



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULATION



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté des sciences

Département de biologie moléculaire et cellulaire

MEMOIRE

Présenté en vue du l'obtention du diplôme de MASTER Académique

Option

Biochimie appliquée

Par : LAHMARI MOUNA et FERHATI LATIFA

Thème :

***CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DE L'EXTRAIT
METHANOLIQUE DE CHARDON MARIE SUR LA TOXICITE
DU NICKEL CHEZ DES RATS WISTAR***

▪ DEVANT LE JURY :

RECHID Rima	Président	Enseignante Faculté des sciences, université de khenchela.
BOUHALIT SAMIRA	Directeur	Enseignante Faculté des sciences, université de khenchela.
DOUAOUIYA Lilia	Examineur	Enseignante Faculté des sciences, université de khenchela.

Année Universitaire : 2013 /2014

Remerciement

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

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre encadreur Mme BOUHALIT

Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de Ce modeste travail.

Nous remercions également tous les membres du jury d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

Nous remercions le chef du laboratoire de polyclinique el-HAMMA pour leur permission de réalisation de la dosage dans leur laboratoire

Nous souhaitons exprimer nos sincères remerciements aux nos collègues M^{elle} SABER ILHAM et LAAOUAR HABIBA pour le dosage Biochimique

Nous remercions la clinique EL BALSEM EL CHAFI et M LAHMARI LAYACHI pour le dosage des paramètres hématologique.

Un remerciement particulier va à nos amis ASMA MEDDOUR et MAARAD NORA qui sans elles nous ne pouvons réaliser l'étude animal.

Nous remercions également M MAARAD FATEH et AIDEL IMAD pour nous aider pour l'obtention des rats de l'institut pasteur d'Alger et aussi CHAHATI SIF EDDIN et leur amis HAROUN pour nous aider au sacrifice des rats.

Un remerciement particulier à ma sœur SALIMA

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

Dédicace

latifa

♥ *A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,* ♥

♥ *j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

♥ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,*

Courage et sécurité. ♥

♥ *A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.* ♥

♥ *A m'enseignante BOUHALIT SAMIRA* ♥

♥ *A mes professeurs* ♥

♥ *A mes très chères sœurs KARIMA et SALIMA* ♥

♥ *A mes frères* ♥

♥ *FAWZI en particulier ,ADEL et son petit enfant ACIL'SOLO'* ♥

♥ *A toute la famille FERHATI* ♥

A toute la promotion de Master « Biochimie Appliquée », année 2013-2014.

♥ *A mes amis* ♥

Dédicace

mouna

♥ *A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,* ♥

♥ *j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

♥ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,*

Courage et sécurité. ♥

♥ *A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses*

encouragements. ♥

♥ *A m'enseignante BOUHALIT SAMIRA* ♥

♥ *A mes professeurs* ♥

♥ *A mes frères* ♥ :

♥ *ABD ESSAMED ,BASSEM et RAMI* ♥

♥ *A toute la famille LAHMARI* ♥

♥ *A mes amis* ♥

♥ *A mon très cher mari ADEL Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma* ♥

♥ *vie, mon âme soeur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes cotés est* ♥

♥ *remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien, ta gentillesse sans* ♥

♥ *égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.* ♥

♥ *Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et* ♥

♥ *que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour* ♥

♥ *sincère et fidèle* ♥.

A toute la promotion de Master « Biochimie Appliquée », année 2013-2014.

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Toxicité du nickel	1
1-Définition :	1
2-Les propriétés de nickel :.....	1
3-Utilisation du Nickel :	3
4-Devenir du nickel dans l'organisme :	3
4-1- Voies d'absorption du nickel :.....	3
4-1-1- Absorption respiratoire :	4
4-1-2- Absorption oral.....	4
4-1-3- Absorption cutanée :	4
4-2- Distribution :.....	5
4-2-1- Exposition respiratoire :	5
4-2-2- Exposition oral.....	5
4-2-3- Exposition cutanée :	5
4-3- Excrétion :	6
5-Toxicité du nickel :	6
5-1- Toxicité aiguë :.....	7
5-2- Toxicité sub-chronique et chronique:.....	8
Effets sur la reproduction et le développement :	9
Reprotoxicité et tératogénèse.....	10

Cancérogénicité :	Erreur ! Signet non défini.
Mutagénicité et génotoxicité du nickel	11
Manifestations allergiques	12
8- Nickel et le stress oxydatif :	13
Chapitre II : Stresse Oxydant et les antioxydants.....	15
1- Stress oxydant.....	15
1-1-Définition du stress oxydant :.....	16
2-les principales formes des radicaux libres.....	16
2-1- Radicaux libres oxygénés (ROS).....	16
2-2-Radicaux libres azotés (RNS)	17
2-3- Radicaux libres soufrés :.....	18
3- principale source de radicaux libres : la mitochondrie.....	18
4-Stress oxydant et ses conséquences biologiques :	21
4-1- Peroxydation lipidique :.....	21
4-2-Oxydation des protéines.....	23
4-3- Oxydation des acides nucléiques	24
5-Les systèmes antioxydants	24
5-1- Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	24
5-2- Les systèmes antioxydants non enzymatiques	26
5-2-1- Les antioxydants endogènes	27
5-2-2-Les antioxydants exogènes.....	27
6- les flavonoïdes comme antioxydants :.....	29
6-1- Structure et classification des flavonoïdes.....	30
6-2- Distribution et localisation des flavonoïdes.....	31
6-3- La biodisponibilité des flavonoïdes	32
6-4- Activité antioxydante des flavonoïdes	33
Chapitre III Chardon marie.....	38
1- Historique :	38
2- Systématique :.....	38
3-Origine :	38
4-Description de la plante :	39
5-Constituants chimiques des graines.....	41
6- Pharmacologie et utilisation de Silybum marianum.....	42

Partie II : Etude Expérimentale

Chapitre IV Matériels et méthodes.....	44
1-Etude phytochimique	44
1-1Matériel végétal :	44
1-2- Tests préliminaires de la composition chimique :	44
a) Saponosides :	44
b) Tanins.....	44
c) Alcaloïdes	44
d) Flavonoïdes :.....	45
1-3- Méthodes de séparation et de purification :.....	45
➤ extraction des Flavonoïdes.....	45
➤ La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)	45
1-4-Analyse quantitative des composés phénoliques :	46
➤ Dosage des composés phénoliques totaux.....	47
1-5- Activité antiradicalaire des flavonoïdes :	47
2-Etude biologique :.....	49
2-1-Matériel animal :	49
➤ Conditions d'élevage :	49
2-2- Méthodologie :.....	49
2-2-1- Protocole experimental :	49
2-2-2- Préparation des prélèvements :	50
2-2-3- Dosage des paramètres biochimique :.....	52
A) Dosage de glucose :.....	52
b) Dosage de cholestérol.....	53
c) Dosage des triglycérides.....	55
d) Dosage de l'urée	56
e) Dosage de la créatinine	58
f) Dosage de la phosphatase alcaline.....	60
g) Dosage de TGO.....	61
h) Dosage de TGP.....	62

2-2-4-Evaluation de la toxicité hématologique	63
2-2-5- Analyse statistique des données.....	64
Chapitre V Résultats et interprétation.....	65
1- Préparation et étude du matériel végétal.....	65
1-1 Rendement massique des extractions.....	65
1-2- Etude phytochimique de l'extrait méthanolique des graines de chardon marie :.....	66
1-2-1-Tests phytochimiques.....	66
1-2-2- Dosage des polyphénols totaux.....	66
1-2-3- L'évaluation de l'activité anti-oxydante (DPPH)	67
1-2-4- Chromatographie sur couches minces (CCM).....	68
2- Partie animale :.....	71
2-1- Etude pondérale :.....	71
2-2- Etude biochimique :.....	73
2-3- Etude hématologique :.....	79
Chapitre VI Discussion :.....	82

Conclusion

Références bibliographiques

Introduction Générale :

Les "métaux lourds" représentent une sérieuse menace pour l'équilibre de la nature et la survie de nombreuses espèces vivantes. Les Risques des métaux lourds sur la santé humaine et animale sont en augmentation (Majolagbe et al., 2010 ; Deka et Sarma, 2012). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 80% des maladies chroniques peuvent être causées, directement ou indirectement, par la pollution environnementale. Parmi les polluants les plus dangereux se trouvent ces fameux métaux lourds.

Le nickel est un polluant environnemental potentiellement carcinogène chez de nombreux animaux ; elles peuvent induire des transformations morphologiques des systèmes cellulaires, des aberrations chromosomiques (Ayo et al, 1998). Les sels de nickel comme les particules de nickel peuvent être allergènes et cancérigènes chez l'homme en formant des radicaux oxygénés. Les radicaux libres peuvent causer des dommages oxydatifs pour les lipides, les protéines et les acides nucléiques et commencer plusieurs conditions pathologiques dans les êtres humains et les animaux (Stengel, 1996).

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

Le Chardon marie (*silybum marianium*) est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des graines de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle. le chardon marie est considéré comme une plante médicinale antique employée pour épurer et protéger le foie, pour traiter les troubles menstruels et les congestions du foie, de la vésicule biliaire et les reins, ainsi que pour stimuler la lactation et la protection des cellules hépatiques lors de la chimiothérapie anticancéreuse (Venkataraman et al., 2000 ; Anderson et al., 2002). L'utilisation de cette plante est rapportée par la littérature depuis le cinquième millénaire avant Jésus-Christ dans le traitement des affections hépatiques par les chinois (Ross, 2008)

Le silymarine a été rapporté comme ayant de multiples activités pharmacologiques, y compris antioxydant, hépatoprotecteur et agent anti-inflammatoire, antibactérien, anti allergique, antimutagène, antiviral, anticancéreux, agents antithrombotiques, et les actions vasodilatatrices (Abascal et Yarnell, 2003). Asghar et al. (2008) ont suggéré que la silymarine

peut être utilisé dans la prévention des maladies aux radicaux libres en tant que supplément diététique antioxydant naturel .

Notre travail a pour but d'explorer l'impact du nickel sur certains aspects pondéraux, biochimiques, et hématologiques. Chez des rats de souche «Wistar », et d'évaluer les effets protectrice de chardon marie, sur le stress oxydatif induit par le nickel, afin d'établir si cette plante médicinale peut protéger contre les effets cytotoxiques du nickel.

1- Généralité :

Le nickel, qui fait l'objet de notre étude, est une substance que l'on retrouve dans le milieu naturel, essentiellement dans les minerais sulfurés extraits des sous-sols et dans les minéraux silicatés se trouvant en surface. Dans l'environnement, le nickel est surtout combiné à l'oxygène (oxyde) et au soufre (sulfures). La croûte terrestre contient environ 0.009 % de nickel dans les minerais sulfurés, arséniurés, antimoniurés, oxydés et silicatés. De plus le nickel est présent dans l'air, dans les particules en suspension, après avoir été rejeté par des activités humaines ou des phénomènes naturels, comme les éruptions volcaniques, les incendies de forêts et les météorites provenant de la haute atmosphère (Duke, 1980a).

Il est présent à de fortes concentrations dans les roches-mères ferromagnésiennes où il se substitue partiellement au fer ou au magnésium. Il est particulièrement abondant dans les minéraux des roches magmatiques basiques et ultrabasiques et dans les minéraux de type serpentine, où il présente des teneurs de l'ordre de 10 000 mg.kg⁻¹ (Baize, 1997).

Le nickel est un métal du sous-groupe VIII de la série des éléments de transition du tableau périodique et le 28ème élément de la table périodique. C'est un métal blanc argent trouvé dans plusieurs états d'oxydation, s'étendant de -1 à +4 (Barceloux, 1999). Cependant, l'état d'oxydation +2 [Le Ni (II)] est la forme la plus commune de nickel dans les biosystèmes (NAS, 1997).

2-Les propriétés de nickel :

Le nickel est généralement divalent (valence 2) ; l'ion trivalent ne se rencontre que dans les complexes. Comme tout les éléments du groupe VIII. Il se caractérise par une masse atomique (58.71g/mol), par une température de fusion élevée(1455°C),une température d'ébullition (2732°C),et une grande densité (à20°C est de 8,902g/cm³),une structure cristalline cubique à face centrée (a=0,352nm).est un élément dur, malléable et bon conducteur de chaleur et d'électricité et des isotopes de 56 à 66, le nickel à l'état naturel est un mélange de 5 isotopes stables (58, 60, 61 ,62 et 64) et de 6 autres instables. La couche électronique 3d est partiellement remplie (6 électrons) cinq sont parallèles et un antiparallèle. Chaque électron porte un moment magnétique, une orientation parallèle d'un

grand nombre de spins donne lieu à l'apparition d'une aimantation spontanée (propriété ferromagnétique) (ouafek, 2007 ; Mouffok, 2008).

Tab.01. Propriétés physiques et chimiques des composés de nickel. D'après Kirk (1981).

	Formule Numéro CAS*	Mas- se mola- ire	Point de Fusion °C	Point d'ébullition °C Sous p. atm.	Densité g/cm ³	Solubilité
Nickel métal	Ni 7440-02-0	58,69	1455	2730	8,9	Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Se dissout lentement dans les acides forts
Oxyde de nickel	NiO 1313-99-1	74,69	1984	–	6,67	Pratiquement insoluble dans l'eau (0,1mg/100ml à 20 °C).soluble dans les acides et dans l'ammoniaque.
Hydroxyde de nickel	Ni(OH) 2 12054-48-7	92,70	230déc.	–	4,15	Très peu soluble dans l'eau (10mg/100ml à 20 °C).soluble dans les acides et dans l'ammoniaque.
Carbonate de nickel	NiCO3 3333-67-3	118,72	déc.	–	2,6	Très peu soluble dans l'eau (10mg/100ml à 20°C).soluble dans les acides.
Carbonate basique de nickel hydrate	2NiCO3, 3NiOH2, 4H2O 65405-96-1	587,57	déc.	–	–	Insoluble dans l'eau. Soluble dans les acides et dans l'ammoniaque.
Chlorure de nickel hexahyd- rate	NiCl2, 6H2O 7718-54-9	237,69	–	–	–	Très soluble dans l'eau (254g/100ml à 20°C).soluble dans l'éthanol et dans l'éthylène glycol.
Nitrate de nickel hexahyd- rate	Ni(NO3)2, 6H2O 13138-45-9	270,79	56,7	136,7	2,05	Très soluble dans l'eau (238g/100ml à 0°C). soluble dans l'éthanol et dans l'éthylène glycol.
Sulfate de nickel hexahyd- rate	NiSO4, 6H2O 7786-81-4	262,84	tr.53, 3	6H2O à 103	2,07	Facilement soluble dans l'eau (65g/100ml à 0°C). soluble dans l'éthanol et le méthanol.

3- Utilisation du Nickel :

Comme de nombreux autres métaux, les applications du nickel à l'état pur sont beaucoup moins importantes que celles sous forme d'alliage avec d'autres composants.

Le nickel métallique est utilisé dans environ 3000 alliages, qui présentent plus de 250 000 applications (Association minière du Canada, 1991), Parce qu'il donne telles propriétés comme résistance de corrosion, résistance à la chaleur, dureté, et forces (ATSDR, 1997).

Les aciers inoxydables au nickel sont employés dans les industries chimiques et alimentaires ainsi qu'en médecine. Les alliages fer-nickel constituent d'importants matériaux dans l'industrie électrique, et les alliages nickel-cuivre furent utilisés dans les pièces de monnaies, la construction des navires. D'autres alliages sont utilisés dans les articles de cuisine, la production de turbine, de machines, armement et des prothèses médicales (ATSDR, 1988 ; USAF, 1990).

L'hydroxyde de carbonate de nickel est utilisé dans le placage et la catalyse, le carbonate de nickel est un important matériau dans la fabrication des composants électriques; le chlorure de nickel anhydre est employé comme absorbant dans certains masques à gaz et dans le nickelage; l'hydroxyde de nickel sert à la fabrication d'électrodes; l'oxyde de nickel est une matière première d'importance en métallurgie, où il est utilisé dans les processus de fusion et de production d'alliages; le sulfate de nickel peut servir de catalyseur ou être employé dans les solutions d'électrolytes et en bijouterie; et le nitrate de nickel est utilisé dans le nickelage et la fabrication de piles au nickel (OMS, 1991).

4-Devenir du nickel dans l'organisme :

4-1- Voies d'absorption du nickel :

Le nickel et ses composés sont absorbés par les voies respiratoires et, dans une moindre mesure, par le tube digestif. En général, l'absorption du nickel augmente proportionnellement à la solubilité des composés, tant après ingestion qu'après inhalation (PISSC, 1991).

4-1-1- Absorption respiratoire :

Des particules inhalées de nickel sont déposées dans les voies respiratoires supérieures et inférieures et sont plus tard absorbées par plusieurs mécanismes. Le modèle de dépôt dans les voies respiratoires est lié à la dimension particulaire, qui détermine le degré auquel des particules sont affectées par impaction, sédimentation, et diffusion à inertie. Grand dépôt de particules (5-30 μ m) dans le secteur nasopharynx où des vitesses de courant d'air et la géométrie plus élevées de voie aérienne favorisent l'impaction à inertie (Gordon et Amdur 1991). De plus petites particules (1-5 μ m) écrivent la trachée et la région bronchioles où ils déposent principalement par sédimentation. Les plus petites particules (<1 μ m) écrivent la région alvéolaire des poumons où la diffusion et la précipitation électrostatique des particules se produit. Le dépôt partiel peut être prévu pour varier considérablement avec l'âge et les modèles de respiration(ATSDR, 2005).

