoins est traités sont présentées dans la **Figure 25**. Nos résultats montrent que l'administration des nano-NiO chez les souris provoque une augmentation non significative du nombre de redressements ($p > 0,05$) par rapport aux souris témoins (39,40 vs 27,67). Par ailleurs, chez le lot traité par l'EMG on a enregistré également une augmentation non significative du nombre moyen de redressements en comparaison avec le témoin (33,20 vs 27,67). L'administration de l'EMG en association avec les nano-NiO provoque une diminution accentuée du nombre moyen de redressements mais elle reste non significative comparée aux témoins (24,40 vs 27,67 s).

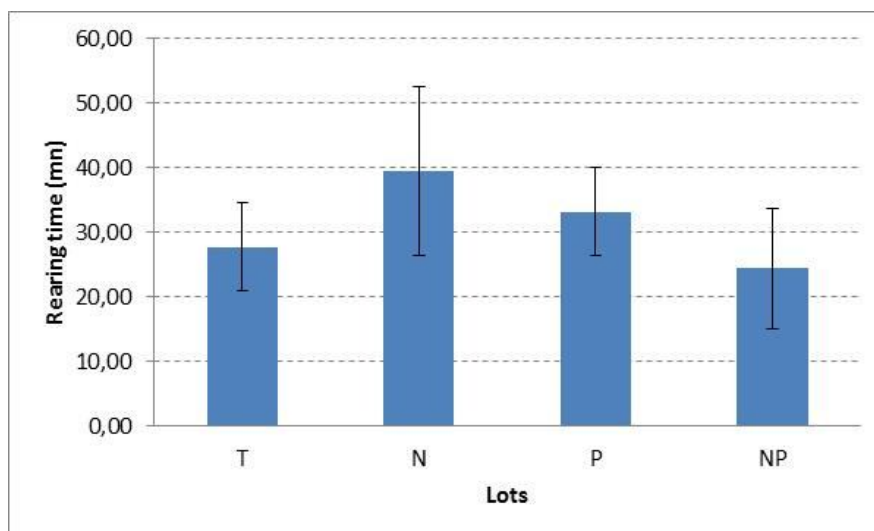


Figure25 : Variations du temps rearing enregistré chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.4.2. Effet sur le test de labyrinthe classique

La figure 26 représente les variations du temps écoulé entre le point de départ et celui d'arrivée chez les souris témoins et traité par les nano-NiO et l'EMG. Les résultats de cette étude indiquent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du temps requis pour arriver au point d'arrivée comparée aux souris témoins (101,40 s vs 36,33 s respectivement). L'administration de l'EMG provoque une augmentation non significative du temps passé dans le labyrinthe comparée aux témoins (50,6 s vs 36,33 s respectivement). La combinaison de l'EMG et des nano-NiO ramène les temps en labyrinthe à des valeurs proches des témoins (52,2 s vs 36,33 s) respectivement.

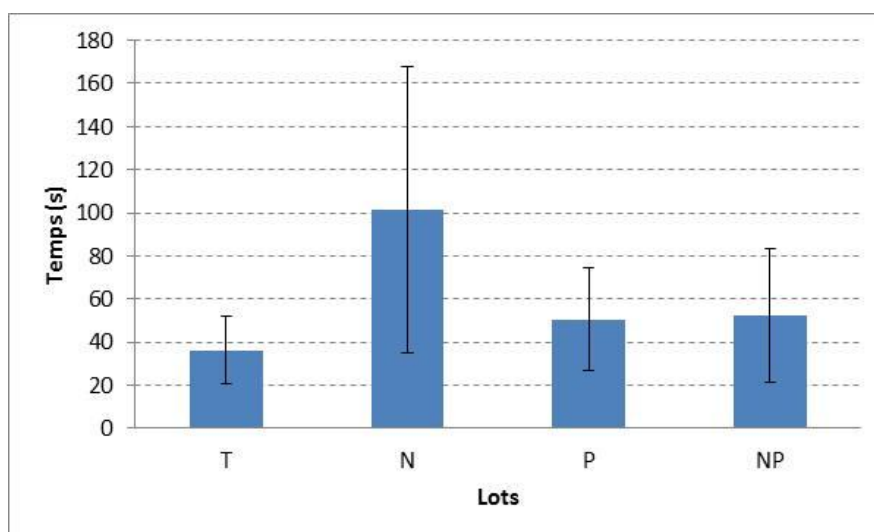


Figure26 : Variations du temps passé dans le labyrinthe classique (s) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.4.3. Effet sur le test de Piscine de Morris

Les variations du taux moyen de temps écoulé (s) pour atteindre la plateforme dans la piscine de Morris chez les souris témoins est traités sont présentées dans **la Figure 27**. Nos résultat montrent que l'administration des nano-NiOprovoque une augmentation non significative du temps moyen de la nage($p>0,05$) par rapport aux souris témoins(28,40s vs 15,66 s).Par ailleurs,chez le lot traité par l'EMP,nous n'avons pas enregistré de modification notable du temps de la nage en comparaison avec le témoin (13,00 s vs 15,66 s). L'administration concomitante des nano-NiO et de l'EMG provoque une augmentation dutemps moyen passé dans la piscine mais elle reste non significative comparée aux témoins (24,80 s vs 15,66 s)

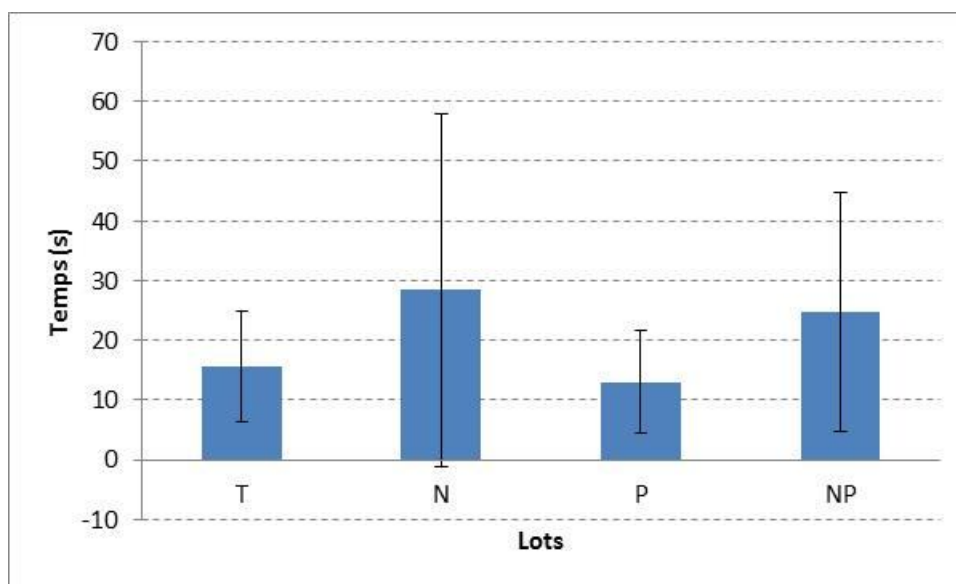


Figure27 : Variationsdu temps passé dans la piscine de Morris (s) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.4.4. Effet sur le test de Dark –Light

Les variations du temps moyen passé dans le box noir(s) chez les souris témoins et traités sont représentées dans **la Figure 28**.Nos résultats signalent une diminution significative ($p<0,05$)dutemps moyen passé dans le compartiment noirchez le lot traités par les nano-NiO comparée aux témoins (302,20 s vs 398,33 s).L'administration de l'EMG est associée à une diminution non significative du temps moyenpassé dans le box noircomparée aux témoins (366,40 s vs 398,33 s). La combinaison de l'EMG et des nano-NiOn'améliore pas le temps passé dans le box noir(308,40 s).