La demi-vie de nickel dans les poumons des rats exposés par inhalation a été signalé à être de 32 heures pour le sulfate de nickel (Hirano et al. 1994b) 4,6 jours pour le sous sulfure de nickel et 120 jours pour l'oxyde vert de nickel (Benson et al. 1994).

4-1-2- Absorption oral :

La quantité de nickel absorbée par l'appareil gastro-intestinal dépend du type d'espèces de nickel dans la nourriture, le contenu et la capacité d'absorption. Normalement, seulement 1-2% de nickel ingéré est absorbé. La prise quotidienne du nickel a estimé qu'est dans la gamme de 35 – 300 μ g par jour (Nielsen et al, 1984). Le sulfate de nickel administré dans l'eau de boisson est plus facilement absorbé que dans la nourriture (Sunderman et al, 1989 ; Ishimatsu et al, 1995).

4-1-3- Absorption cutanée :

Les études humaines prouvent que le nickel peut pénétrer la peau (Fullerton et autres 1986 ; Norgaard 1955). Cette voie est peu significative quantitativement mais importante cliniquement dans la pathogénie de la dermatite de contact (OMS IPCS,1991).

Il ne pourrait pas être déterminé si le nickel ait été absorbé dans les couches profondes de la peau ou dans la circulation sanguine (ATSDR, 2005).

4-2- Distribution :

La distribution du nickel varie selon la voie d'exposition (*PISSC, 1991*), la forme chimique et le temps après exposition (*Coogan et al., 1989*).

4-2-1- Exposition respiratoire :

Les concentrations de nickel sont beaucoup plus élevées dans les poumons que dans le foie et les reins après une exposition par inhalation. (*ATSDR, 1991; PISSC, 1991*).

La muqueuse nasale peut retenir du Ni pendant de nombreuses années (*Torjussen et coll., 1978*).

4-2-2- Exposition oral :

Les niveaux sériques de nickel a atteint un sommet de 2,5 et 3 heures après l'ingestion de nickel (*Christensen et Lagesson 1981; Patriarca et al 1997; Sunderman et al, 1989b*). Dans les travailleurs qui ont ingéré accidentellement de l'eau contaminée par du sulfate de nickel et le chlorure de nickel, le mi-temps moyen de sérum du nickel était de 60 heures (*Sunderman et al 1988*), ce mi-temps a diminué sensiblement (27 heures) quand les travailleurs ont été traités en intraveineuse avec des fluides.

Après absorption par le tube digestif, le nickel est principalement présent dans les reins, mais on en retrouve des quantités appréciables dans le foie, le cœur, les poumons et les tissus adipeux, ainsi que dans les tissus du système nerveux périphérique et du cerveau (*Oskarsson et al., 1979 ; Herlant-Peers et al.,1983*). Une étude de *Dostal et al(1989)* chez le rat suggère que le nickel peut s'accumuler dans le lait maternel.

4-2-3- Exposition cutanée :

Aucune donnée n'a été située concernant la distribution du nickel chez l'homme après exposition cutanée.

Pendant une heure après application de chlorure de nickel à la peau rasée des cobayes, le nickel s'était accumulé dans des secteurs keratinaceous et dans des sacs de cheveux (*Lloyd 1980*). Après 4 heures, du nickel a été trouvé dans le corneum de strate et le spinosum de strate. Pendant vingt-quatre heures après traitement de peau épilée chez les lapins et les cobayes avec nickel-57, la radioactivité a été détectée dans le sang, les reins, et

le foie avec les quantités les plus élevées trouvées dans le sang et les reins (Norgaard 1957).

La dermatite de contact, qui résulte d'une exposition cutanée au nickel, est l'effet le plus fréquent du nickel dans la population générale. Différentes études ont indiqué que l'administration d'une dose unique par voie orale de sulfate de nickel peut entraîner une exacerbation des symptômes de dermatite chez les sujets sensibilisés (ATSDR, 1997). La plus faible dose entraînant une dermatite a été estimée à 0,009 mg de nickel/kg (Cronin *et al.*, 1980). Cependant ces différentes études sont limitées par un certain nombre de facteurs comme le petit nombre de sujets inclus, l'absence de contrôle de la nourriture, l'absence de méthodologie double-aveugle pouvant introduire des biais au niveau des investigateurs.

4-3- Excrétion :

L'élimination de nickel absorbée se produit principalement par l'urine, bien que certains puissent être excrétés en salive, sueur, la bile, les cheveux lait et larmes (Delmotte et al., 2001). Nickel qui n'est pas absorbé à partir de l'appareil gastro-intestinal est excrété dans les fèces (IPCS 1991).

Une partie du nickel absorbé à partir du tractus gastro-intestinal est excrétée dans l'urine et est associé principalement à des complexes de faible poids moléculaire qui contiennent les acides aminés. Il a été rapporté que le nickel fécal est habituellement approximativement 100 fois cela de nickel urinaire (ATSDR, 1988 ; Goyer, 1991). Après l'administration par voie orale de chlorure de nickel à des rats, de 94 à 97 % excrété dans les fèces et de 3 à 6 % dans les urines en 3 jours (Ho et Furst, 1973).

La demi-vie d'élimination urinaire de nickel allant de 20 à 60 heures (Onkelinx et al., 1973 ; Sunderman, 1989 ;Denkhaus et al., 2001).

5-Toxicité du nickel :

Les effets néfastes sur la santé de nickel dépendent de la voie d'exposition (inhalation, voie orale ou cutanée) et peuvent être classés en fonction de période d'exposition aiguë (01 jours), subchronique (10-100 périodes jours), et chronique (100 jours ou plus).

5-1- Toxicité aigue :

Les intoxications aigue par le nickel sont exceptionnelles chez l'homme. Les doses ingérées associées à des effets toxiques étaient très élevées, au-delà de 7mg/kg mc.(Sunderman et al.,1988 ; Sunderman et al.,1989)

Un cas mortel d'intoxication de nickel a été signalé pour une fille de 2 ½ ans qui avait ingéré 15 g de sulfate de nickel (Daldrup et al., 1983) 35. La mort due au syndrome de détresse respiratoire adulte causé par le nickel (ARDS) a été rapportée pour un nickel de pulvérisation de travailleur utilisant un processus d'arc thermique (Rendall et al., 1994)36. Des lésions rénales et une hématurie franches étaient également observée dans la toxicité aiguë de nickel (Clemons et Garcia, 1981) 39. 1005

Des effets toxiques ont été observés chez 35 travailleurs d'installation de galvanisation ayant bu accidentellement de l'eau contaminée par du sulfate et du chlorure de nickel, et de l'acide borique (Sunderman *et al.*, 1988). L'exposition a été estimée entre 7,1 et 35,7 mg de nickel par kg. Les symptômes incluent des nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, maux de tête, sensations d'ébriété et une augmentation transitoire des érythrocytes, de la bilirubine sérique et de l'albumine urinaire(INERIS, 2006).

Le nickel métal et ses oxydes ont une faible toxicité aigue oral. La DL50du nickel chez le rat est supérieure à 2000 mg/kg, celles du monoxyde de nickel et du trioxyde de nickel sont supérieures à 5000 mg/kg chez le rat. Les données de toxicité aigue du nickel par voie oral indiquent que les oxydes de nickel, composés pratiquement insolubles, sont moins toxiques que les formes solubles du nickel(Pichard 2006).Les sels solubles de nickel(p.ex; le dichlorure de nickel le sulfate de nickel, le dinitrate de nickel et le bis (sulfate) de diammonium et de nickel) ont une toxicité aigue qui varie de modérée à très élevée chez le rat (DL50 de 42,5 à 112 mg/kg mc) alors que la poudre de nickel et les sels de nickel insolubles.

5-2- Toxicité sub-chronique et chronique :

Les études chez l'homme (et l'animal) indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel par inhalation. Une augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire a été trouvée chez des travailleurs exposés chroniquement (INERIS, 2006) à des concentrations supérieures à 0,04 mg de nickel/m³, sous forme de monoxyde ou de métal (Cornell et Landis, 1984). Les effets respiratoires étaient de type bronchite chronique, emphysème, diminution de la capacité vitale.

Des cas d'asthme ont été décrits à la suite d'une exposition professionnelle au nickel (Novey *et al.*, 1983 ; Dolovich *et al.*, 1984 ; Shirakawa *et al.*, 1990).

L'ingestion de nickel de façon chronique en quantité importante est associée à un faible poids des bébés à la naissance, à des dermatites et à des dommages cardiaques et hépatiques, en général, ces dommages sont évités si la quantité de nickel métallique consommée ne dépasse pas 0,012 mg/kg/jour (OMS, 1991). La valeur de référence pour une ingestion de composés de nickel (excluant les oxydes de nickel) suggérée par l'Office of Environmental Health Hazard Assessment est de 0,05 mg/kg/jour (INERIS, 2006).

La bronchite chronique, la fibrose pulmonaire et l'atteinte des fonctions respiratoires sont associées à l'exposition chronique au nickel à de fortes doses (INERIS, 2009).

Chez des travailleurs exposés à des composés solubles du nickel (sulfate et chlorure), une concentration moyenne de 0,75 mg de nickel/m³, une élévation des taux urinaires de protéines totales, de β_2 -microglobuline, de retinol binding protein et de N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) chez 12 femmes et de lysozyme urinaire et de NAG chez 14 hommes a été observée (Vyskocil *et al.*, 1994). Ces observations témoignent d'une dysfonction tubulaire.

Chez 38 travailleurs exposés au nickel (composé non précisé), une augmentation significative des IgG, IgA et IgM et une diminution significative des IgE a été observée (Bencko *et al.*, 1983,1986). Par ailleurs, une augmentation significative d'autres protéines sériques pouvant être impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire (α 1-antitrypsine, α 2-macroglobuline, céruloplasmine) a été observée. Ces modifications

suggèrent que le système immunitaire a été stimulé par l'exposition au nickel (INERIS, 2006).

L'exposition chronique (6 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 78 semaines) à des poussières de sous sulfure de nickel (0,97 mg de nickel/m³) a entraîné une augmentation des lésions pulmonaires chez des rats Fisher 344 (Ottolenghi *et al.*, 1974). Les lésions étaient de type pneumonie, atélectasie, bronchite, bronchectasie, emphysème.

Des lésions incluaient une augmentation du poids des poumons, une inflammation et/ou une fibrose des poumons après une exposition chronique de 2 ans des rats et des souris au monoxyde de nickel (0 -2 mg/m³), et sulfure de nickel (0 -0,73 mg/m³), et du sulfate de nickel (0 - 0,11 mg/m³) (NTP, 1996a, 1996b, 1996c).

Une hyperplasie des ganglions lymphatiques bronchiques a été observée avec le monoxyde de nickel (0,5 mg/m³ pour les rats, 1 mg/m³ pour les souris), le sous sulfure de nickel (0,11 mg/m³ pour les rats, 0,44 mg/m³ pour les souris) et le sulfate de nickel (0,11 mg/m³ pour les rats, 0,22 mg/m³ pour les souris) (INERIS, 2006).

Des rats Wistar exposés de façon continue pendant quatre mois par inhalation à 0,025 mg de nickel/m³ (sous forme de monoxyde de nickel) ont présenté une diminution du nombre de macrophages alvéolaires et de la réponse humorale (Spiegelberg *et al.*, 1984).

Après l'administration à des chiens, pendant 2ans, des doses de 3,29 ou 70 mg Ni /kg/jour, Ambrose *et al.*, (1976) observent des retards de développement corporel et des atteintes histologiques au niveau pulmonaire et une augmentation du poids de reins et du foie.

- **Effets sur la reproduction et le développement :**

Il n'existe pas d'études chez l'homme quand aux effets sur la reproduction et le développement du nickel par voie orale ou cutanée (OMS IPCS, 1991 ; ATSDR, 1997). Chez 356 femmes employées dans une raffinerie de nickel, exposées par inhalation à des concentrations de 0,084 à 0,196 mg de nickel/m³ (sous forme de sulfate de nickel), le taux d'avortement spontané était de 15,9 % contre 8,5 % chez des femmes non

exposées (Chashschin *et al.*, 1994). Chez les femmes exposées, le taux de malformations était de 16,9 % contre 5,8 % chez les non-exposées. Les auteurs fournissent un risque relatif de 2,9 pour l'ensemble des anomalies, de 6,1 pour les anomalies du système cardiovasculaire et de 1,9 pour les anomalies musculosquelettiques (INERIS, 2006).

La dégénérescence testiculaire a été observée chez les rats et les souris exposés au sulfate de nickel (>1,4 mg Ni/m³) et sous-sulfure de nickel (>1,83 mg Ni/m³ pour les rats et ; >3,65 mg Ni/m³ pour des souris) 6 h/jour pendant 12 jours (NTP, 1996a, 1996c) 63 - 65. Chez les rats mâles exposés à NiSO₄ à 25 mg/kg, plusieurs changements testiculaires, comme la prolifération cellulaire interstitielle, les parois des vaisseaux de transport, et la réduction du nombre de spermatozoïdes et certaines enzymes testiculaires tels que des stéroïdes 3β hydroxystéroïde déshydrogénase étaient vus (EPA 1985). Das et Dasgupta ont également signalé une diminution du nombre de spermatozoïdes, la motilité des spermatozoïdes, et l'altération de la stéroïdogénèse des rats traités au nickel. L'exposition au nickel élève la peroxydation testiculaire de lipide et supprime les activités enzymatiques antioxydantes dans les rats (Gupt et al. ; 2007). Kakela et al. ont mené une étude pour déterminer les effets reproducteurs du nickel chez les rats Wistar mâles et femelles exposés au nickel à 10-100 ppm NiCl₂ dans l'eau potable. Dans les mâles (exposés 28 ou 42 jours avant la reproduction) NiCl₂ a induit le rétrécissement des tubules séminifères et a diminué le nombre de spermatogonies dans les tubules.

- **Reprotoxicité et tératogénèse :**

On note l'absence d'études chez l'homme quant aux effets du nickel par voie orale, sur la reproduction et sur le développement (*OMS IPCS, 1991 ; ATSDR, 1997*).

L'étude de Jacquet et Mayence (1982) chez les souris montre des effets sur la fertilité des souris mâles.

L'étude de Sunderman et al. (1978) montre que l'exposition à des doses uniques par voie intra musculaire de rat impacte sur la mortalité et le poids des nouveaux nés.

Différentes études menées sur des souris et/ou rats exposés par voie orale (gavage ou ingestion d'eau de boisson) à différentes formes de nickel mettent en évidence l'impact sur la descendance : létalité des nouveaux nés, tailles et poids corporels des nouveaux nés

réduits (SLI, 2000 ; Ambrose et al.,1976). L'étude de Smith et al. (1993), menée sur des rates pendant 11 semaines avant l'accouplement puis pendant 2 périodes successives de gestation et d'allaitement, montre une augmentation de la mortalité foetale.

- **Cancérogénicité :**

(ICNCRM, 1990) l'exposition professionnelle au nickel sulfurés et oxydés aux fortes concentrations cause les cancers des poumons et nasaux selon une étude de comité international de cancérogénicité de Ni chez l'homme (ICNCRM, 1990). Il n'y avait aucune corrélation entre exposition et cancer métalliques de nickel dans le poumon ou le nez. L'exposition de nickel soluble a augmenté le risque de cancer et peut également augmenter le risque lié à l'exposition à moins de composés solubles de nickel. Le Comité a également conclu qu'il y avait aucunes preuves substantielles que les composés de nickel peuvent produire des cancers autres que dans le poumon ou le nez chez les personnes professionnellement exposées.

L'inhalation est une voie importante d'exposition au nickel et à ses sels par rapport aux risques sanitaires. IARC (1990) a conclu que les composés de nickel sont cancérogènes pour l'homme, tandis que nickel métallique est probablement cancérogène pour l'homme.

Un certain nombre d'études épidémiologiques soutenu ces résultats plus tôt (TERA, 1999).

- **Mutagénicité et génotoxicité du nickel :**

Plusieurs études expérimental et épidémiologiques ont montré que le nickel (Ni^{+2}) est génotoxique (Costa et al., 2002 ; Chen et al., 2003b).les mécanismes de cette génotoxicité sont multiples soit par cassures mono brins et double brins de l'ADN pour des très faibles concentrations avec activation de la poly ADP-ribose polymérase qui est normalement induite en présence de lésions dans l'ADN(Cai et Zhuang, 1999 ; Lei et al., 2001) soit par la production d'espèces réactives de l'oxygène tel que le radical hydroxyle,(Chen et al., 2003b ;Costa et al.,2002) ou par inhibition (à des concentration non cytotoxiques de Ni^{+2}) des processus de réparation des lésions de l'ADN causées entre autres par les UV (Haetwig et al., 1994a et 1994b ; Hong et al., 1997 ; Wozniak et Błsiak, 2004 ;Hu et al.,2004).Cette inhibition peut être prévenue par les ions Mg^{+2} (Hong et al.,1997).En conséquence le Ni^{+2}

entraîne une mutation transverse de type CC _ TT qui caractérise la mutagénèse du cuivre et des UV entre autres (Tkeshelashelashvili et al., 1993). La génotoxicité disparaît après élimination du nickel des matrices contaminées la génotoxicité qui lui est liée disparaît,(Montanaro et al.,2005).(Fig. 1)

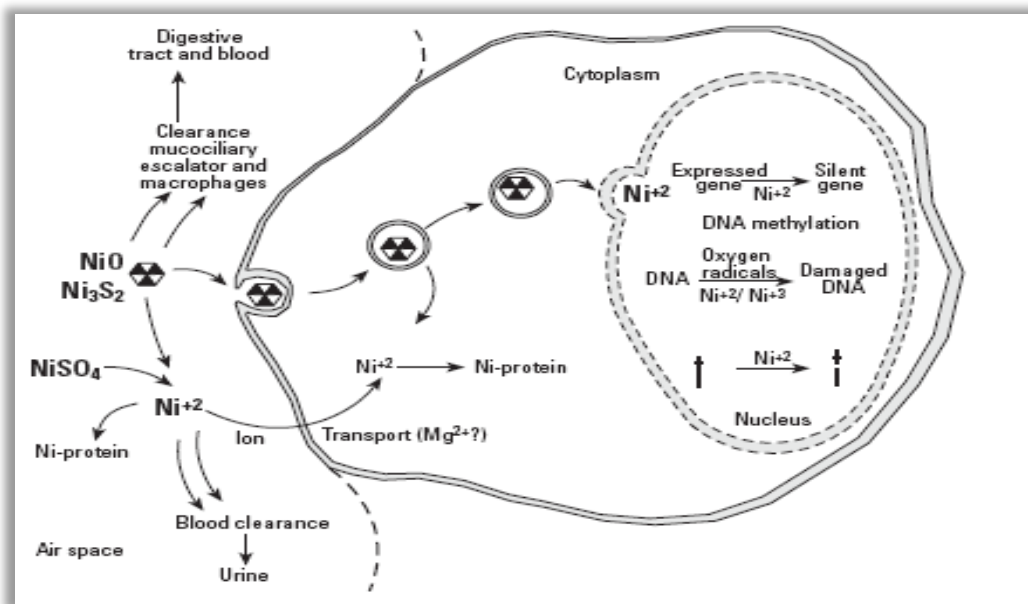


Fig 01: interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchioalveolar du poumon. (Oller et al. 1997).

- **Manifestations allergiques :**

Le nickel est un allergène, responsable de dermatites de contact⁹⁴. Globalement, l'incidence de l'allergie au nickel est de l'ordre de 8 à 14 % dans la population féminine, et de 1% dans la population masculine (UKWIR, 1996).

La contribution spécifique du nickel apporté par l'eau de boisson n'est toutefois pas déterminée. Un certain nombre d'études ont démontré des effets dermiques chez les populations sensibilisés suite à l'ingestion de nickel. Certaines études indiquent que l'ingestion de nickel peut aggraver un eczéma (Haber et al., 2000).

Dans leur travail Haber et *al.* (2000) citent trois études qui fournissent des informations intéressantes sur les doses provoquant un eczéma chez les personnes sensibilisées sans pour autant pouvoir formellement définir un seuil de déclenchement. La majorité des individus, voir tous réagissent au plus fortes dose de nickel testées (soit 2,5 ou 5,6 mg en prise unique). Quelques individus réagissent à des doses de 1,2 mg de nickel. D'autres études rapportent des dermatites de contact observées chez des individus sensibilisés pour des doses uniques de 2,5 mg. Il existe un cas rapporté de manifestations allergiques après contact avec des eaux contenant du nickel à hauteur de 33 à 79 µg/L et décrivant des plaques rouges récidivantes sur le visage d'une jeune femme coréenne de 26 ans dont l'eau –d'origine souterraine – était utilisée pour la boisson et l'hygiène corporelle. La substitution par une eau d'une autre origine s'accompagne d'une régression spontanée et durable des signes cliniques (Lee and Lee, 1990).

La plus faible dose par voie orale, donnée à 15 individus (3 exclus) sensibilisés au nickel et exacerbant un eczéma sur les mains était proche de 4,9 mg, dans le cadre d'un régime alimentaire riche en nickel (Nielsen et al., 1990), soit un équivalent de 8 mg/kg p.c. et 12 mg/kg p.c. via l'eau de boisson ingérée à jeun (Nielsen et al., 1999).

8- Nickel et le stress oxydatif :

Le nickel et d'autres métaux lourds peuvent également produire des radicaux libres directement de l'oxygène moléculaire dans un processus en deux étapes pour produire l'anion de superoxyde. En présence continue du métal lourd, les anions de superoxyde formés peuvent alors combiner avec des protons dans la réaction de dismutation produisant du peroxyde d'hydrogène dans le processus.

Le nickel peut se lier aux enzymes de réparation d'ADN et de produire des radicaux libres de l'oxygène pour provoquer la dégradation des protéines. Ces dommages irréversibles aux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la réplication, la recombinaison et la transcription pourraient être importants pour les effets toxiques de nickel (Lynn et al., 1998).

Des données expérimentales suggèrent que le stress oxydatif peut être important dans la carcinogénèse induite par le nickel, nickel (Ni^{+2}) imiter l'hypoxie et a été utilisé comme un outil pour étudier le rôle de la détection de l'oxygène et cascades de signalisation dans la

régulation de l'expression génique inductible par l'hypoxie. Ce métal peut produire le stress oxydatif; Par conséquent, il est concevable que les ROS puissent déclencher des voies aboutissant à l'activation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF) -1 facteur de transcription et la régulation positive de gènes liés à l'hypoxie signalisation (Das et al., 2008). la substitution de fer par le signal de commutateurs de nickel à l'hypoxie permanente, qui active consécutivement le factor HIF-1(Salnikow et al., 2000). Ni (II) augmente l'oxydation de toutes les bases d'ADN in vitro ((Salnikow et al., 1994) et de peroxydation de lipide in vivo (Coogan et al., 1989). Bien que le nickel (II) par lui-même ne provoque pas efficace la génération de radicaux libres de l'oxygène, H₂O₂ ou des hydroperoxydes lipidiques, la réactivité de Ni (II) avec les dérivés de l'oxygène peut être modulée par chélation avec certain-histidine et contenant de la cystéine-ligands (Shi et al., 1993 et 1992). Les résultats d'une série d'études utilisant des cultures de lymphocytes de sang périphérique humain suggèrent également que le nickel induit un stress oxydatif dans humains (M'Bemba-Meka et al., 2005; M'Bemba-Meka et al., 2007) . Dans une étude in vitro en utilisant des lymphocytes humains, le chlorure de nickel a augmenté la production de peroxyde d'hydrogène et de lipides peroxydation (M'Bemba-Meka et al., 2005). Les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaire, les radicaux hydroxyles et de la peroxydation des lipides et aussi les effets potentiels d'antioxydants ont été examinés.

1- Stress oxydant :

Les espèces oxygénées activées ou ROS sont produites en permanence dans l'organisme, et sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme, état redox physiologique pour l'expression de gènes). Le plus souvent, les ROS-RNS formées subissent une transformation en une autre forme réactive (Figure 1). Ainsi, l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peuvent interagir avec les métaux de transition (fer, cuivre) pour générer des radicaux hydroxyles OH (Fenton). De même, NO° se combine aisément avec $O_2^{\circ-}$ pour former le peroxyde nitrosé $ONOO^-$, agent non radicalaire à la fois oxydant et nitrosant. Grâce à la présence d'antioxydants, il existe un équilibre physiologique subtil entre la production et l'élimination des ROS et RNS. Les cellules vasculaires sont dans un état redox basal. Cet équilibre peut être rompu sous l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyper-LDLémie, hypertension, diabète...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme...), (Peynet J et al 2005) conduisant à un stress oxydant.

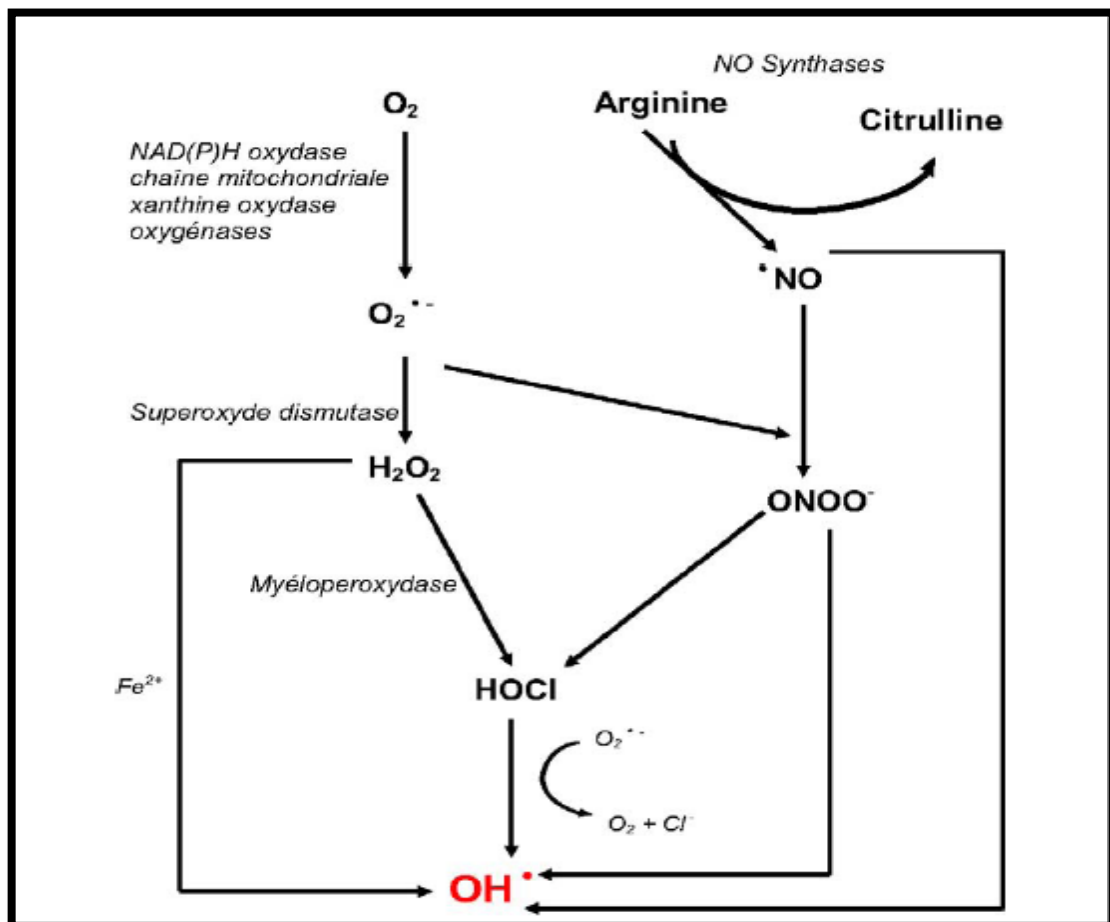


Fig.2. Sources cellulaires et interconversions des ROS et RNS.(Beaudoux J L et al , 2006)

1-1-Définition du stress oxydant :

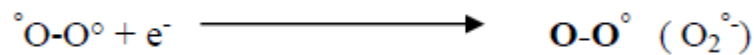
Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses anti-oxydants et la production d'ERO, en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Favier, 1997). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique.

2- les principales formes des radicaux libres :

2-1- Radicaux libres oxygénés (ROS) :

- **Ion superoxyde : $O_2^{\circ-}$**

L'ion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante.

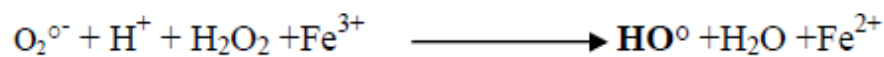


Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

- **Radical libre hydroxyle : OH°**

Le radical libre hydroxyle (OH°) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10^{-6} secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :

- la réaction d'Haber-Weiss

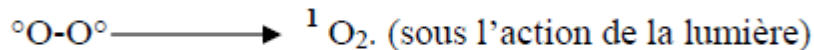


- la réaction de Fenton :

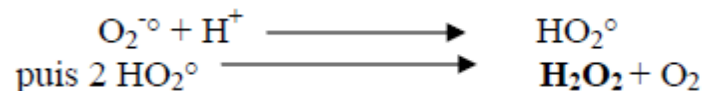


- **L'oxygène singulet : $^1\text{O}_2$**

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

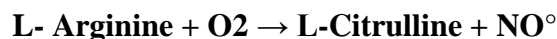


Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ROS) même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



2-2-Radicaux libres azotés (RNS) :

L'oxyde azotique NO° est principalement produit par un système enzymatique, la NOSynthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH (1.5 équivalent). (Radi R, 2004).



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide d'enzyme.

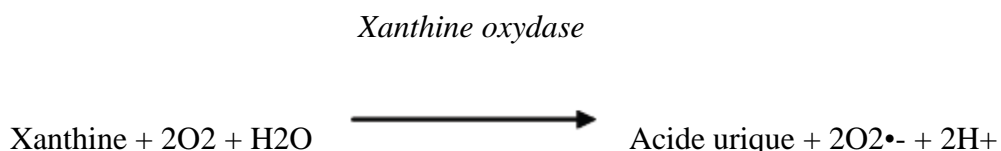
Le NO° peut réagir avec les fonctions thiols en donnant naissance aux S-nitroso thiols (RSNO), avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le peroxyde nitrite. La forme acide du peroxyde nitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux oxydants puissants (NO_2° , OH°). Il peut également s'additionner au CO_2 pour donner un adduit instable, qui donne par la suite les radicaux NO_2° et $\text{CO}_3^{\cdot-}$. (Eiserich J P et al, 1998).

2-3- Radicaux libres soufrés :

Ils ont comme origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure/ dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide dont la concentration dans le cytosol peut aller jusqu'au mM. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit thiol (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS°) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG°-). (Houée Levin C,2005).

**3- principale source de radicaux libres : la mitochondrie**

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi les quelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes. L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (*Freeman & Crapo, 1981*). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'O₂ •-. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson (*Thannickal & Fanburg, 2000*). La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'O₂ •- (*McKelvey et al, 1988 ; Parks et al, 1988*).



La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (*Babior, 1999*). En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse

la formation d'O₂ •-. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (*Krause, 2004*).

NADPH oxydase



Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (*Freeman et al, 1983 ; Turrens et al, 1982*). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (*Morel et al, 1999*). Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum. Les peroxysomes sont une importante source de production d'H₂O₂ cellulaire (*Boveris et al, 1972*). Toutefois, l'H₂O₂ est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H₂O₂ produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase. Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (*Balaban et al, 2005*).

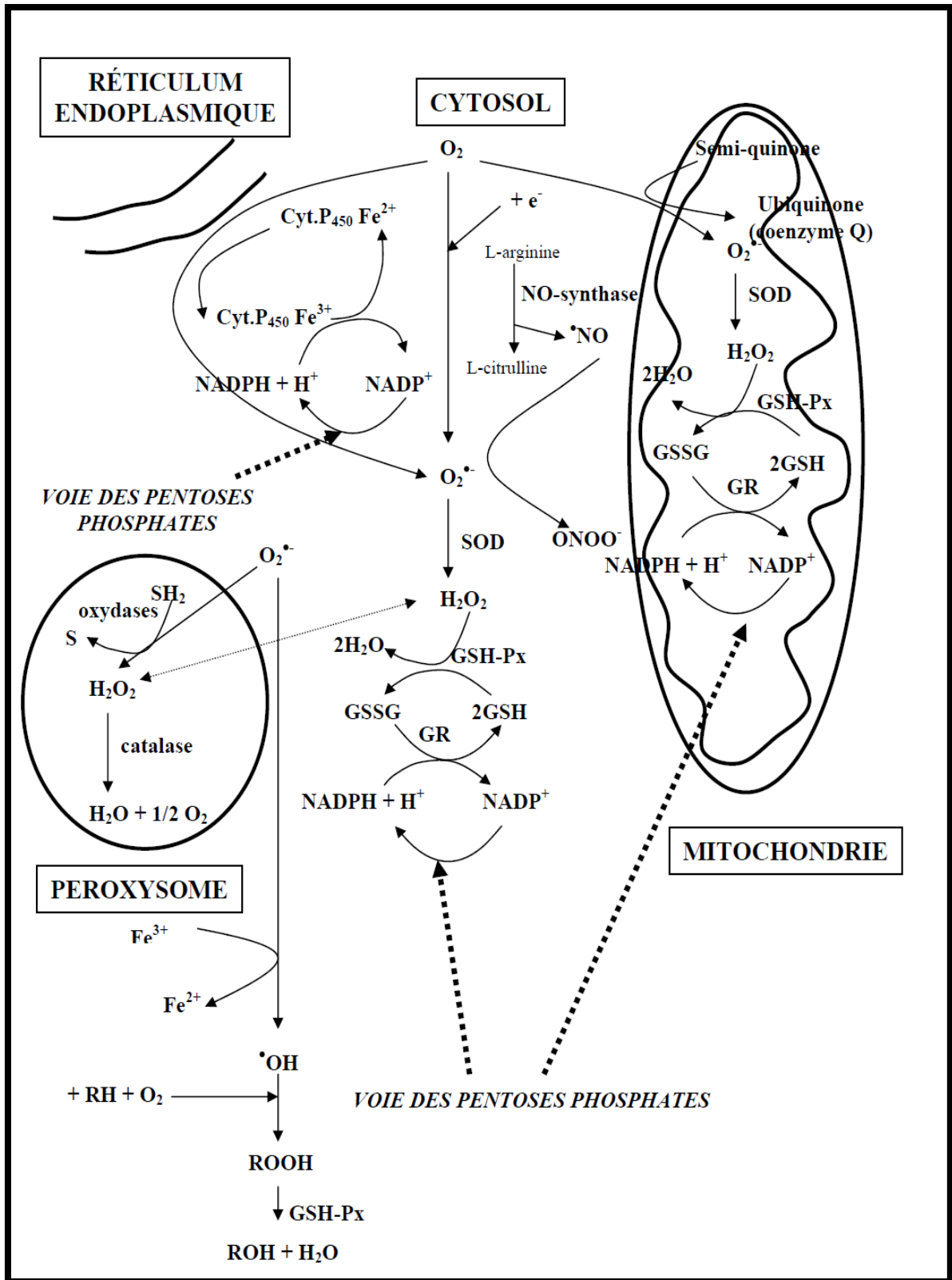


Fig.3. Principales sources cellulaires de radicaux libres (Bonfond-Rousselot et coll., 2003). RH : acide gras polyinsaturé, ROOH : hydroperoxyde lipidique, SH₂ : substrat réducteur, S : substrat oxydé, SOD : superoxyde dismutase, GSH-Px : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.