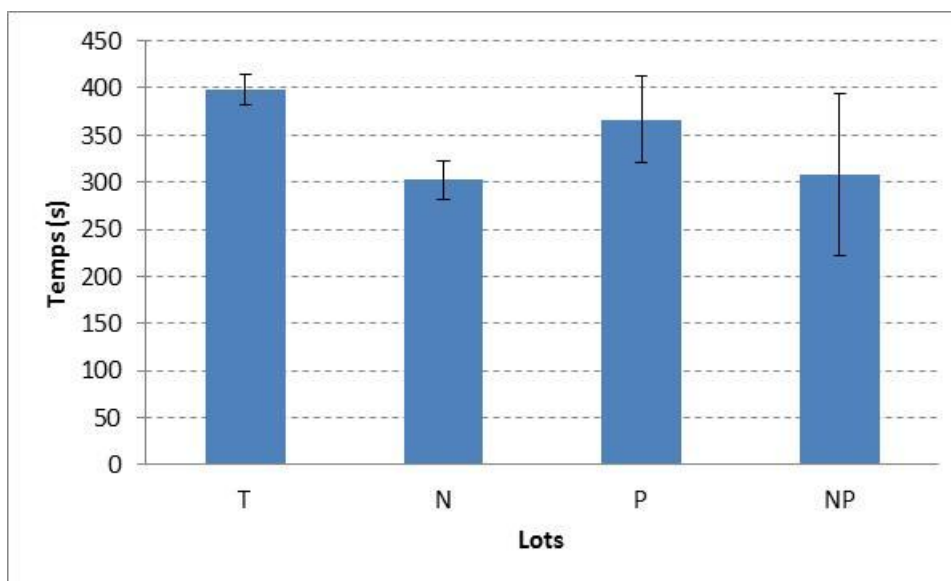


Figure 28 : Variations du temps passé dans le box noir (test Dark-Light) chez les souris témoins et traités après 30j de traitements.

II.5. Effet des nano-NiO et de l'EMG la FNS

II.5.1. Effet sur le taux des globules blancs

Les variations du taux sanguin moyen des globules blancs (WBC) chez les souris témoins et traitées par les nano-NiO et de l'EMG sont représentées dans le **Tableau 01**. Les résultats montrent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation significative ($p > 0,05$) du taux du moyen des globules blancs comparé aux témoins ($13,05 \times 10^9$ vs $6,58 \times 10^9$ cellules/ml respectivement). L'administration de l'EMG quant-à-elle diminue significativement le taux du moyen des globules blancs ($4,60 \times 10^9$ cellules/ml) alors que la combinaison des nano-NiO et de l'EMG ramène les taux des globules blancs à des valeurs proches des témoins ($6,35 \times 10^9$ cellules/ml).

II.5.2. Effet sur le pourcentage des lymphocytes

Le Tableau 01 représente les variations du pourcentage des lymphocytes dans le sang des souris témoins et traitées par les nano-NiO et de l'EMG. Les résultats de cette étude indiquent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation significative du pourcentage des lymphocytes comparé aux témoins ($91,65\%$ vs $75,60\%$). L'administration de l'EMG quant-à-elle ne modifie pas significativement le pourcentage des lymphocytes par rapport à celui des témoins ($79,05\%$ vs $75,60\%$). L'administration de l'EMG en association avec les nano-NiO n'améliore pas le pourcentage des lymphocytes en comparaison avec les souris traitées uniquement par les nano-NiO ($85,05\%$ vs $91,65\%$).

II.5.3. Effet sur le pourcentage des granulocytes

Les résultats montrent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation significative du pourcentage des granulocytes comparé aux témoins (15,70% vs 8,50% respectivement). L'administration de l'EMG seul ou en association avec les nano-NiO quant-à-elle ne modifie pas significativement le pourcentage des granulocytes par rapport aux témoins (9,9% et 10,9% respectivement).

II.5.4. Effet sur le taux des globules rouges

Les résultats indiquent que l'administration des nano-NiO est associée à une augmentation significative du taux du moyen des globules rouges (RBC) comparé aux témoins ($9,50 \times 10^{12}$ vs $7,37 \times 10^{12}$ cellules/ml respectivement). L'administration de l'EMG ne modifie pas significativement le taux du moyen des globules rouges ($8,92 \times 10^{12}$ cellules/ml) alors qu'en cas de traitement combiné par les nano-NiO et l'EMG, le taux des globules rouges reste significativement augmenté par rapport aux témoins ($9,65 \times 10^{12}$ cellules/ml).

II.5.4. Effet sur le pourcentage de l'Hématocrite (HCT)

Nos résultats montrent que la moyenne du pourcentage de l'HCT a diminué chez les souris traitées par rapport aux témoins (**Tableau 01**) surtout pour le lot traité par la combinaison de l'EMG et du nano-NiO (44,2% vs 46,64% respectivement).

II.5.5. Effet sur le taux de plaquettes

Le taux moyen des plaquettes a significativement augmenté chez les lots traités par le nano-NiO comparé aux témoins (887×10^9 vs 479×10^9 plaquettes/ml respectivement) alors que l'administration de l'EMG ne provoque aucun changement significatif du taux des plaquettes (495×10^9 plaquettes/ml). La combinaison de l'EMG avec les nano-NiO diminue significativement le taux des plaquettes en comparaison avec le lot des souris traitées par les nano-NiO (699×10^9 plaquettes/ml) cependant, cette valeur reste quand-même significativement supérieure à celle enregistrée chez les témoins.