4-Stress oxydant et ses conséquences biologiques :

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman 2004; Valko *et al.*, 2006).

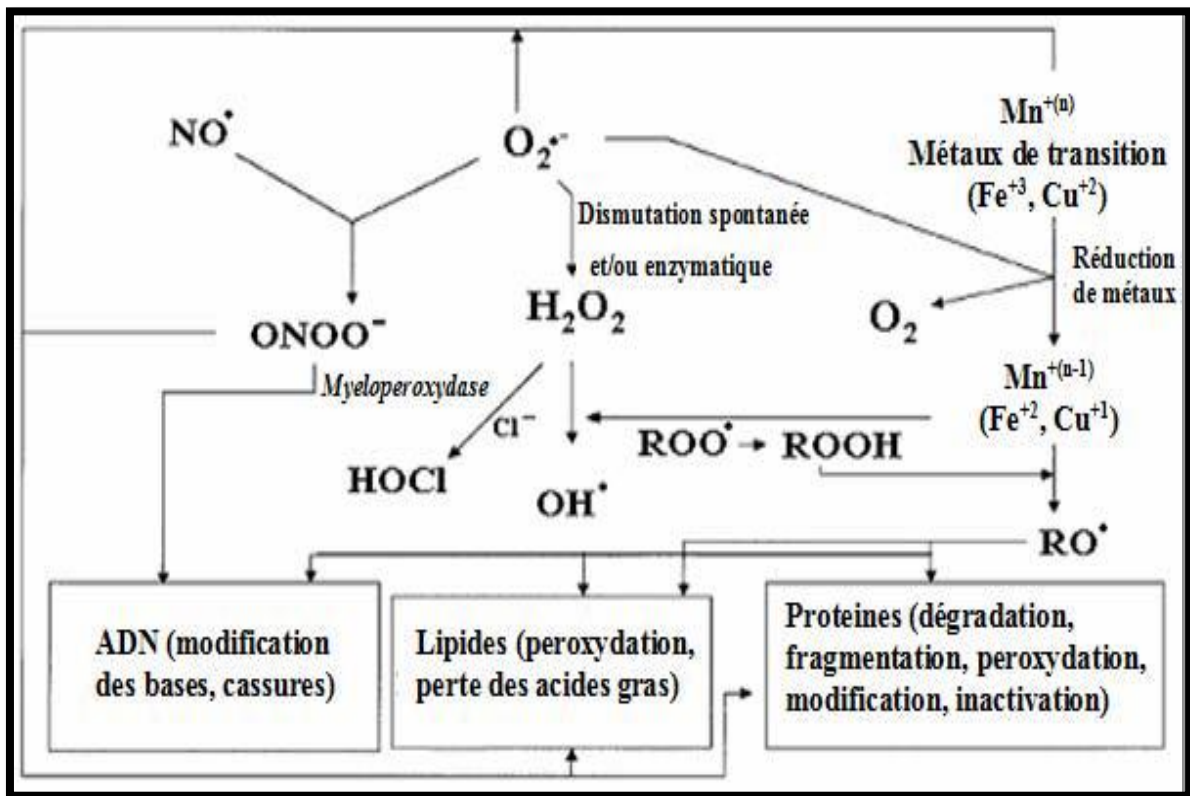


Fig.4. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (D'après Kohen et Nyska, 2002).

4-1- Peroxydation lipidique :

Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des EOR. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire)

(Beckman *et* Ames, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001). La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes (illustrées par la figure 5).

a) l'initiation :

l'attaque par un radical OH° du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné R° (OH° enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde RO°_2 (Martínez-Cayuela, 1995).

b) la propagation :

le radical RO°_2 enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical R° puis un radical RO°_2 , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001).

c) la terminaison :

Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne' (Khohen et Nyska., 2002).

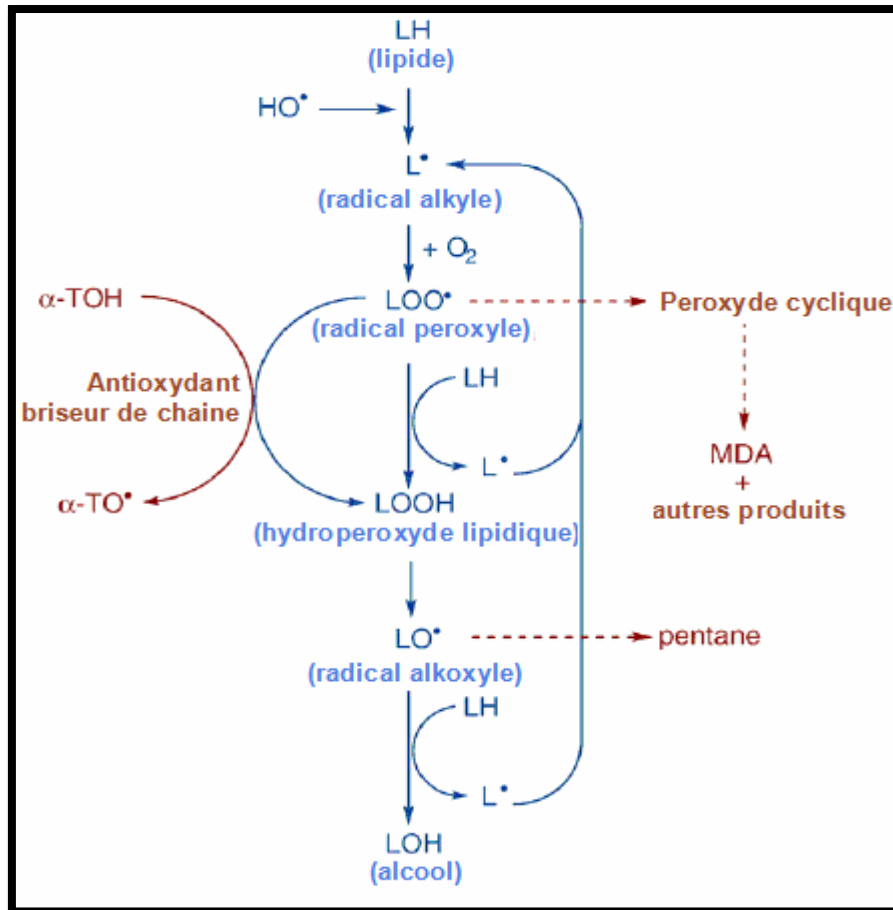


Fig .5. Les trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev et Davies, 2008).

4-2-Oxydation des protéines :

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlett et Stadtman, 1997). Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités, (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007). Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéase et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung *et al.*, 2007).

4-3- Oxydation des acides nucléiques :

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées, (Martinez-Cayuella, 1994). Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Valko et *al.*, 2006).

5- Les systèmes antioxydants :

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

5-1- Les systèmes antioxydants enzymatiques :

Il s'agit principalement de trois enzymes; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et *al.*, 2001).

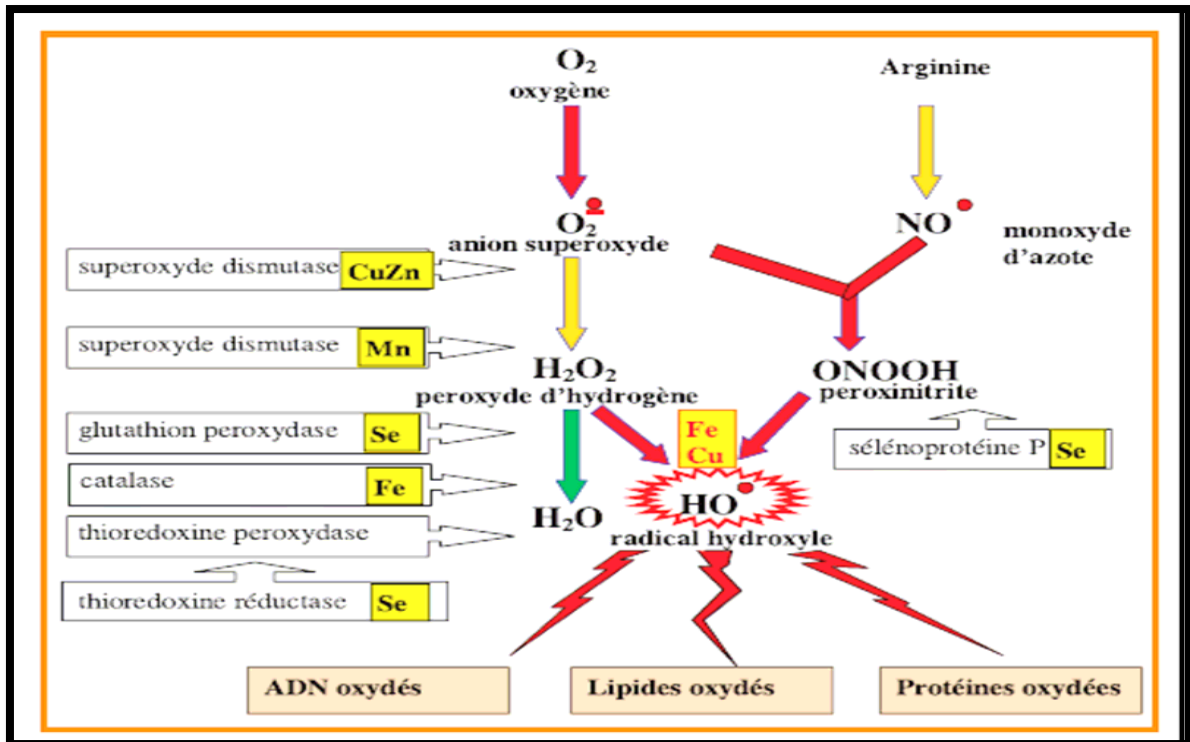
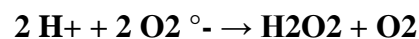


Fig.7. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (d'après Matés, 1999)

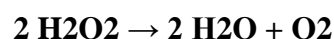
a) La superoxyde dismutase (SOD) :

Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante "anti-O₂^{•-}" la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale. (Salvayre Ret al, 2003).



b) La catalase :

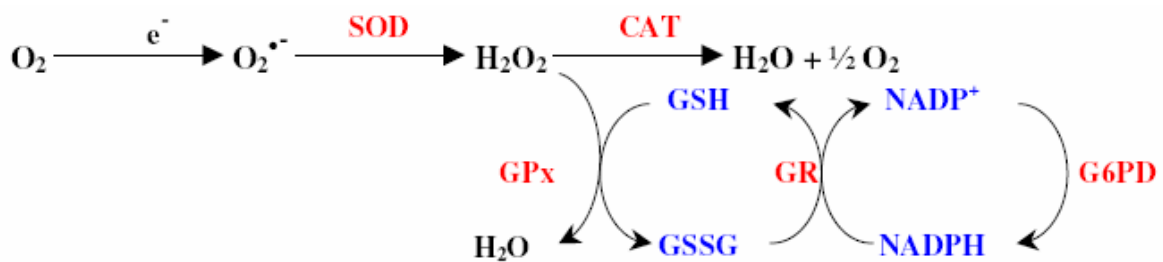
Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).





c) Les glutathions peroxydases et réductases :

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



d) Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR) :

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique. (Hattori et al, 2003)

5-2- Les systèmes antioxydants non enzymatiques :

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (les piègeur ajouté par l'alimentation, les piègeurs des radicaux libres lipophiles incluent la vitamine E, les caroténoïdes, alors que la vitamine C est une molécule hydrophiles).

5-2-1- Les antioxydants endogènes :**a) Glutathion :**

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (*Power & Lennon, 1999 ; Packer et al, 1997*). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H₂O₂ est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (*Ji et al, 1992*).

b) Acide Urique :

Il s'agit d'un produit issu du catabolisme des bases puriques. Comme pour tout couple acido-basique l'une ou l'autre des formes est prépondérante selon le pH du milieu : au pH physiologique la forme ionisée, l'urate, est prépondérante. Il agit comme un donneur d'électrons capable ainsi de stabiliser les radicaux hydroxyl HO°, peroxy ROO°, et l'oxygène singulet (Powers and Jackson 2008).

c) Les protéines de stockage des métaux de transition :

Des protéines liant les métaux (transferrine, céruloplasmine, etc.), l'albumine ou l'haptoglobine diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant avec en conséquence, une diminution de leur pouvoir oxydant. A titre d'exemple, la réaction de Fenton entre le fer (cuivre) et l'eau oxygénée ne se fait pas en absence du métal.

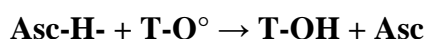
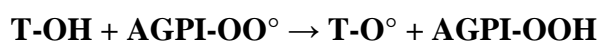
5-2-2- Les antioxydants exogènes :**a) La vitamine E ou α -tocophérol :**

La vitamine E ou α -tocophérol (α -TocH) est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle). L' α -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDLs. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TocH, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂°, et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant

cette protection. L' α -TocH, en cédant son hydrogène, se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité. L' α -TocH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), inhibant ainsi la formation du radical RO_2° . La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{-\circ}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TocH peut aussi réguler à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NAD(P)H réductase. (Lopez G V et al, 2005) .

b) La vitamine C ou acide ascorbique :

L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS et/ou RNS (majoritairement l' $\text{O}_2^{-\circ}$ et le ONOO^-). Il est aussi capable de recycler l' α -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique :



La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles). (Vertuani S et al,2004).

c) Les antioxydants exogènes phénoliques :

Une grande partie de ces molécules est présente dans les plantes. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoides, et les tanins. Les stilbènes et le lignan sont moins connus (Tableau 2). (Dai J, Mumper R J,2010)il sont capable de piéger des ROS, d'inhiber le piroxyde lipidique en réduisent les radicaux hydroxyle, superoxydes et peroxydes ; capable aussi de piéger les ion métallique, car il ont des propriété chélatrices (Beilattne et al,2000) .

Tab.2. Tableau récapitulatif des principaux antioxydants et de leurs modes d'action.
D'après Powers et Jackson (2008).

Catégorie d'antioxydants	Nom	Modes d'action principaux
Enzymatiques	SOD	Piège O ₂ ^{°-}
	GPX	Inactive H ₂ O ₂ et ROOH
	CAT	Inactive H ₂ O ₂
	PON1	Répare lipides oxydés des LDL
Non enzymatiques liposolubles	Vit E	Piège O ₂ ^{°-} et HO [°] , lutte contre lipoperoxydation (piège ROO [°])
	Caroténoïdes	Inactivent 1O ₂ , piègent ROO [°]
	CoQ10	Lutte contre lipoperoxydation, recycle vit E
Non enzymatiques hydrosolubles	Vit C	Piège certaines ERON, recycle vit E
	GSH	Cofacteur de GPX, Protection des protéines thiols par S-glutathionylation
	Acide urique	Piège certaines ERON (donne e ⁻)
	Bilirubine	Inactive H ₂ O ₂ , lutte contre lipoperoxydation (piège ROO [°])
	Acide α-lipoïque	Piège certaines ERON, chélate métaux libres, recycle vit E et vit C
	Métaux de transition	Cofacteurs de SOD (□Cu, ZN, Mn), GPX (□Se), et CAT (□Fe)
	Protéines de transport	Chélatent les métaux de transition libres
	Flavonoïdes	Luttent contre lipoperoxydation, piègent HO [°] , NO ₃ ⁻ , et HClO

6- les flavonoides comme antioxydants :

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des

végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005).

6-1- Structure et classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (Bruneton, 1999).

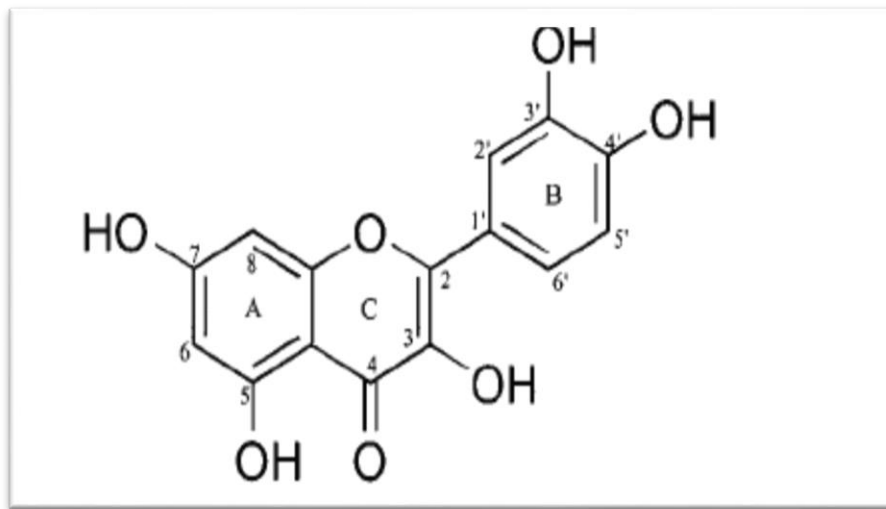


Fig.8. Structure générale du noyau des flavonoïdes
(D'après Heim et al., 2002)

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groups différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich., 2006).

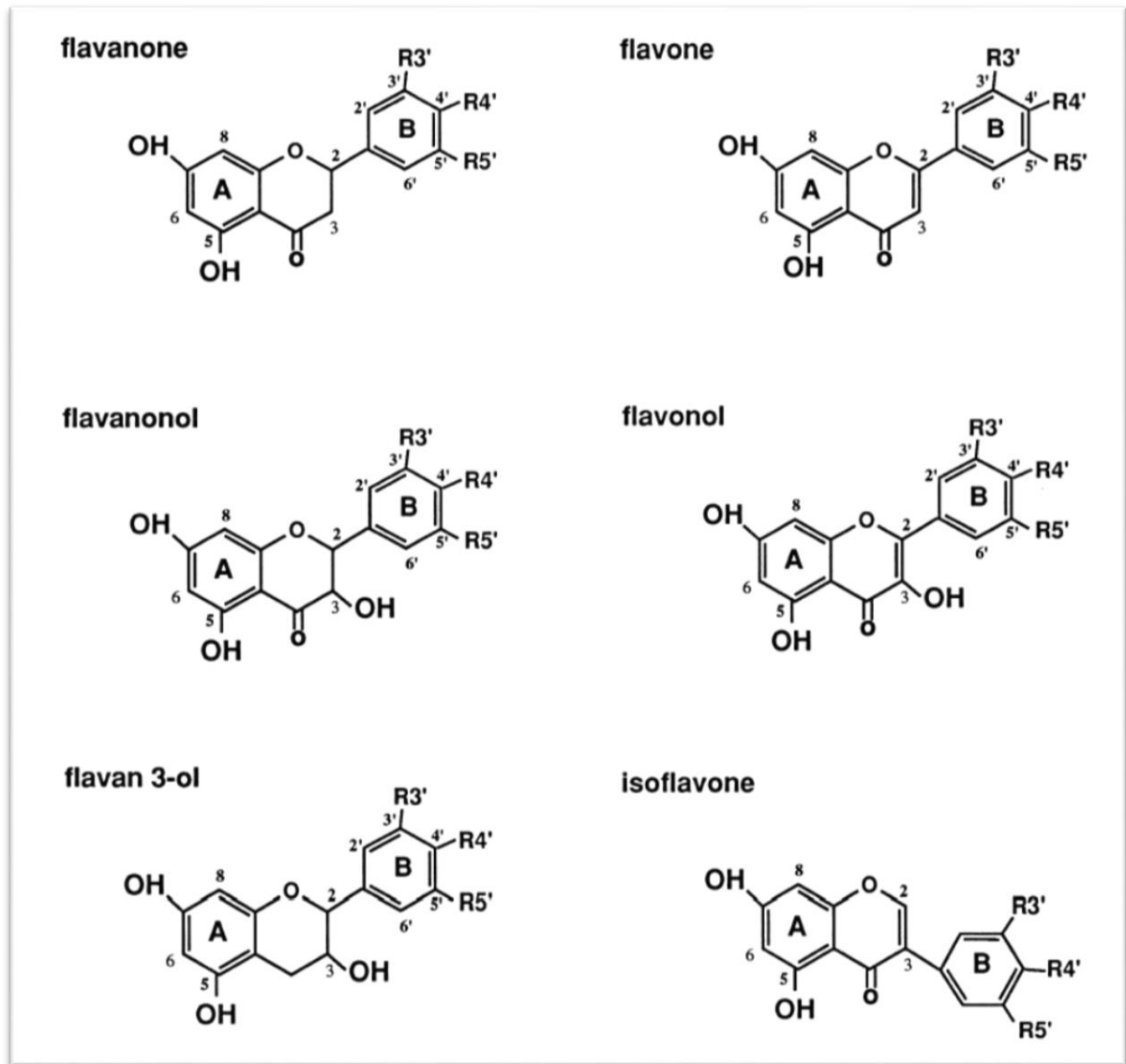


Fig.9. Structures des différentes classes de flavonoïdes (Gamet-Payraastre et al., 1999).

6-2- Distribution et localisation des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee et al., 1994). Les flavonoïdes sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Schewe et Sies, 2003).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée; ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii et al., 2003). La plupart des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (Williamson et al., 2000). Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, Hallman et al. (Hollman et al., 1995 ; Hollman et al., 1997) ont montré chez l'homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement était plus importante (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entrérocytes *via* le système de transport des glucides (Hollman et al., 1997).

6-3- La biodisponibilité des flavonoïdes :

Les flavonoïdes alimentaires sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal (Crespy et al., 1999; Pforte et al., 1999), alors que les flavonoïdes thérapeutiques sont administrés directement dans le tissu malade, dans la peau, ou dans une zone menant à la cible. Dans la nature, la plupart des flavonoïdes existent sous forme de glycosides, mais ils sont en général absorbés sous forme aglycone. Après métabolisation par les bactéries dans l'intestin, 15% des flavonoïdes aglycones sont absorbés par l'intermédiaire des micelles de bile par les cellules épithéliales et passent ainsi dans la lymphe (Spencer et al., 1999).

Quelques flavonoïdes inhibent la diffusion facilitée des monosaccharides dans les cellules épithéliales de l'intestin. Les flavonoïdes résiduels sont alors excrétés dans les selles. La lymphe transporte les flavonoïdes jusqu'au foie, et la majorité (80%) des composés est absorbée au premier passage, l'autre partie se fixant sur l'albumine sérique (Casley-Smith, 1986). Les hépatocytes transfèrent les flavonoïdes vers l'appareil de Golgi et les peroxysomes, dans lesquels ils sont dégradés, ou conjugués par glucuronidation ou sulfatation, notamment par l'action du cytochrome P450.

Les produits de dégradation sont sécrétés par des transporteurs d'acides organiques dans le sang et excrétés ensuite par les reins (Graefe et al., 1999; Graefe and Veit, 1999). La demi-vie d'un flavonoïde dans l'organisme est d'environ 1-2 h. Ainsi, les flavonoïdes

sont assez bien éliminés par la bile, et ne sont pas accumulés dans le foie l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6% de l'élimination totale (Milane 2004).

6-4- Activité antioxydante des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont été découverts dans les années 30 par Albert Szent-Gyorgyi, lauréat prix Nobel, en tant que des composés avec l'activité anti-oxydante prononcée (Hodek *et al.*, 2002). Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par :

- Le piégeage direct des ROS.
- L' inhibition des enzymes .
- la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- La protection des systèmes de défense antioxydants. (Halliwell, 1994).

Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme agent prooxydant (Foresman et al 1992, Hariharan et al,1973)et engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides.

a) Le piégeage direct des ROS :

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l' activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox (Jovanovic, 1994), les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l' alkoxyde et l' hydroxyde par transfert d' hydrogène :

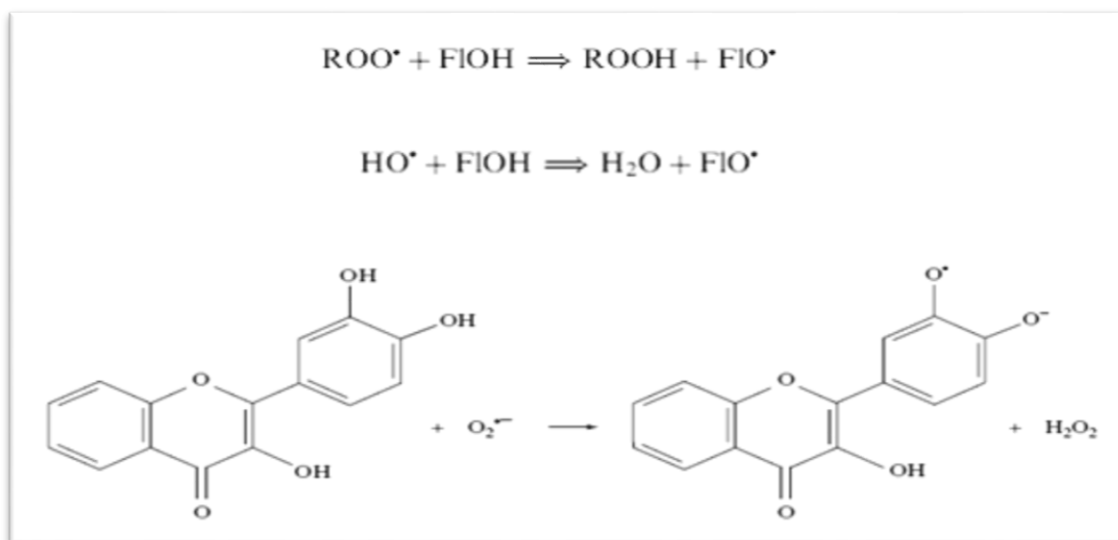


Fig.10. Réaction des flavonoïdes avec les EOR

(D'après Densiov et Afanas'ev, 2005)

Le radical aroxyde résultant (Fl-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.

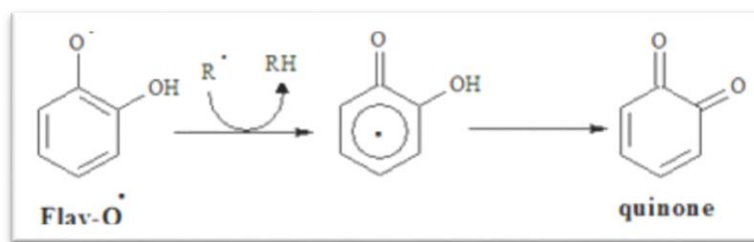


Fig .11. Piégeage des ROS (R[•]) par les flavonoïdes.

En outre, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (McCord, 1995). La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple Flav- O[•]/Flav-OH, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde. (Rice-Evans, 2001).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres (Jovanovic, 1994 ; Van Acker, 1996 ; Rice-Evans, 1996 ; Cotelle, 1996 ; Cos, 1998 ; Pietta, 2000 ; Seyoum *et al.*, 2006). Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupe catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc le pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes) (Chen *et al.*, 2012).
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité antiradicalaire des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2006 ; Seyoum *et al.*, 2006).
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 augmente également la capacité à piéger les radicaux des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et

une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité antioxydante) (Heim et al., 2002 ; Balsundram et al., 2006 ; Seyoum et al., 2006).

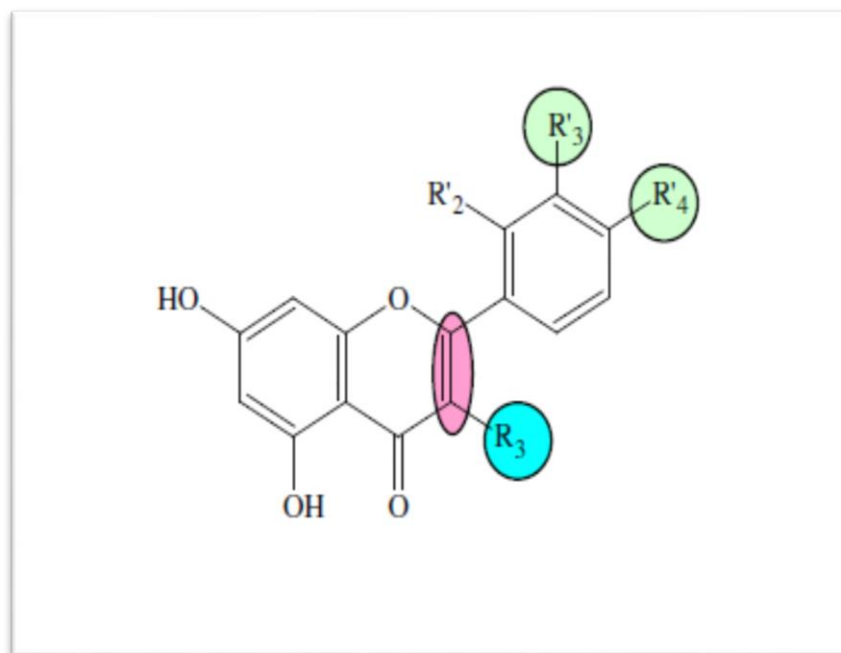


Fig .12. Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić et al, 2003).

b) Inhibition enzymatique :

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\bullet -}$ et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanas'ev, 2005).

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine; l'élastase; l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proantho-cyanidols; la phosphodiésterase de l'AMPc; l'aldoséductase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxyflavones; la protéine-kinase, notamment par le lutéolol; plusieurs flavonoïdes (cirsiliol, hypolaetine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysine, etc.) inhibent la cyclooxygénase (Bruneton, 1999).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certains enzymes (lipoxygénase, phospholipase, cyclo-oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse.

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobin, quercétine, morinemyricétine,) est attribuée à leur efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (Hodek *et al.*, 2002).

Beaucoup d'efforts ont été fait pour la recherche des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase, l'enzyme clef dans la biosynthèse de la mélanine. Les flavonoïdes présentent le groupe le plus étudié des polyphénols. Les résultats des travaux de (Gao, et ses collaborateurs 2007) ont montré que les 5, 6,7-trihydroxy-flavones sont utiles en tant qu'agents de dépigmentation.

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (Bruneton, 1999).

c) chélation des ions métalliques :

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{+2} est un stimulateur de la peroxydation des LDL (Tiqwari, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntić, 2007) La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B.
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C.
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

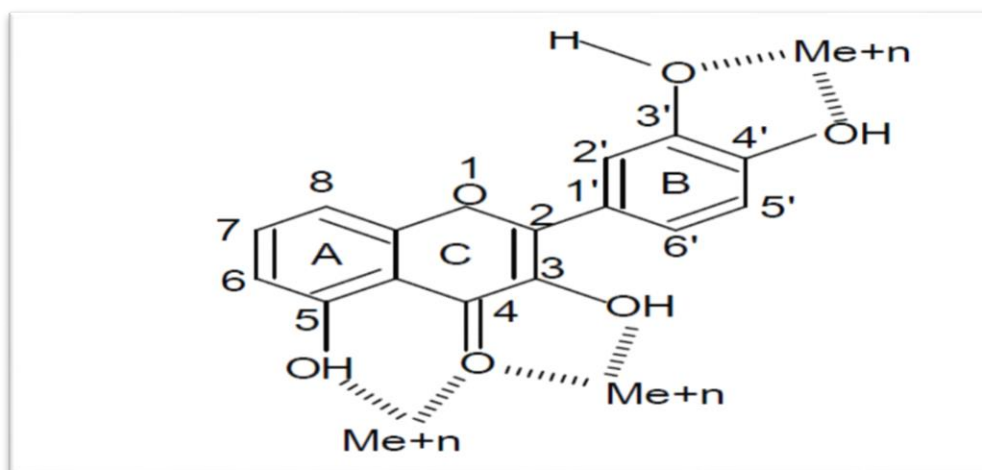


Fig.13. Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (Tiwari, 2001)

d) Propriétés pro-oxydantes :

Nous avons décrit précédemment les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'autooxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (Milane, 2004).

1- Historique :

Le chardon-marie (*Silybum marianum*) ou « Milk-Thistle » en anglais est une plante annuelle à bisannuelle appartenant à la famille des Astéracées. Son nom latin *Silybum* signifie chardon, *marianum* vient se réfère à la légende qui veut que les nervures blanches, caractéristiques des feuilles de cette espèce, proviennent du lait de la Vierge Marie dont des gouttes seraient tombées sur ce chardon alors qu'elle allaitait l'enfant Jésus pendant la fuite en Egypte (Wynn et Fougère, 2006). Le chardon-Marie était utilisé, dès l'Antiquité puis au Moyen-Age, pour traiter les problèmes hépatiques, notamment les troubles biliaires ou touchant le foie. Plus tard, au XIXe siècle, on l'exploita pour traiter certains troubles menstruels, comme les règles abondantes, mais aussi les varices et les congestions de la vésicule biliaire et des reins. Aujourd'hui, il permet de lutter contre l'insuffisance hépatique.