Partie Pratique

Tableau06 : Moyenne et écart-types des paramètres de la Formule de Numérotation Sanguine des souris les souris témoins et traités après 30j de traitements

	WBC (x 10 ⁹)	Lym (%)	GRA (%)	Mid (%)	RBC (x 10 ¹²)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (x 10 ⁹)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)
T	6,58 ^a ± 0,20	75,6 ^a ± 3,39	8,5 ^a ± 0,61	6,87 ^a ± 0,95	7,37 ^a ± 1,12	13,90 ^a ± 2,5	46,65 ^a ± 8,74	479 ^a ± 48,27	48,83 ^a ± 5,6	18,93 ^a ± 1,6	301 ^a ± 25,53
N	13,05 ^b ± 0,25	91,65 ^b ± 1,85	15,7 ^b ± 2,90	10,4 ^b ± 2,20	9,50 ^b ± 0,12	14,45 ^a ± 0,2	45,4 ^a ± 0,20	887 ^b ± 19,00	47,95 ^a ± 0,7	15,17 ^b ± 0,4	318 ^a ± 4,00
P	4,6 ^c ± 0,10	79,05 ^a ± 0,55	9,9 ^a ± 1,10	4,8 ^c ± 0,40	8,92 ^a ± 0,79	14 ^a ± 0,1	45,05 ^a ± 1,25	495 ^a ± 28,00	48,75 ^a ± 0,3	15,73 ^b ± 1,2	310 ^a ± 6,51
NP	6,35 ^a ± 0,05	85,05 ^c ± 2,55	10,9 ^c ± 0,40	6,25 ^a ± 1,15	9,65 ^b ± 0,23	13,94 ^a ± 0,2	44,2 ^a ± 0,10	699 ^c ± 99,50	48,00 ^a ± 0,1	14,4 ^b ± 0,2	315 ^a ± 3,00

Les moyennes affectées de lettres différentes dans la même colonne sont statistiquement différentes (p<0,05).

WBC : white bloodcells = globules blanc ; **LYM** : lymphocytes ; **GRA** : granulocytes ; **MID** : autres types de globules blancs ; **RBC** : redbloodcells = globules rouges ; **HGB** : hémoglobines ; **HCT** : hématocrites ; **PLT** : plaquettes ; **MCV** : meancorpuscular volume = volume globulaire moyen ; **MCH** : meancorpuscularhemoglobin = teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; **MCHC** : meancorpuscularhemoglobin concentration = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

III. Discussion

Les travaux en cours ont estimé le NiO Empoisonnement sur un modèle biologique qu'est la gueule et l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait au méthanol de pelures de grenade. Nos résultats seront comparés aux résultats de la littérature, si possible tout au la durée du traitement par voie orale, qui a duré 30 jours. Le premier objectif de cette étude était de déterminer si l'EMG pouvait être toxique pour le foie de NiO, augmenté Système de défense antioxydant chez la souris.

III.1. Rendement en EMG

La lecture de rendement d'extraction méthanolique de l'écorce de grenade montre que le rendement obtenu par l'extrait méthanolique est important avec une valeur de 35.43%. Cette valeur est presque similaire au résultat de **Safi et Banbrahim (2016)** qui a rapporté de rendement en EMPG. de 33,91%. Nos résultats concordent également avec ceux d'une étude précédente (Athmen .2019) qui rapporte un rendement de 28,5%. Par contre, **Douaouri (2017)** enregistré un rendement plus élevée comparativement au nôtre qui a trouvé un rendement de 71,32%.

Selon des études antérieures Il a été rapporté que l'extrait d'écorce contient une teneur élevée en polyphénols, flavinoïdes et tannis condensés. (Lyes .2016).

Tableau: Teneurs d'écorces de la grenade (Lyes .2016).

Antioxydants	Teneur
Composés phénoliques totaux(mg EAG/100g MS)	926,74 ±36,54
Flavonoïdes (mg EQ/100g MS)	625,20±4,19
Tannins condensés(mg EC/100g MS)	174,79 ±14,74

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (Turkmen et *al.*, 2007). Nous avons étudié l'écorce de la grenade car la concentration totale de polyphénols sera la plus importante dans l'écorce de la grenade selon des études antérieures (Seeram et *al.*, 2006; Singh et *al.*, 2002). Nous avons utilisé le méthanol comme meilleur extrait sur la base d'études antérieures (Falleh et *al.*, 2008; Prakash et *al.*, 2010; Yoganandam et *al.*, 2010; SINGH et *al.*, 2002).

III.2. Effets des nano-NiO et de l'EMG sur les paramètres de croissance des souris

III.2.1. Effet sur le poids corporel et le gain de poids

Nos résultats montrent que l'administration des nano-NiO diminue de façon non significative le taux moyen de poids en comparaison avec les souris témoins. Le poids corporel initial de tous les groupes de souris n'était pas significativement différent après 30 jours d'alimentation; le gain de poids corporel était significativement plus faible dans le groupe traité avec NiO par rapport aux autres groupes. Cet état des souris traitées peut être dû au stress externe NiO. Par conséquent, les NiO période. Le changement de poids est une indication générale des effets secondaires (Al-Hilali et al., 2004). Nos résultats sont proches à ceux de Dumala (2019).

Nos résultats montrent que l'administration de l'EMG ne modifie pas significativement les moyennes du poids comparées aux témoins. Cela suggère que l'EMG permet de maintenir un état physiologique des souris (Mukinda et Syc, 2007). Ces résultats ont également été (Athmen, 2019). La combinaison des EMG et des nano-NiO est associée à une augmentation non significative du poids des souris en comparaison avec les témoins. Ces résultats ont émis l'hypothèse que les traitements appliqués peuvent améliorer l'appétit et augmenter la prise de poids (Ashoush et al., 2013).

III.2.2. Effets des nano-NiO et de l'EMG sur poids relatif des foies

Le foie est un organe cible majeur pour la toxicité des xénobiotiques et des médicaments, car la plupart des personnes ingérées par voie orale. La présente étude s'est concentrée sur l'étude du rôle de l'écorce de grenade, contre l'hépatotoxicité induite par NiO et pour trouver son mode d'action possible dans l'hépatoprotection (Ashoush et al., 2013).

Nos résultats montrent que le poids relatif des foies a augmenté de manière significative chez les souris traitées avec EMG et NiO. Cela peut être dû à l'accumulation des deux substances dans le foie. En effet, des recherches expérimentales antérieures ont indiqué la présence d'une accumulation de NiO dans le foie, ce qui engendre une forte activité du métabolisme hépatique à cause de son rôle dans la détoxification (Nwokocha et al., 2011). Le foie est un organe cible pour l'accumulation de NiO (Cherukuri et al., 2006, Yang et al., 2008, Dumala et al., 2017). Une forte accumulation de nickel dans le tissu hépatique peut être associée à la présence de cellules phagocytaires mononuclées. Ces macrophages font partie du réseau endothélial, qui participe à l'isolement du NiO (Horie et al., 2011). Nos expériences ont été approuvées par les recherches précédentes (Dumala et al., 2019).

Nos résultats montrent que le poids relatif des foies a augmenté de manière significative chez les souris traitées avec EMG NOS expliquées résultats sont en accord avec (**Chidambara et al., 2002**) qui ont rapporté que le foie de différents groupes soutenait les effets protecteurs de EMG.

III.3. Effets du nano-NiO et EMG sur les paramètres biochimiques au niveau des foies

Partant du principe que tout type des 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**).