2- Systématique :

Selon Deysson, (1979) ; Anonyme, 1984 ; Guignard, 1998 ; Spichiger *et al.*, 2000, la systématique du chardon-Marie est comme suit :

- Embranchement : Phanérogames.
- Sous-embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida.
- Ordre : Asternales.
- Famille : Asteraceae.
- Sous-famille : Tubuliflores.
- Genre : *Silybum*.
- Espèce : *Silybum marianum* (L) Gaerthn

3-Origine :

Le Chardon marie est endémique à la région méditerranéenne (Hauf, 1982 ; Guittonneau et Huon, 1983 ; Volak et Stodola, 1984). il s'étend de la mer à 700-1100 m d'altitude sur les terrains incultes secs et rocailleux de toute l'Europe occidentale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du Nord. Le chardon marie est cultivé dans les jardins ornementaux (Roche, 1991). cette plante est cosmopolite, préfère les sols secs et les endroits chauds et ensoleillés. On la trouve dans les champs, les terrains incultes, les décombres et les bords des routes (Quezel et Santa, 1963 ; Guittonneau et Huon, 1983 ; Beniston, 1984).

En Algérie le chardon marie est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides (Quizel et Santa ,1963).

Le chardon marie est aujourd'hui répandu en Amérique du Nord, si bien qu'on le trouve tant au Canada qu'au Mexique, la Nouvelle-Zélande, l'Australie, l'Afrique du Sud, le Chili et l'Argentine (Sindel, 1991 ; Gabay et al (1994).

4-Description de la plante :

Le chardon marie est facilement reconnaissable par ses grandes feuilles vertes, brillantes marbrées de blanc (Vogel encyclopédie, 2007) aux lobes découpés, aux bords dentés pourvus d'épines jaunes, à bord moins découpé, mais très épineux. Elles présentent toutes de nombreuses nervures blanches, donnant l'impression que la feuille est maculée de lait (Caremes, 1990).

Les tiges généralement ramifiées, atteignant environ 20 à 150 cm de haut, à leur extrémité portent des touffes bien fournies de fleurs tubulaires, ses capitules ont des bractées épineuses fortement recourbées en arrières (Luper, 1998 ; Pepping , 1999 ; Vogel encyclopédie, 2007).

Les Fleurs sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6cm de diamètre, dont la plupart sont pourvues d'une forte épine atteignant jusqu'à 5cm et se réfléchissant vers l'arrière (Guittonneau et Huon ,1983 ; Caremes, 1990). La corolle est dentée de couleur pourprée, 5 étamines formant un tube autour du style (Guignard, 1998). La plante a un potentiel de production de 33 capitules en moyenne, chaque tête de fleur produit environ 190 graines, avec une moyenne de 6350 graines par plante dont 94 % sont viables (Sindel, 1991).



Photo.01. la fleure de chardon marie.

Les fruits sont des Akènes luisantes, ovoïdes et obliques, de 6-7mm, de couleur beige ou brune ; ils sont entourés d'une coquille (Guittonneaire et Huon, 1983) et portent des aigrettes légèrement pendantes avec des poils soyeux et blancs (Vogel encyclopédie, 2007 ; Sindel, 1991). L'aigrette est denticulée en anneaux dur à leur base, chacun d'eux est inséré sur une sorte de disque d'apparence cornée et portant au centre une sorte de cylindre, court de 3 à 5 mamelons (Bezanger, 2003) (**Photo 02**).



Photo.02. Les fruits chardon marie

5- Constituants chimiques des graines :

Les graines du chardon contiennent plusieurs composées chimiques ; des huiles essentielles, des protéines (albumine) qui représentent 25 à 30 %, des matières grasses avec prédominance d'acide linoléique et d'acide oléique en plus de l'acide palmitique (Widmer, 2001) ainsi que des flavonolignanes dont la fraction principale porte le nom de silymarine. Celle-ci représente 1 à 4 % ; c'est un mélange de trois flavonolignanes issus de la taxifoline (une flavonone) et de l'acide coniferilique (Saller,1995), la Silybine, la Silychristine et la Silydianine. on trouve aussi l'isosilibinine ainsi que la silimonine, l'isosilychristine et d'autres composés : silandrine, silhermine, néosilihermines A et B, 2,3-dehydrosilibinine et tri-pentamères de silibinine (silybinomères). Certaines de ces flavanolignanes minoritaires ne sont présentes que chez les variétés à fleurs blanches (Bruneton, 1999 ; Kvasnicka *et al.*, 2003 ; Kren *et al.*, 2005 ; Abenavoli, *et al.*, 2010).

Il existe également d'autres flavonoides en faibles quantités tels que la quercetine, la taxifoline, le kaempferol, l'apigénine, la naringine, ériodyctiol, chrysoériol etc. Le fruit renferme également d'autres constituants tels les tocophérols, les stérols (cholestérol, campistérol, Stigmastérol, sitostérol) et le mucilage (Bruneton,1999).

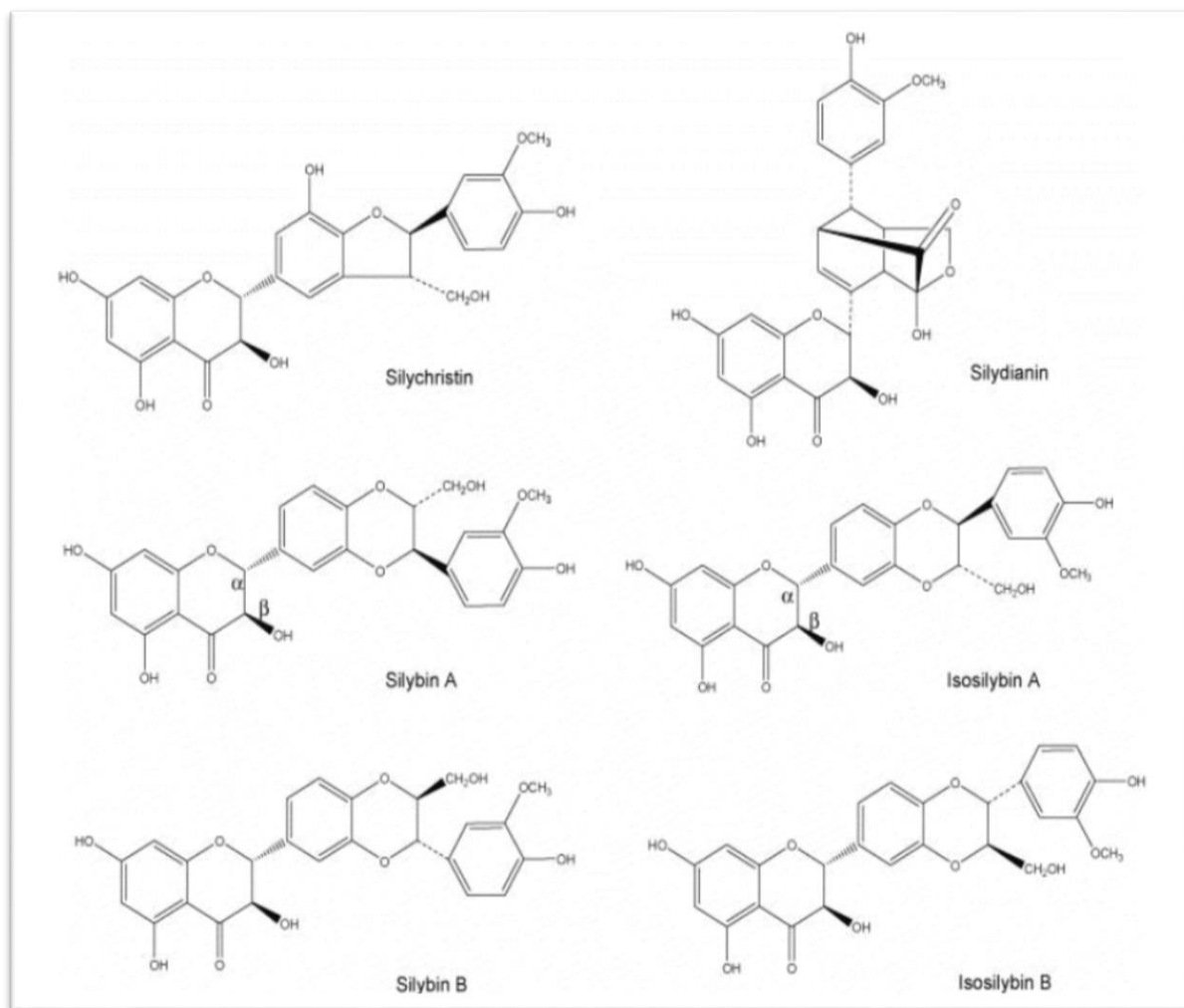


Fig.14 : Les flavanolignanes majeures de la silymarine.

6- Pharmacologie et utilisation de *Silybum marianum* :

Au cœur de l'antiquité, le Chardon-Marie et ses composants actifs étaient déjà connus par les Grecs qui s'en servaient pour soigner les problèmes biliaires et les troubles du foie. Les graines qui le compose sont riches en flavonoïdes spécifiquement actifs sur le foie, la silymarine. Ce composant naturel unique et actif exerce trois actions sur le foie:

- Détoxifie et draine pour éliminer les toxines, déchets métaboliques (substances chimiques, lipides saturés, alcool, cholestérol...).
- Stimule et facilite la sécrétion biliaire, essentielle à la métabolisation des graisses.
- Régénère et entretient la santé hépatique, les cellules du foie sont renouvelées.

La Chardon Marie est retrouvé dans divers traitements pharmacologiques élaborés pour traiter les troubles hépatiques: calculs biliaires, hépatites, cirrhose et empoisonnement du foie

par diverses toxines (solvants, produits d'entretien, détergents...) (Pizzorno et al, 1999 ; Ernest, 2001) ou substances vénéneuses (alcool, venin, piqûres d'abeilles...) (Bradley, 2006 ; Blumenthal, 2003 ; Bradley, 2006 ; UK, 2006 ; Morazzoni et Bombardelli, 1995) , la protection du foie contre les effets des toxines naturelles des champignons (Pietrangelo et al., 1995 ; Foster, 1995 ; Ody, 2000), des morsures de serpents, de piqûres d'insectes, etc. (Anderson et al., 2001 ; Anonyme, 2001) .

Le Chardon marie est également appliqué en cas d'hépatites et hépatopathies latentes et de cirrhoses. Les meilleurs effets sont observés lors d'administrations prophylactiques où il protège la cellule hépatique lors des chimiothérapies anticancéreuses. Il agit également contre la dépression nerveuse et permet la stimulation de la lactation (Compos, 1989 ; Schandalik et al., 1994 ; Venkataraman et al., 2000).

Les mécanismes d'action du chardon-Marie ne sont pas encore élucidés. On lui reconnaît un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-prolifératif, anticancéreux, l'action hépatoprotectrice, quoique cliniquement démontrée, n'est pas encore expliquée (Jiang et coll.,2000 ; Gupta et coll.,2000 ;Bhatia et Agarwal.,2001).

1-Préparation et étude du matériel végétal :

1-1 Rendement massique des extractions

L'opération de l'extraction à partir de 100 g de poudre de graines du chardon marie à l'aide du méthanol dix fois a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brut d'une couleur marron jaunâtre tel que y est mentionnée dans le Tableau.3.



Photo.04 : l'extrait méthanolique de chardon marie.

Dans notre étude on obtient un rendement d'extraction de l'ordre (la moyenne) 3,13 % du poids total des graines, ce dernier est supérieur à 2,56% rapporté par Kechkar (2008) ayant utilisé la même technique d'extraction.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées

Tab.03 : Rendements des extractions exprimés en g de matière sèche et en % par rapport au poids des graines

N° d'extraction	La masse de poudre (g)	Le rendement (%) (par rapport au poids des graines)
1	2,62	2,58%
2	3,43	3,72%
3	3,50	3,08%
4	2,96	2,74%
5	2,66	2,66%
6	4,05	4,05%
7	2,19	2,19%
8	2,98	3,98%
9	2,37	3,37%
10	2,68	2,68%
11	2,43	3,43%

1-2- Etude phytochimique de l'extrait méthanolique des graines de chardon marie :

1-2-1-Tests phytochimiques

Tab .04 : Résultats des réactions de caractérisation

Composés	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Saponosides
Résultats	+++	+++	++	+++

1-2-2- Dosage des polyphénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différents concentration.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/mg d'extrait).

Teneur en polyphénols	(mg EAG /mg)
l'extrait méthanolique	0.480

Ce résultat est en accord avec la resultat de Zarban et Ziaee(2008) qui ont trouvé une teneur en polyphenol totaux de $0,484 \pm 0,017$ dans la silymarine.

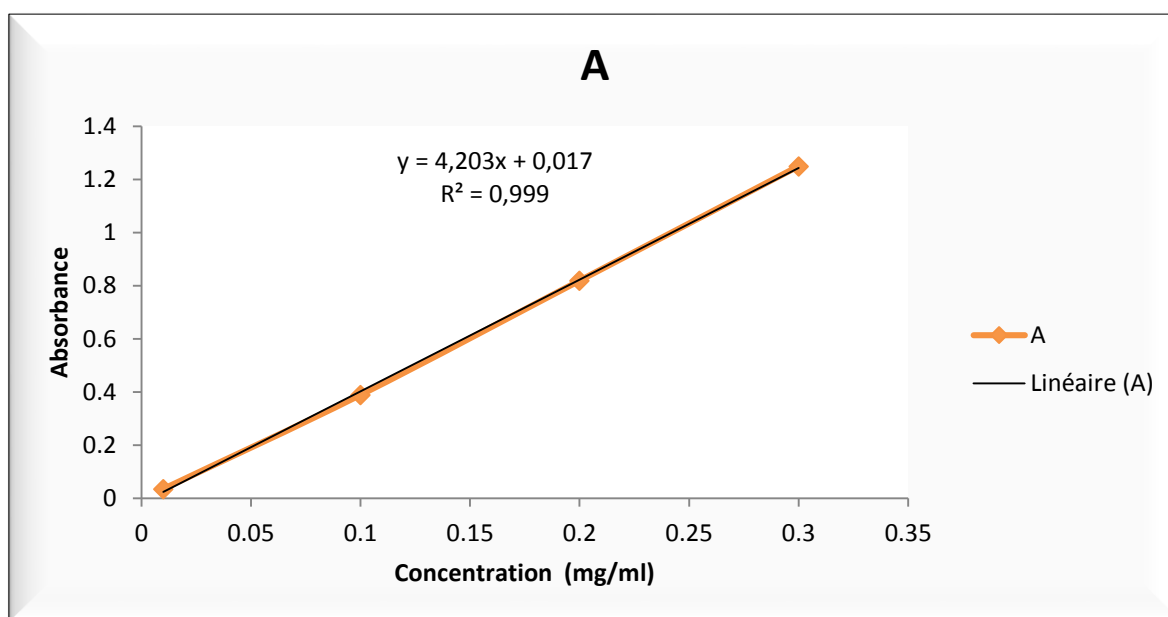


Fig .16. Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

1-2-3- L'évaluation de l'activité anti-oxydante (DPPH)

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes est évaluée par la diminution du taux de DPPH° dosé après l'addition des flavonoïdes à différentes concentrations suivie à 517 nm . Le pouvoir antiradicalaire de l'EMS de (0,0815 mg/ml); pouvoir inferieur à celui trouvé par Jaso et al., (2011) dans une étude sur l'activité antioxydante du silymarine et superieur à celui qu'exerce l'acide ascorbique (0,052mg/ml) et la quercétine (0,06 mg/ml).

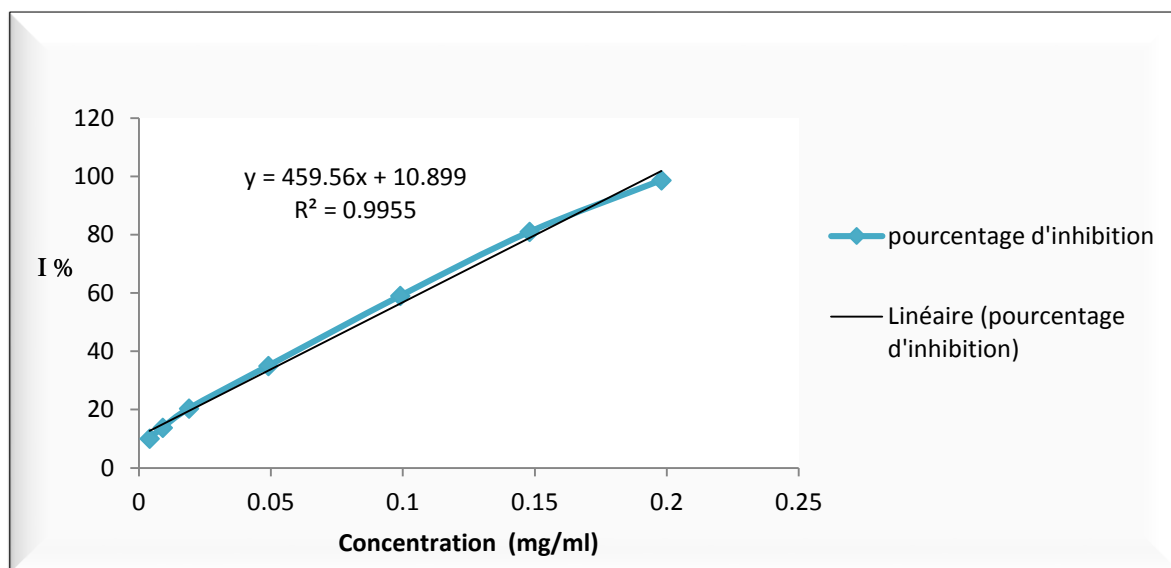


Fig.17. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait méthanolique.