Les nano-NiO ont provoqué une augmentation significative des niveaux de protéines, de lipides et de glucides dans le foie tandis que les niveaux de protéines et de glucides étaient relativement stables chez les souris traitées par l'EMG par rapport aux témoins. Les teneurs en protéines totales est un test souvent utilisé pour mettre en évidence un stress chez un organisme bio indicateur (**Benbouzib, 2012**). Cette augmentation pourrait être due à l'induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation sous l'effet du stress oxydatif produit à la présence de différents composés bioactifs (**Nahidet et al., 2015**). Ce stress oxydatif peut s'expliquer par la survenue d'une interaction NiO avec les protéines et donc interférer avec le mécanisme de défense antioxydant, qui entraîne la génération de ROS (**Schrand et al., 2010**). L'augmentation des taux de lipides et des glucides peut être expliquée par un dysfonctionnement hépatique (**Das et al., 2006**). Ces résultats suggèrent un épuisement du taux de glycogène dans le tissu hépatique en faveur d'une libération de glucose utilisable pour la régénération pour faire face à la situation de stress. Les glucides sont les sources d'énergie primaires et immédiates, en état d'effort des réserves glucidiques sont épuisées pour satisfaire des demandes énergétiques accrues (**Massin et Erginay, 2010**).

Une diminution non significative des taux de lipides chez les souris traitées par l'extrait d'écorce de grenade peut être utilisé expliqué comme agent antidyslipidémique. Il est conclu que l'usine devrait être considéré comme un excellent candidat pour études sur la dyslipidémie (**Sadeghipour et al., 2014**).

Nos résultats ont démontré que diminution non significative des taux de lipides chez le souris traitées par EMG a marqués des effets antihyperlipidémiques. L'extrait de grenade a diminué le cholestérol les, triglycérides, LDL et AP dans les sang tout en augmentant le sérum Les niveaux de HDL (Sadeghipour et *al.*, 2014) donc l'EMG diminue.

La plupart des paramètres biochimiques mesurés avec NiO et EMG ont été augmentés dans leurs concentrations vers le statut normal sain. Cela signifie que la EMG et NiO ont amélioré les bienfaits pour la santé des animaux.

III.4. Effet des NiO et EMG sur le comportement des souris

Ces approches pourraient permettre d'expliquer la physiopathologie des maladies neurodégénératives induites par l'administration de NiO sur un modèle animal et ce dans le but de pouvoir tester des molécules d'intérêt thérapeutique en prévention et/ ou en traitement de ces pathologies. Les différents tests effectués sont bien connus pour évaluer les effets neurotoxiques des corps vitaux.

De nombreux rapports de recherche ont montré que l'exposition au stress a un effet complexe sur l'apprentissage, l'activité locomotive, la mémoire et le développement mental (Rooszendalet et *al.*, 2009 ; Cazakoff et *al.*, 2010 ; Schwabe et *al.*, 2012). Une perturbation comportementale a été observée suite à l'évaluation des différents paramètres liés à la biologie neurocomportementale en appliquant les différents tests chez les rats exposés NiO et EMG afin d'évaluer leur activité locomotrice, émotionnelle, exploratoire, mémorisation et apprentissage.

Cette étude a indiqué que les souris traitées au NiO Pour le test OF, on constate une activité motrice anormale par rapport aux souris témoins. Peut être L'effet de NiO sur le cerveau dans le locus responsable du mouvement (Sana et *al.*, 2018), Ce qui explique le déclin au niveau du cerveau Comme indiqué par une étude précédente (Dumala, 2019).

Pour des tests LC et PM qui sont responsables de évaluation du niveau de mémorisation et d'apprentissage Veux dire faible niveau de mémorisation et d'apprentissage Clairement. Pour un test DL nous avons enregistré une diminution du temps que la souris passe dans la pièce sombre qui Signes d'anxiété (Cylia et Tassadit. 2018 ; Daubié-Albanese, 2011). Chez les souris traitées par EMG, nous avons observé une augmentation de l'activité motrice, du niveau de mémorisation et d'apprentissage par rapport aux témoins. Cela peut s'expliquer par le fait que l'extrait d'écorce de grenade contient des flavonoïdes qui augmentent parfois l'activité motrice. En accord avec plusieurs (Atmaca et *al.*, 2004 ;

Hosseini et *al.*, 2012 ; Manian et *al.*, 2008). Nos résultats sont à l'opposé des résultats précédents (ASMA .2015)

Lors du traitement de NiO avec EMG, nous avons observé une nette amélioration de l'activité motrice ainsi que de la mémorisation et de l'apprentissage. En plus du faible taux d'anxiété chez la souris. Cela peut s'expliquer par les différentes propriétés biologiques de l'extrait de grenade, y compris antioxydantes, anti-radicaux (Jamshidi et *al.*, 2003), ils sont efficaces pour arrêter le processus de destruction du système nerveux, la prévention et le traitement de nombreuses maladies en inhibant les radicaux libres et en protégeant les cellules contre les réactions oxydatives . (Helbecque et *al.*, 2003).

III.5. Effet des nano-NiO et de l'EMG la FNS

Les indicateurs sanguins ont montré une augmentation des niveaux de HGB et de WBC, une diminution des niveaux de HCT. Ces changements dans les ratios de RBC peuvent être dus à une interférence NiO dans le processus de formation des érythrocytes (Morsi *et al.*, 2016) ou d'un autre point de vue, cela peut être dû à des lésions hépatiques associées à l'hypoxie (Enwezor et Saki. 2005). Ce résultat est cohérent avec (AHLEM et RACHIDA .2017). Les résultats de l'augmentation du WBC correspondent aux déclarations précédentes de Dumal 2019. L'augmentation du nombre de globules blancs est une indication de l'activation du système immunitaire de défense interne présent dans le corps (Gui et *al.*, 2011 ; Dumal, 2019) une augmentation des plaquettes explique De son rôle est d'arrêter les saignements par agglutination et formation de bouchons en cas de lésion vasculaire Avec référence correspondante (Lee et *al.*, 2016 ; Abasset *al.*, 2017).

III.6. Effet hépatoprotecteur de l'EMG

En conclusion, la présente étude démontre que l'extrait méthanolique de grenade possède un puissant piégeage des radicaux libres, antioxydant et une activité hépatoprotectrice. L'extrait est capable de protéger contre l'oxydation des dommages aux lipides et aux protéines et aussi de l'augmentation / le maintien des niveaux de molécules antioxydantes *in vivo*. Il est également intéressant d'observer que l'EMG ensemble améliore le fil d'apprentissage de souris intoxiquées par les NiO en réduisant le temps d'atteindre la destination.

L'extrait d'éthanol de la peau a la capacité d'inhiber l'oxydation des graisses sous l'influence des radicaux libres (SEERAM et *al.*, 2006 ; Zaki et *al.*, 2015) indiquent également que l'extrait d'écorce méthanolique a montré une forte activité antioxydante (Nor el Houda .2018)

Partie Pratique

Les données présentées aussi ici indiquent que l'activité antioxydante marquée des extraits de grenade semble être due à la présence de polyphénols, qui peuvent agir de la même manière que les réductones en faisant don des électrons et réagir avec les radicaux libres pour les convertir en un produit plus stable et terminer la réaction en chaîne des radicaux libres. Cela explique les résultats du traitement de mélange EMG avec NiO (SINGH *et al.*, 2002).

Selon Jayaprakasha *et al.* (2003) indique que l'effet réduit des extraits de grenade semble être dû à la présence de polyphénols qui peuvent agir de manière similaire à la réduction en faisant don d'électrons. il a rapporté que l'action antioxydante de la réduction dépendait de la rupture de la chaîne des radicaux libres en faisant donc d'une graine d'hydrogène. On pourrait donc suggérer que ces polyphénols ont une activité antioxydante élevée, probablement en raison de l'action combinée des substances présentes à des concentrations variables et leur capacité élevée à céder des atomes d'hydrogène. De plus, les effets additifs ou synergiques de ces les polyphénols pourraient produire une activité antioxydante plus élevée de l'extrait brut que celui des composés isolés (vonGado, 1997).

Conclusion

Conclusion

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité des nanoparticules de nickel chez les souris mâles *Mus musculus* de la souche BALB/C et d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de l'écorce de grenade. A l'issue de cette étude nous pouvons conclure que :

- Les taux des métabolites biochimiques (glucides protéines et lipides) au niveau hépatique ont augmenté suite à un traitement par les NPs-NiO par rapport aux témoins.
- Les nano-NiO sont à l'origine d'une perturbation significative de comportements des souris avec des signes d'altération de la mémorisation et la locomotion.
- Les nanoparticules d'oxyde de Nickel induisent une hématotoxicité (augmentation de nombre des globules blancs, globules rouges et plaquettes).
- Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de *Rétama sphaerocarpa* établit la plupart des désordres biochimiques et sanguins et améliore le comportement des 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.

Les résultats de cette peuvent être approfondis dans les recherches futures en insistant sur les axes suivants :

- Conduire cette recherche sur d'autres modèles biologiques
- Utiliser d'autres types d'extraits.
- Evaluer les effets d'une exposition chronique sur une période plus longue.
- Approfondir l'état de connaissance en adoptant des techniques récentes au niveau subcellulaire.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

1. AL-Saeed, M.H., Hadi, N.S. 2015. Etude de l'effet des iso flavonoïdes extraits de l'écorce de *Punica granatum* sur la fertilité et les caractéristiques du sperme chez les males des lapins ». Université de Basrah, Iraq.
2. Alvarez R., Naika A., Kalia Y., Guy R., Fessia H., (2004). «Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles». *Journal of Controlled Release*, 99:53–62.
3. Al-Yahya, M.A. 2005. Etudes préliminaires phytochimiques et pharmacologiques de l'écorce de grenade (*Punica granatum* L), *Journal Pakitstanais des Sciences biologiques* 8(3) : 479-481, ISSN 1028-8880
4. Ambrose, A.M., Larson, P.S., Borzelleca, J.F. & Hennigar, G.R. (1976). Long term toxicologic assessment of nickel in rats and dogs. *Journal of Food Science and Technology*, 13, 181-187.
5. Angélique S.D., (2008). «Effets biologiques de nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques». Thèse de doctorat, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), 194P.
6. Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., & Celik, F. (2016). Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemiasalina* in seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(3), 70. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2771-9>
7. Barouki R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *MEDECINE/SCIENCES* ; 22 : 266-72.
8. Bentes de Souza AM, Wang CC, Chu CY, Briton-Jones CM, Haines CJ •& Rogers MS (2004) In vitro exposure to carbon dioxide induces oxidative stress in human peritoneal mesothelial cells. *Hum Reprod* 19, 1281-1286.
9. Berger M. (2006). Manipulation nutritionnelles du Stress oxydant : état de connaissances . *Nutrition chimique et métabolisme* 20 : 48-53.
10. Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats.
11. Blinova, M.I., Iudintseva, N.M., Nikolaenko, N.S., Potokin, I.L., Raykhtsaurn, G.,
12. 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. doi : 10.1016/0378-4274(88)90106-3
13. Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254pp.

Références bibliographiques

14. Buzea C., Pacheco I. I., Robbie K., (2007). «Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity». *Biointerphases*, 2(4):MR17–MR71
15. C. Wang, D. van. Der. Vilet, K. C. Chang, H. Yoo, D. Strmcnik, J. A. Schlueter, N. M. Markovic, V. R. Stamenkovic, (2009). "Monodisperse Pt₃Co Nanoparticles as a Catalyst for the Oxygen Reduction Reaction: Size-Dependent Activity." *Journal of Physical Chemistry C* 113 (45).
16. Calin Sanchez A. et Carboneli Banaching 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 ontioxydant granatum+ et université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne, p.77.
17. Cerda B., Ceron J.J., Tomas-Barberam F.A., Espin J.C., 2003. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and food chemistry* 51m3493-3501.
18. Chen, L., Zhou, L., Liu, Y., Deng, S., Wu, H. et Wang, G. (2012a). Toxicological
19. Chen, X. et Schluesener, H.J. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett*, 176(1), 1-12.
20. Cherukuri, P., Gannon, C.J., Leeuw, T.K., Schmidt, H.K., Smalley, R.E., Curley, S.A. & Weisman, R.B., 2006. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 18882-18886.
21. Chevion M, Berenshtein E & Stadtman ER (2000) Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 33Suppl, S99-108.
22. Christensen, O.B & Lagesson, V. (1981) 'Nickel concentration of blood and urine after oral administration'. *Ann Clin Lab Sci* 11(2), 119-125.
23. 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.
24. Costa, M., Simmons-Hansen, J., Bedrossian, Cwm., Bonura, J. & Caprioli, Rm. (1981). Phagocytosis, cellular distribution and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture. *Cancer Research*, 41(7), 2868-2876.

Références bibliographiques

25. Cross S.E., Innes B., Roberts M. S., Tsuzuki T., Robertson T.A., McCormick P., (2007). «Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation». 148–154.
26. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D & Milzani A (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *ClinChem*52, 601-623.
27. Daubié S, Bisson JF, Lalonde R, Schroeder H, Rychen G (2011). Neurobehavioral and physiological effects of low doses of polybrominated diphenyl ether (PBDE)-99 in male adult rats. *ToxicolLett*, doi:10.1016/j.toxlet.2011.04.009.
28. Daubié-Albanese S. 2011. Toxicité neurocomportementale à court et à long-terme du BDE-99 chez le rat adulte ou en développement. Etude des effets de l'administration quotidienne par voie orale de doses représentatives de l'exposition humaine pendant 90 jours. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. Lorraine, France : 193 p.
29. Debji, B., Harish, G., Pragati Kumar, B., Duraivel, S., Aravind G., Sampath Kumar, K.P. 2013. Utilisations médicinales de *Punica granatum* et ses bénéfices sur la santé. *Journal of pharmacognosy and Phytochemistry*, Volume 1 Issue 5, ISSN : 2278-4136
30. 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 nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environ Sci Technol*, 43(19), 7277-7284.
31. Drobne, D. (2007). Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arh*
32. Drobne, D. (2007). Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arh*
33. *Drug and chemical toxicology*, 36, 296-305.
34. Dumala N., Mangalampalli B., Kalyan Kamal S S., Grover P. 2019. Repeated oral dose toxicity study of nickel oxide nanoparticles in Wistar rats: a histological and biochemical perspective. *JAppl Toxicol*. 1–18pp
35. Dumala N., Mangalampalli B., Srinivasa Sarika K K., Grover P. 2017. Biochemical alterations induced by nickel oxide nanoparticles in female Wistar albino rats after acute oral exposure. *Journal homepage*. 1-29pp
36. Dumala, N., Mangalampalli, B., Chinde, S., Kumari, S. I., Mahoob, M., Rahman, M. F., & Grover, P. (2017). Genotoxicity study of nickel oxide nanoparticles in female Wistar rats after acute oral exposure. *Mutagenesis*, 32(4), 417-427.