1-2-4- Chromatographie sur couches minces (CCM) :

Pour la CCM le système choisi est : chloroforme/acétone/acide formique 75/16,5 /8,5, il a donné la meilleure migration des spots (séparation visible).

L'analyse du chromatogramme révèle la présence de plusieurs taches avec une coloration jaune. Les rapports frontaux sont calculés selon l'équation suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

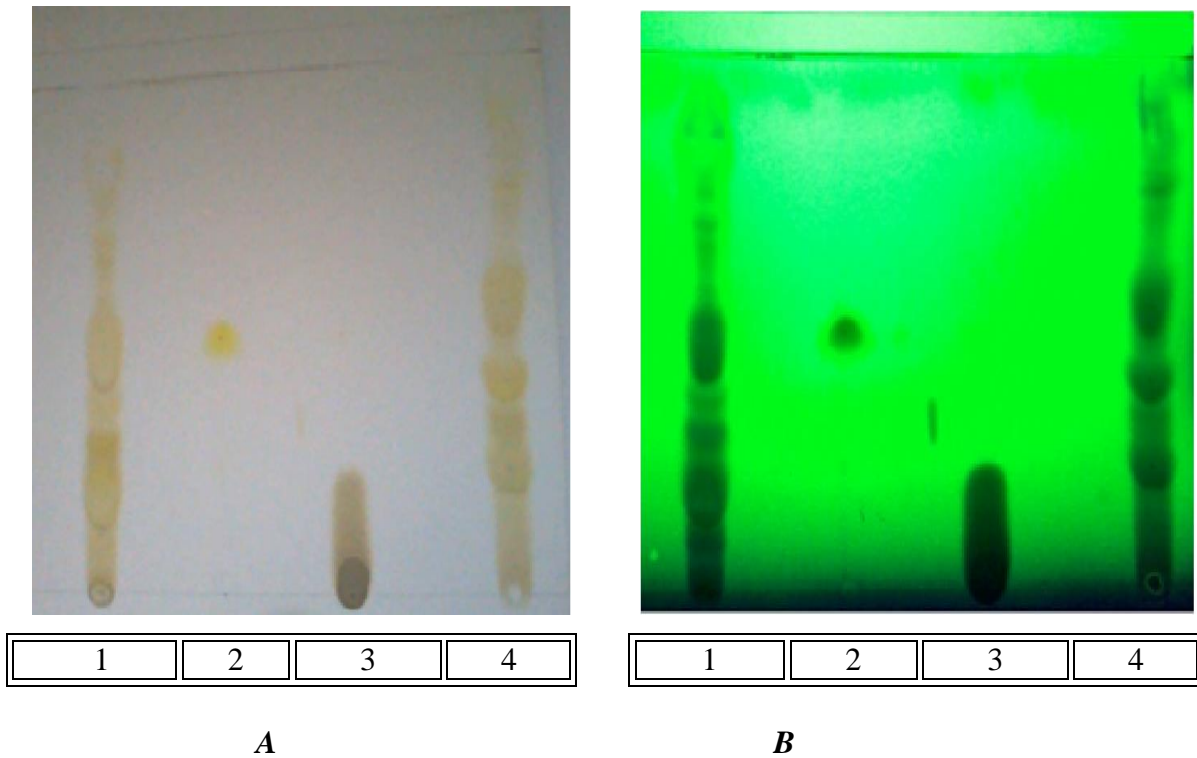


Fig.18 : Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de *Silybum marianum* et des standards.

A : à l'œil nu, **B** : observation sous UV 254 nm, **1** : l'extrait méthanolique, **2** : l'extrait, **3** : quercétine, **4** : Acide galique, **5** : légalon®

Tab.05 : Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits des graines de *Silybum marianum* ainsi que ceux des témoins utilisés.

Extrait /témoin	Rapport frontal
méthanolique	0,21
	0,28
	0,35
	0,43
	0,55
	0,64
quercétine	0,46
Acide galique	0,22
légalon®	0,21
	0,37
	0,52
	0,63

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm), la comparaison des Rf des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les graines de *chardon marie*. La quercétine et l'acide gallique (Rf : 0,46 et 0,22 respectivement) aussi La silychristine (Rf = 0.35) (Sameh Abouzid, 2012) sont probablement présents dans l'extrait méthanolique et légalon®. Le silybine / isosilybine (Rf : 0,6) (Sameh Abouzid, 2012), la taxifolin (Rf = 0.4) (Sameh Abouzid, 2012). Le Silybinin (Rf = 0.26) (Suha H ; Enas J, 2007)est probablement présent dans l'extrait méthanolique et légalon®.

2-Partie animale :

2-1- Etude pondérale :

- **Variation de gain du poids corporel :**

Tab.06. Variation de gain du poids corporel chez le lot témoin (T) et traités au nickel et à la combinaison Ni/Silymarine.

Paramètre	Les lots expérimentaux			
	témoin	Ni	Ni+Sil 400	Ni+Sil 600
poids corporel initial (g)	248,16	199,29	201,33	215,04
gain du poids corporel	27±2,21	0,33±1,41	8,17±2,32	4,23±3,34

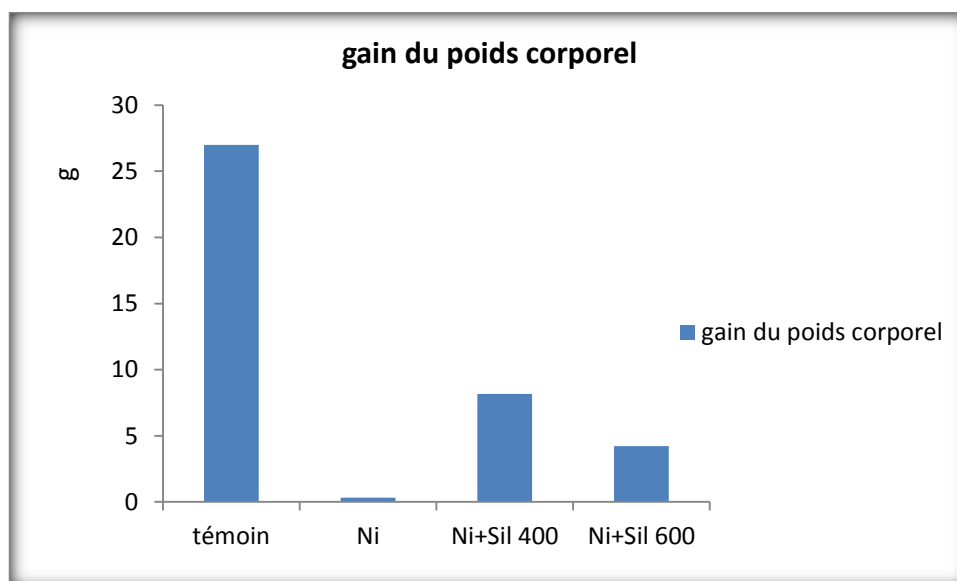


Figure.19. Variation de poids chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.

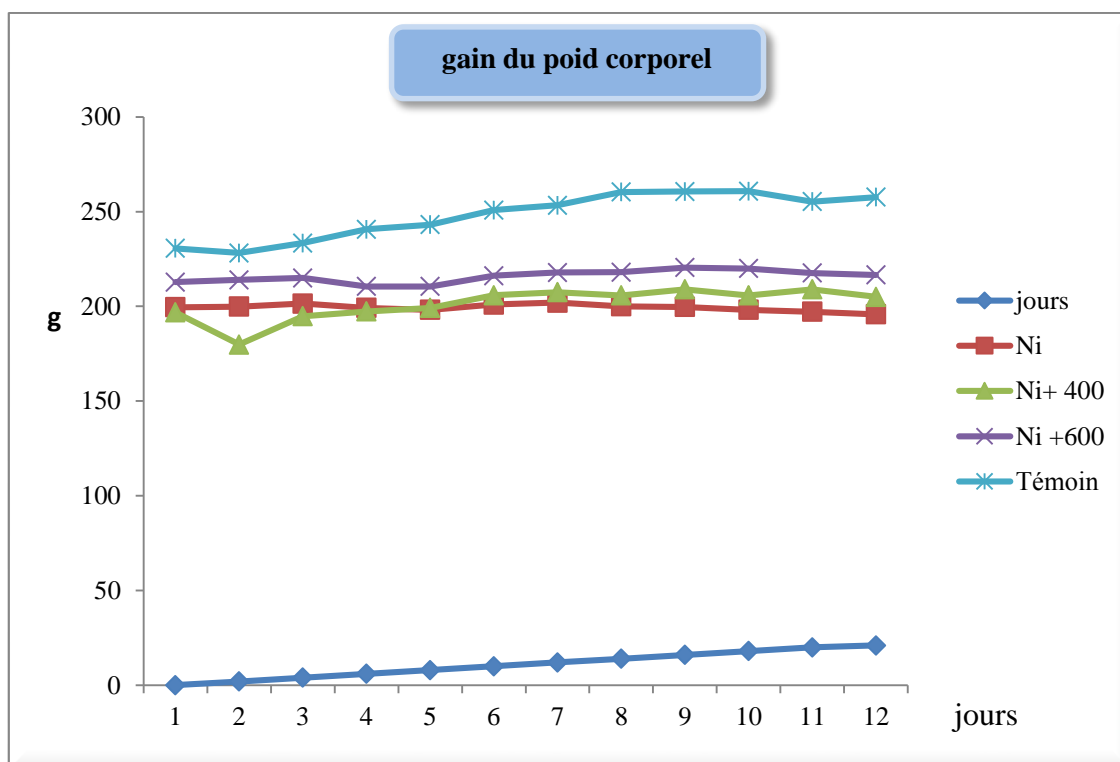


Figure.20. Evaluation en fonction du temps (jours), gain du poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités au nickel, et à la combinaison Ni/Sil.

Nos résultats montrent des changements dans le gain des poids corporel des animaux soumis à différents traitements (Tab.6, Fig.20). On note une diminution non significative, et du gain du poids corporel chez les rats traités au nickel, et à la combinaison Ni+Sil par rapport aux témoins. De plus, le gain du poids corporel augmente chez le lot traité à la combinaison par rapport au lot traité au nickel.

2-2- Etude biochimique.

Tab.07. Variation de la concentration sérique du glucose, des triglycérides, du cholestérol chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.

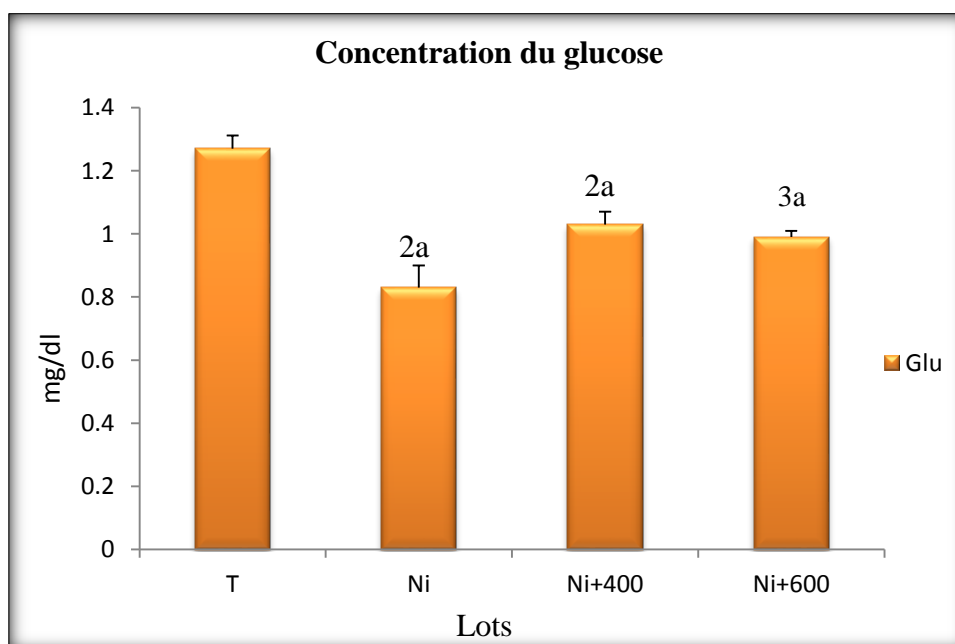
paramètre	Les lots expérimentaux			
	témoin	Ni	Ni+Sil 400	Ni+Sil 600
Glucose	1,27±0.042	0,83 ±0,072 ^a	1,03 ±0,042 ^a	0,99 ±0,02 ^{3a}
triglycérides	1.27 ±0.29	1.87 ±0.33 ^a	1.18 ±0.06 ^{b3a}	1.03 ±0.24 ^{2a}
cholestérol	0.51 ±0.06	0.67 ±0.12 ^a	0.48 ±0.04 ^{2a}	0.47 ±0.08 ^{2a}

a : différences significative par rapport au témoin(p<0,05).

2a : différences hautement significative par rapport au témoin (p<0,01).

3a : différences très hautement significative par rapport au témoin (p<0,001).

b : différences significative par rapport au groupe traité au Ni (p<0,05).



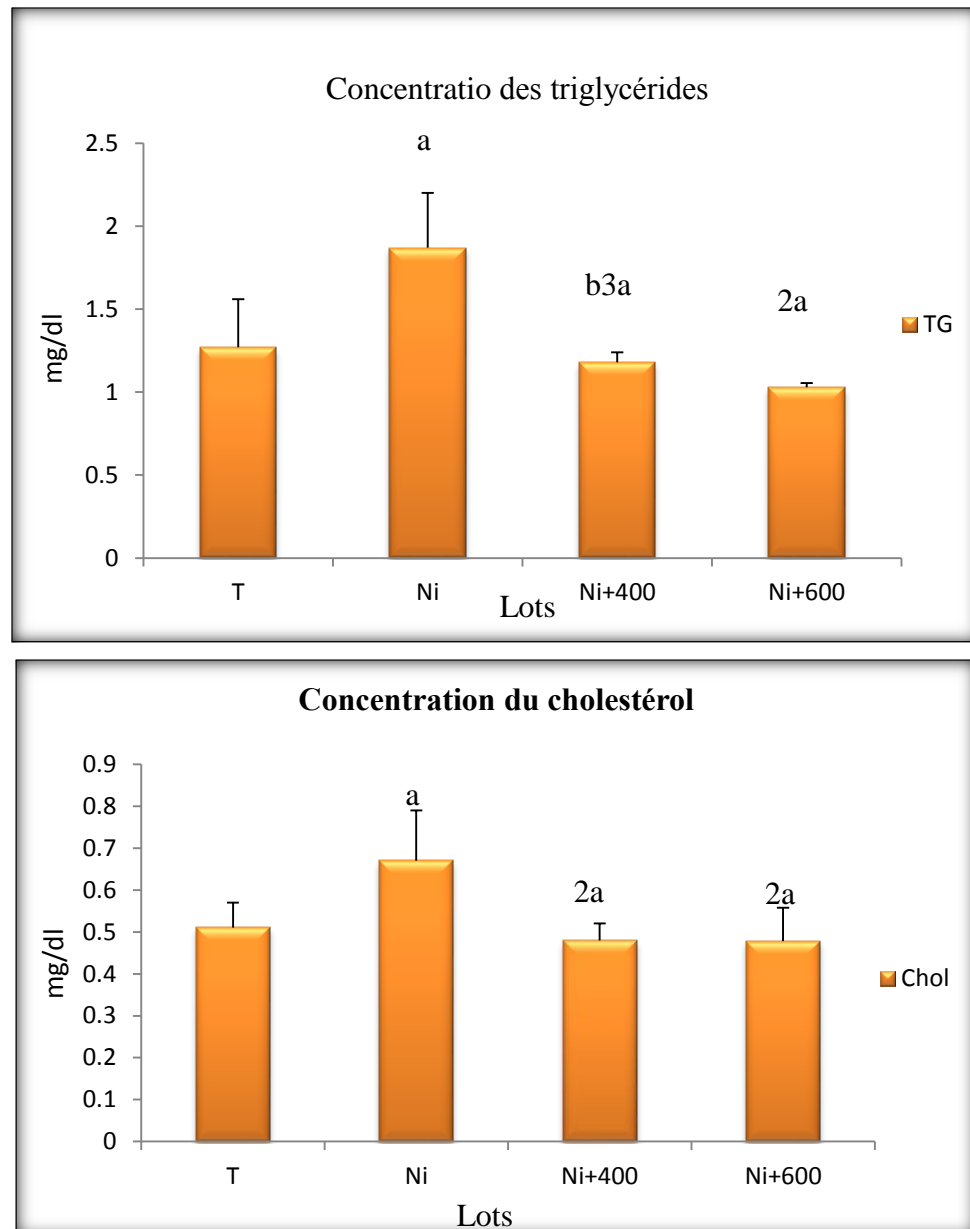


Fig.21. Variation de la concentration sérique du glucose des triglycérides, du cholestérol chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.