Références bibliographiques

37. Dumala, N., Mangalampalli, B., Kalyan Kamal, S. S., & Grover, P. (2018). Biochemical alterations induced by nickel oxide nanoparticles in female Wistar albino rats after acute oral exposure. *Biomarkers*, 23(1), 33-43.
38. E. Avendano, L. Berggren, G.A. Niklasson, C.G. Granqvist, A. Azens, *Electrochromic Ecotoxicology and Environmental Safety*, 84, 155-162.
39. Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Youcefzadi M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of thymus caramanicus et different phenological stages. *Food chemistry*, 110:927-931.
40. effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO₂) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), A152-A153 .PMC.
41. Elodie W. (2009). Le grenadier (*Punicagranatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques écentes. *Faculte de pharmacie, université Henripoincare-Nancy1*.
42. Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. *TEC&DOC-Lavoisier*, Paris, France, 181-182.
43. Favier A. 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64 (6), pp. 390-396
44. Fawole O.A., Opara U.L. Theron K.I. (2011). Chemical and phytochemical properties and antioïdant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa. *Food Bioprocess Technology* <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0533-7>.
45. 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
46. Finaud J, Lac G & Filaire E (2006) Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med* 36, 327-358.
47. GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L ; 2006 -Ressources médicinales de la flore française. -Editions Vigot Frères, 838-842.
48. Gasmi S. 2018. Classic Labyrinth Test for Neurobehavioral Evaluation in Wistar Rats. *Bio-protocol*, Vol 8 (18) : 1-7 pp
49. Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J. 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18 (3): 545p.
50. Grassian, V.H., O' Shaughnessy, P.T., Adamcakova-Dodd, A., Pettibone, J.M. et
51. 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 to titanium dioxide

Références bibliographiques

- nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 195, 365–370.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.055>
52. Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Al. E. What do we (need to) know about the kinetic
53. Han, D., Williams, E., Cadenas, E., *Biochem. J.*, 2001, 353, 411-416.
54. Hansen, K., & Stern, R.M. (1984). 'Toxicity and transformation of nickel compounds in vitro'. In *Nickel in the human environment*. Sunderman F W Jr Fw, Ed. IARC Scientific Publication 193-200.
55. 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. *Tsitologija*, 52(10), 835-843.
56. 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 présentée en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal, Maroc. p. 180.
57. Horie, M., Fukui, H., Nishio, K., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., ... Kinugasa, S. (2011). Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. *Journal of Occupational Health*, 53(2), 64–74. <https://doi.org/10.1539/joh.L10121>
58. Houston MC (2007) The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med* 13, S128-133.
59. Hu Y, Block G, Norkus EP, Morrow JD, Dietrich M & Hudes M (2006) Relations • of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr* 84, 70-76; quiz 266-267.
60. J. Tauc, *Amorphous and Liquid Semiconductors*, Plenum, London, (1974).
61. Jani P., McCarthy D., Florence A., (1994). «Titanium dioxide (rutile) nanoparticles uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration. *International journal of pharmaceutics*». 157–168.
62. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plataras J, Roberts LJ, 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP

Références bibliographiques

- &Barrett JC(2005) Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids,proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free RadieBiol Med* 38, 698-710.
63. 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.
64. Kumari, A., Dora, J., Kumar, A., & Kumar, A. (2012). Pomegranate (*Punica granatum*)—Overview. *Int. J. Pharm. Chem. Sci*, 1, 1218-1222.
65. Kumari, M., Rajak, S., Singh, S.P., Murty, U.S., Mahboob, M., Grover, P. &Rahman, M.F., 2013.
66. Lademann J., Weigmann H.J., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W., (1999). «Penetration of titanium dioxide micro particles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice». 247–256.
67. Lairini, R., Bouslamti, F., Zerrouq et A., Farah. 2014. Valorisation de l'extrait aqueux de l'écorce de fruit de *Punica granatum* par l'étude de ses activités antimicrobienne et antioxydante. *J. Master.Environ. Sci.* 5(S1) : 2314-2318, ISSN : 2028-2508
68. 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.
69. Lee, Y., Klein, C. &Kargalin, B. (1995). Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), 2547–2557. doi:10.1128/mcb.15.5.2547
70. Les risques sanitaires des nano-objets09\ 11\P10
71. Levin G. M. (1994).Pomegranete(*Punicagranatum*) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 97:31-37
72. Li y., Wen S .,Prasad Kota B .,Peng G., Li G Q., Yamahara J ., Roufogalis B D .2005.*Punica granatum* flower extract, a potent glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats.*Journal of Ethnopharmacology* .(99) :239–244pp.
73. Li, Z., Li, P., &Randak, T. (2010). Effect of a human pharmaceutical carbamazepine

Références bibliographiques

74. 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.
75. Luther W., (2004). «Industrial application of nanomaterials-chances and risks. Technical report, Future Technolos Division of VDI Technologiezentrum».
76. M.B. Amor, A. Boukhachem, K. Boubaker, M. Amlouk, Structural, optical and electrical studies on Mg-doped NiO thin films for sensitivity applications, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 27 (2014) 994-1006.
77. Marie –Claude Martini, Monique Siller , Bris Segalowitch.(2006). Actifs et additifs en cosmétologie. édition Lavoisier ; p : 586-811.
78. materials and devices: Brief survey and new data on optical absorption in tungsten oxid and nickel oxide films, *Thin Solid Films*, 496 (2006) 30-36.
79. Matsumoto Y, Ogawa Y, Y oshida R, Shimamori A, Kasai H &Ohta H (2008) The stabilityof the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine (8-OHdG),when stored at room temp'erature. *J Oeeup Health* 50, 366-372.
80. Mavon A., Miquela C., Lejeune O., Payre B., Moretto P., (2007). «In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen».10–20.
81. Mazzola, L. (2003). Commercializing nanotechnology. *Nature biotechnology*,21(10), 1137-1143.
82. Miliauskas. G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A.,2004.Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract.*Food Chemistry* .85:231-237.
83. Mirdehghan S.H. Rahemi M.(2006). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*punicagranatum L.*) fruit.*Scientahorticulturae*. 111: 120-127.
84. Moller P, Wallin H & Knudsen LE (1996) Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *ChemBiollnteraet* 102, 17-36.
85. Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11: 47-60.
86. Morsy, G. M., El-Ala, K. S., & Ali, A. A. (2016). Studies on fate and toxicityof nanoalumina in male albino rats: Some haematological, biochemicaland histological aspects. *Toxicology and Industrial Health*, 32(4),634–655. <https://doi.org/10.1177/0748233713504022>
87. Morton J. (1987). Pomegranate. In: *Fruits of warm climates*. Miami, Florida. p. 352–355.

Références bibliographiques

88. Nanocrystalline electrodes based on nanoporous-walled W03 nanotubes for organic-dye-sensitized solar cells. *Langmuir*, 27(20), 12730-12736.
89. Nickel and nickel compounds. In: Chromium, nickel and welding. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1990, pp. 257–445 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49).
90. Nickel. Geneva, World Health Organization, 1991 (Environmental Health Criteria, No.108).
91. Nwokocha, C. R., Nwokocha, M. I., Owu, D. U., Edidjana, E., Nwogbo, N., Ekpo, U., & Ufearo, C. S. (2011). Estimation of absorbed cadmium in tissues of male and female Albino rats through different routes of administration. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 26(1), 97–101.
92. O. Fruchart, A. Thiaville, C. R. *Phys.*, 6, 921 (2005).
93. on antioxidant responses in brain of a model teleost in vitro: an efficient approach to biomonitoring. *Journal of Applied Toxicology*, 30(7), 644–648. <https://doi.org/10.1002/jat.1534>
94. Pitkin, M. et Pinaev, G.P. (2010). The cultivation of cells on the porous titanium
95. Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de Doctorat d'Université de Toulouse. Toulouse, France : 284 p.
96. Prakash Y G., Ilango K., Sucharita D. April-June 2010. Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punica granatum* L. (Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*. (2):(2): 1260-1263pp
97. properties of nanoparticles in the body? *Regul. Toxicology Pharmacol.* 2007;49:21728.
98. Q. Wang, Q. Sun, J.Z. Yu, Y. Hashi, Y. Kawazoe, *Phys. Lett. A*, 264, 394 (2000).
99. Qnais, E. Y., Elokda, A. S., Abu Ghalyun, Y. Y. et Abdulla, F. A. 2007. Activité anti diarrhée de l'extrait aqueux de l'écorce de *Punica granatum* (Grenadier). *Biologie pharmaceutique*, VOL. 45, No. 9, pp. 715-720
100. R. Shenhar and V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.*, 2003, 36, 549–561.
101. Roduner E., (2006). «Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*». 35, 583-592.
102. Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N & Sunyer J (2008) Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J* 31, 179-197.

Références bibliographiques

103. Sadeghipour A., Eidi M., Kavgani I A., Ghahramani R., Shahabzadeh S., Anissian A. 2014. Lipid Lowering Effect of Punicagranatum L. Peel in High Lipid Diet Fed Male Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-6 pp
- SAFI, A., & BENBRAHIM, R. (2017). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des composés phénoliques d'extrait des écorces de Punica granatum (Grenade).
104. Salwe KJ, Sachdev DO, Bahurupi Y, Kumarappan M, (2015). Evaluation of antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of leaves and fruit peel of Punica granatum in male Wistar albino rats. J Nat Sci Biol Med. 6 (1):56-62.
105. Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A. & Syed, A.F., 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2, 544-568.
106. SEERAM N., SCHULMAN R., et al. - Pomegranates. Ancient roots to modern medicine. Editions Taylor & Francis. 2006. 244 pages.)
107. Selmeçi L, Seres L, Soos P, Székely M & Acsády G (2008) Kinetic assay for the determination of the oxidative stress biomarker, advanced oxidation protein products (AOPP) in the human blood plasma. *Acta Physiol Hung* 95, 209-218.
108. Sharrif Moghaddasi, M. et Haddad Kashani, H. 2012. Composition chimique de la plante Punica granatum L. (Grenadier) et ses effets sur le cœur et le cancer ». *Journal de recherche des plantes médicinales*. Vol. 6(40), PP.5306-5310, ISSN 1996-0875
109. Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratyneck, C., Newhall, A., Freidman, L. 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Analyt. Biochem.*, 19 : 415-428 pp.
110. SINGH R P., MURTHY K N C., JAYAPRAKASHA K G. 2002. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (Punicagranatum) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.* 50:81-86 pp
111. Singh, K., Jaggi, A.S. and Singh, N. (2009), Exploring the ameliorative potential of Punica granatum in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Phytother. Res.*, 23: 1565-1574.
112. Singh, S. P., Kumari, M., Kumari, S. I., Rahman, M. F., Mahboob, M., & Grover, P. (2013). Toxicity assessment of manganese oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 33(10), 1165-1179. <https://doi.org/10.1002/jat.2887>

Références bibliographiques

113. Smith, M.K., George ,E.L., Stober, J.A., Feng ,H.A . & Kimmel, G.L. (1993). Prenatal Toxicity Associated with Nickel Chloride Exposure. *Environmental Research*, 61(2), 200–211. doi:10.1006/enrs.1993.1064
114. Snehal Nitin Mestry, Jayesh Bachu Dhodi, Sangita Balbhim Kumbhar, Archana Ramesh Juvekar,(2017). Attenuation of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats by *Punica granatum* Linn. leaves extract, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, Volume 7, Issue 3 ,Pages 273-280.
115. Solomons, N.W., Viteri, F., Shuler,T.R& Nielsen, F.H. (1982). Absorption and Retention of Nickel from Drinking Water in Relation to Food Intake and Nickel Sensitivity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154(1), 67–75. doi:10.1006/taap.1998.8577
116. Stratil . P.,Klejduš,B et Kouban ,V.,2007.Détermination des composés phénoliques et leurs propriétés antioxydantes. activité dans les fruits et les céréales .*Talanta*,71 :1741- 1751.
117. Sunderman, F. Jr., Hopfer SM., Sweeney, K.R, Marcus, A.H., Most, B.M., & Creason, J. (1989) . Nickel Absorption and Kinetics in Human Volunteers. *Experimental Biology and Medicine*, 191(1), 5–11. doi:10.3181/00379727-191-42881
118. SWAINE, D.J. Nickel in coal and fly ash. In: Nriagu, J.O., ed. *Nickel in the environment*. New York, Wiley, 1980, pp. 67–92. Thome, P.S. (2008). *Titanium Dioxide Nanoparticles: Grassian et al. Respond.*
119. Tinkle S. S., Antonini J. M., Rich B. A., Roberts J. R., Salmen R., DePree K., Adkins E. J., (2003). «Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease».1202–1208.
120. Valko M, Rhodes Cl, Moncol I, Izakovic M & Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
121. Vertuani,S.Angusti,A.Manfredini,S.2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*.Vol 10: 1677-1694.
122. Vincent HK & Taylor AG (2006) Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 30, 400-418.
123. vonGadow, E. Joubert, C.F. Hansmann, Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT, and BHA, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 632–638.
124. Wang Y (2008) Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 21, 276-281. Loft S, Moller P, Cooke MS, Rozalski R & Olinski R (2008)

Références bibliographiques

- Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur J Nutr* 47 Suppl 2, 19-28.
125. Win K.Y., Feng S., (2005). «Effects of particle size and surface coating on, cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs». *26(15):2713–2722*.
126. Witschger O., Fabries J. F., (2005). «Particules ultra-fines et santé au travail. Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. Hygiène et sécurité du travail». 199P.
127. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S., Sueki K., Nakahara H., Enomoto S., Ambe F., (1995). «In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity». 385–389.
128. Yoganandam G P., Ilango K., De S. 2010. Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punicagranatum* L (Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*. (2):(2): 1260-1263pp.
129. Zhang, J., Scardamalia, M., Lamon, M., Messina, R., & Reeve, R. (2007). Socio-cognitive dynamics of knowledge building in the work of 9- and 10-year-olds. *Educational Technology Research and Development*, 55(2), 117–145.
130. Zou Y, Qian ZI, Li Y, Kim MM, Lee SH & Kim SK (2008) Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishigeokamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *J Agric Food Chem*.

Annexes

Annexe 01 : Dosage des protéines.

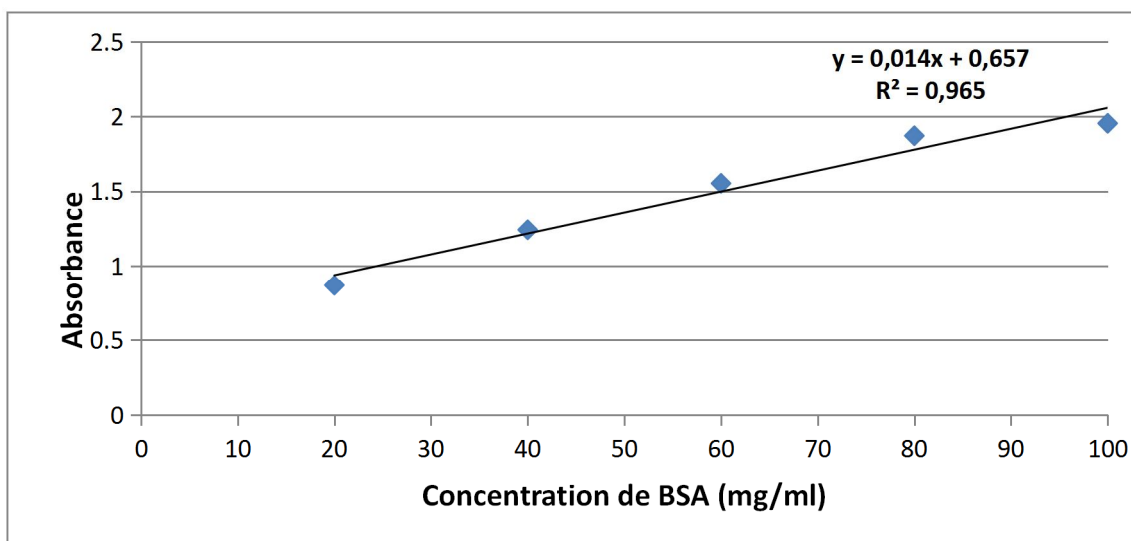


Figure29 : Droite de régression expérimentant les absorbances à 595 nm en fonction de concentration BSA (mg/l) (R^2 : coefficient de détermination).

Annexe 02 : Dosage des lipides.

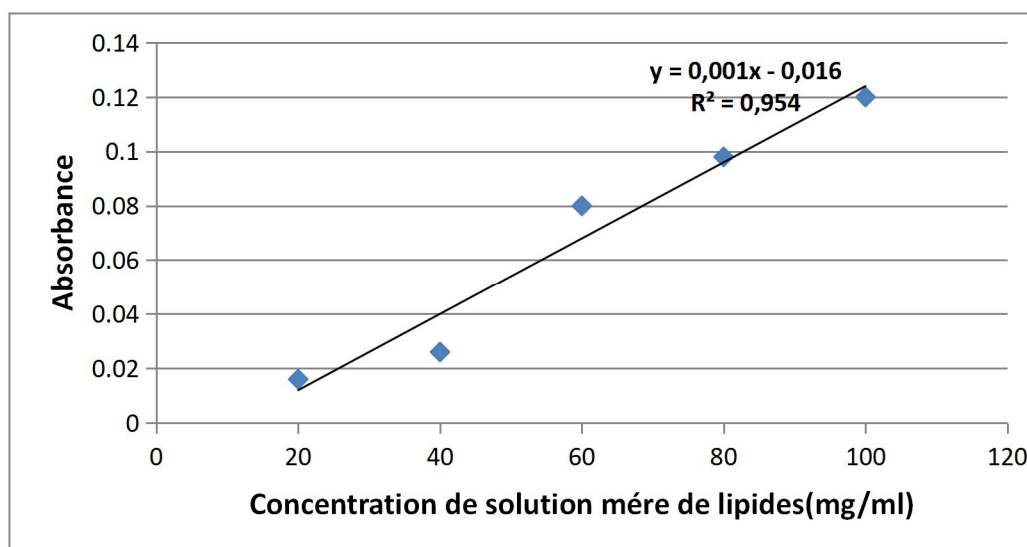


Figure30. Droite de régression exprimant les absorbances à 530 nm en fonction de concentration de solution mère de lipides (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination).

Annexe 03: Dosage des glucides.

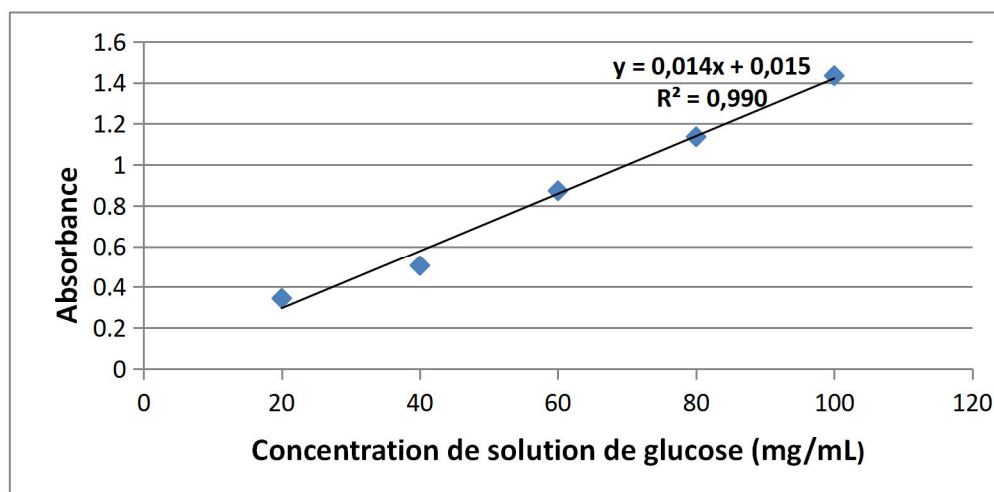


Figure31 : Droite de régression exprimant les absorbances à 620 nm en fonction de concentration de solution de glucose (mg/ml) (R^2 : coefficient de détermination)