Les résultats obtenus montrent qu'il existe une diminution hautement significative et très hautement significative de la concentration sérique du glucose chez le lot traité au nickel, le lot Ni/Sil400 et le lot Ni/Sil600 par rapport au lot témoin, ce taux augmenté mais d'une façon statistiquement non significative chez le groupe traité à la combinaison Ni/sil en comparaison au lot de nickel.

Cependant, nous enregistrons une augmentation statistiquement significative des triglycérides chez le groupe traité au nickel, hautement significative chez le groupe Ni/Sil600 et très hautement significative chez le groupe Ni/Sil400; par rapport au témoin, ce taux

diminué d'une façon significative et non significative chez les rats des groupes Ni/Sil400 et Ni/Sil600 par rapport au groupe Ni.

Autre part, la concentration sérique du cholestérol présente une augmentation significative entre le lot témoin et le lot traité aux nickel, ce taux diminué maie d'une façon statistiquement hautement significative et non significative chez les groupes traité à la combinaison Ni/sil en comparaison au témoin et lot de nickel.

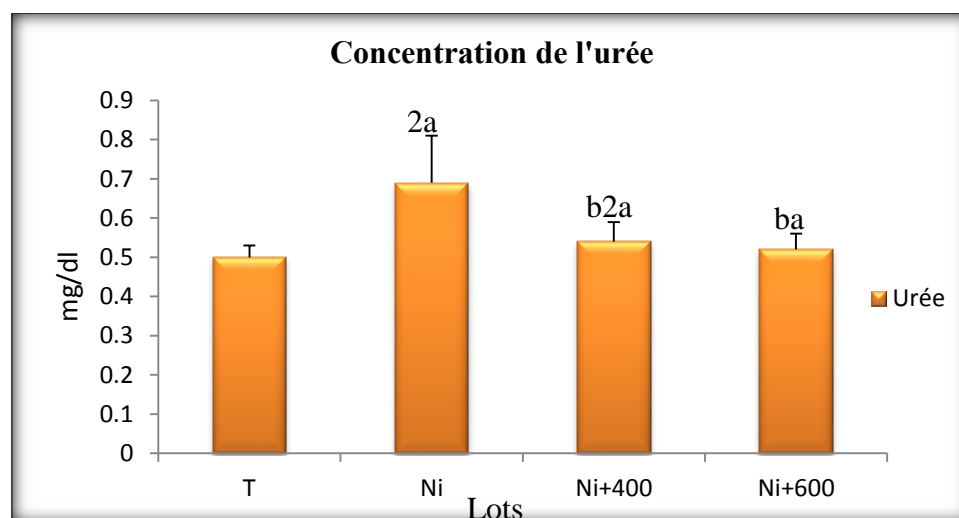
Tab.08. Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.

paramètre	Les lots expérimentaux			
	témoin	Ni	Ni+Sil 400	Ni+Sil 600
urée	0.5 ±0.03	0.69 ±0.12 2a	0,54 ±0,05 b2a	0,52 ±0,24 ba
créatinine	5,66 ±0,4	8,58 ±0,2	6,15 ± 0,17 a	5,93 ±0 ,11 2a

a : différences significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

2a : différences hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,01$).

b : différences significative par rapport au groupe traité au Ni ($p < 0,05$).



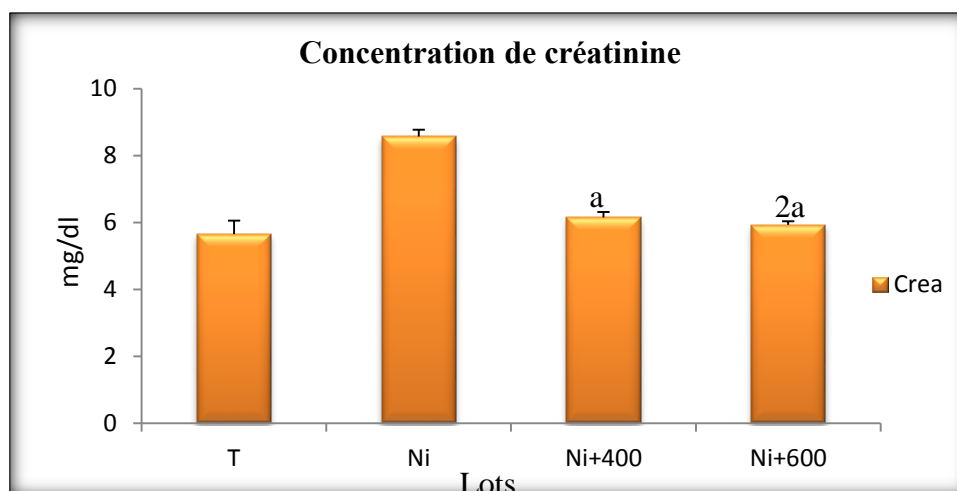


Fig.22. Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil

L'analyse du taux de l'urée révèle l'existence d'une augmentation statistiquement hautement significative chez le lot traité au nickel et le lot Ni/sil400, et significative chez le lot Ni/Sil600 par rapport au témoin, on note une diminution significative chez les rats de la combinaison Ni/Sil par rapport au lot Ni.

L'évaluation de la créatinine fait apparaître une augmentation non significative chez le groupe traité au nickel, significative chez le groupe Ni/Sil400, et hautement significative chez le groupe Ni/Sil600 par rapport au témoin, on note une diminution non significative chez les groupes Ni/Sil(400,600) par rapport au lot traité au nickel.

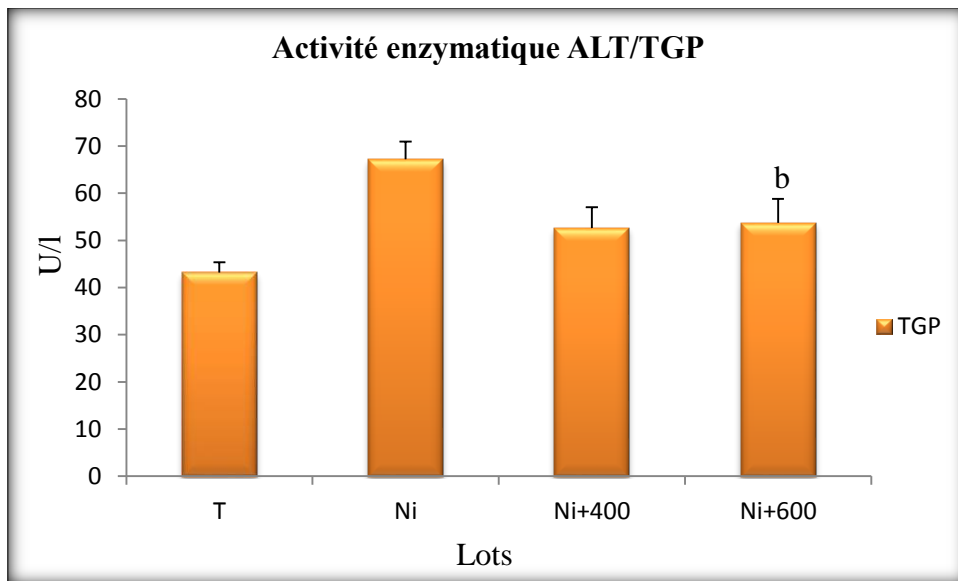
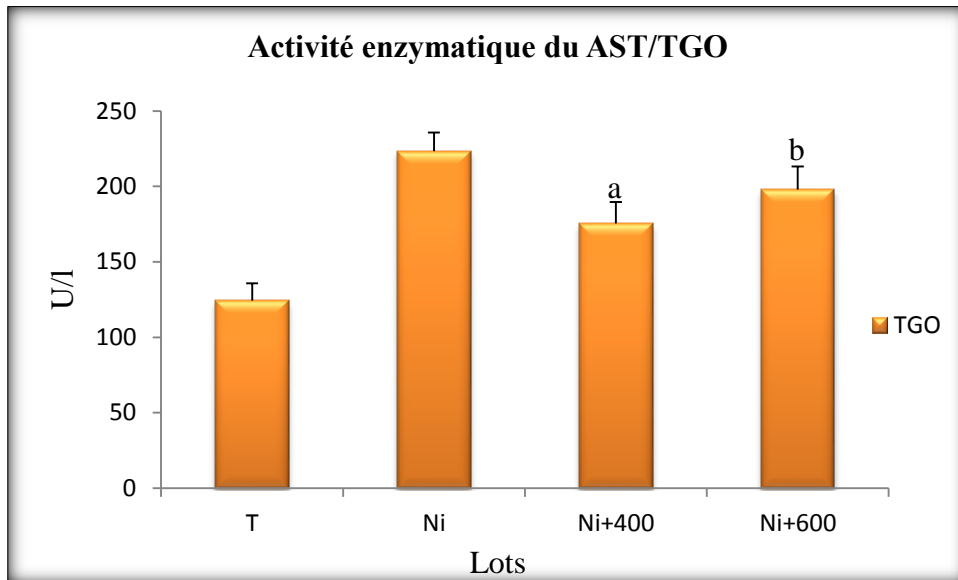
Tab.09. L'activité enzymatique de GOT, GPT et de phosphatase alcaline(ALP) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil

paramètre	Les lots expérimentaux			
	témoin	Ni	Ni+Sil 400	Ni+Sil 600
AST/TGO	124,3 ±11,5	223,44 ±12,3	175,5 ±14,2 ^a	198 ±15,1 ^b
ALT/TGP	43,2 ±2,16	67,25 ±3,73	52.3 ±4.45	51.7 ±5.1 ^b
ALP	126 ±17,3	291,3 ±2,62	144.6 ±21 ^{2a}	223 ±27,51 ^a

a : différences significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

a2 : différences hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,001$).

b1 : différences significative par rapport au groupe traité au Ni ($p < 0,05$).



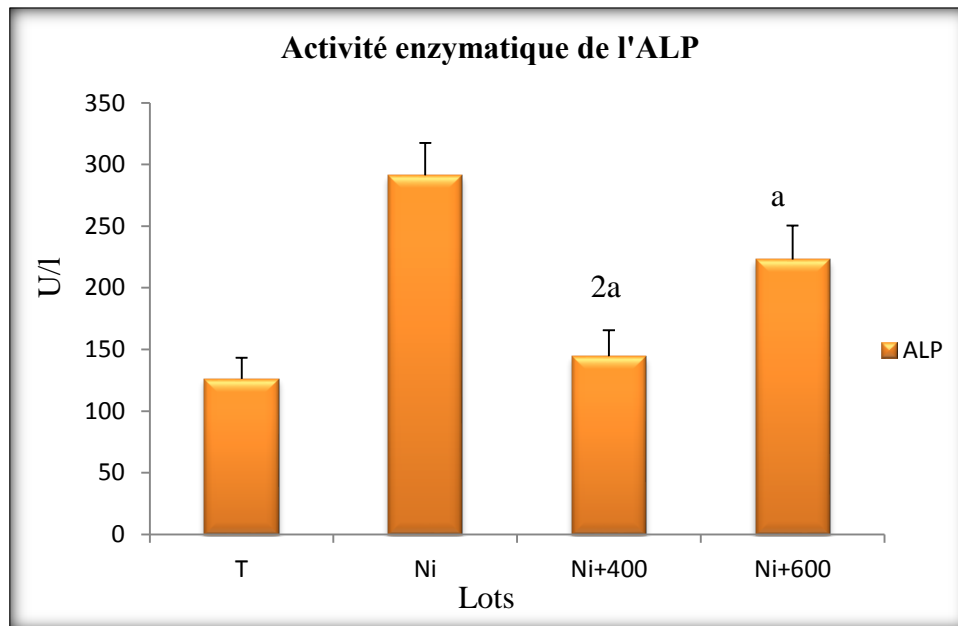


Fig.23. L'activité enzymatique de GOT, GPT et de phosphatase alcaline(ALP) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil

Les résultats illustrés dans le tableau 09, montrent que les valeurs moyennes des marqueurs de la fonction hépatique inflammatoire tels que TGO et TGP augmentent d'une façon statistique non significative chez le groupe traité au nickel, et non significative et significative chez les groupes Ni/Sil par rapport au témoin, ces valeurs diminués d'une façon non significative et significative chez les rats des lots Ni/Sil par rapport au groupe traité au nickel.

L'activité enzymatique de l'ALP a montré une élévation non significative chez les rats traités au nickel par rapport au témoin. On revanche, l'administration de silymarine au groupe traité au nickel, pourrait réduire d'une façon hautement significative et significative les niveaux de cette activité enzymatique par rapport le lot traité au nickel seul.

2-3- Etude hématologique :

Tab.10. Variation du nombre des globules rouges (nGR), globule blancs (nGB), du taux moyen d'hémoglobine(Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil

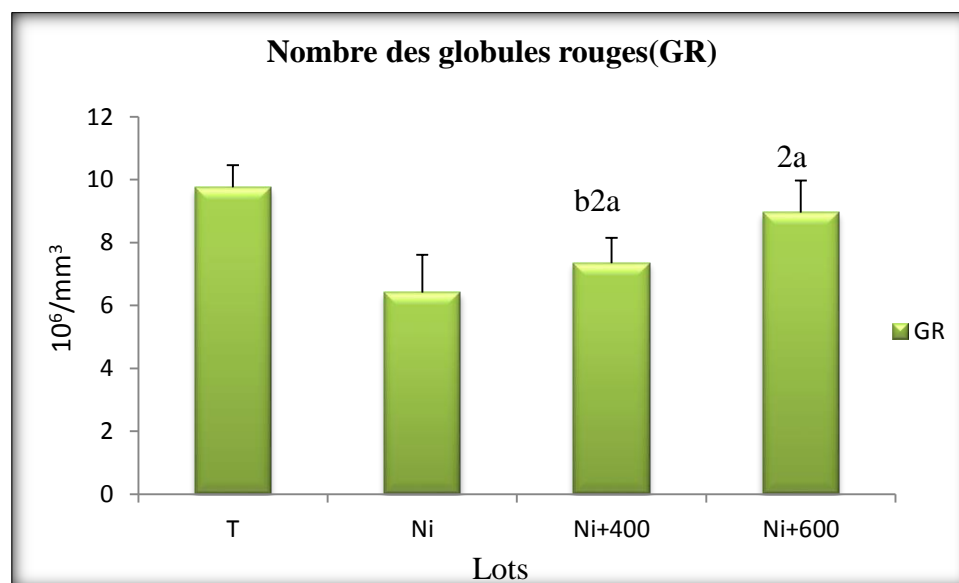
paramét	Les lots expérimentaux			
	témoin	Ni	Ni+Sil 400	Ni+Sil 600
Ngr	9,76 ±0,7	6,41 ±1,2	7,35 ±0,8 b2a	8,95 ±1,02 2a
nGB	11,1 ±0,27	8,9 ±1,29 a	9,21 ±1,53 2a	9,8 ±1,9 b2a
Hb	18,4 ±0,2	10,41 ±2,05	14,8 ±1,59	12,8 ±2,1
Ht	49,1 ±0,2	34,4 ±3,15	39,1 ±3,11 b	43,2 ±3,02 a

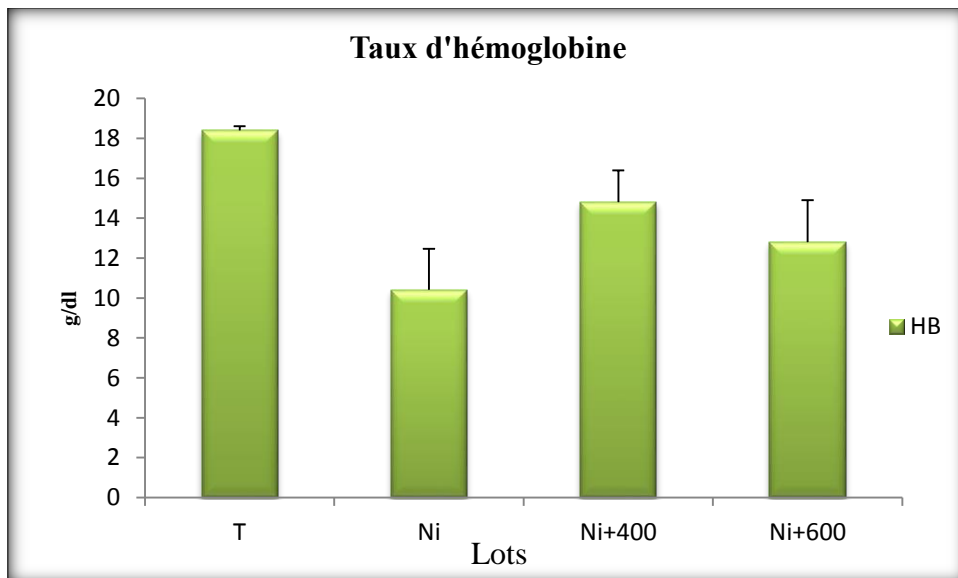
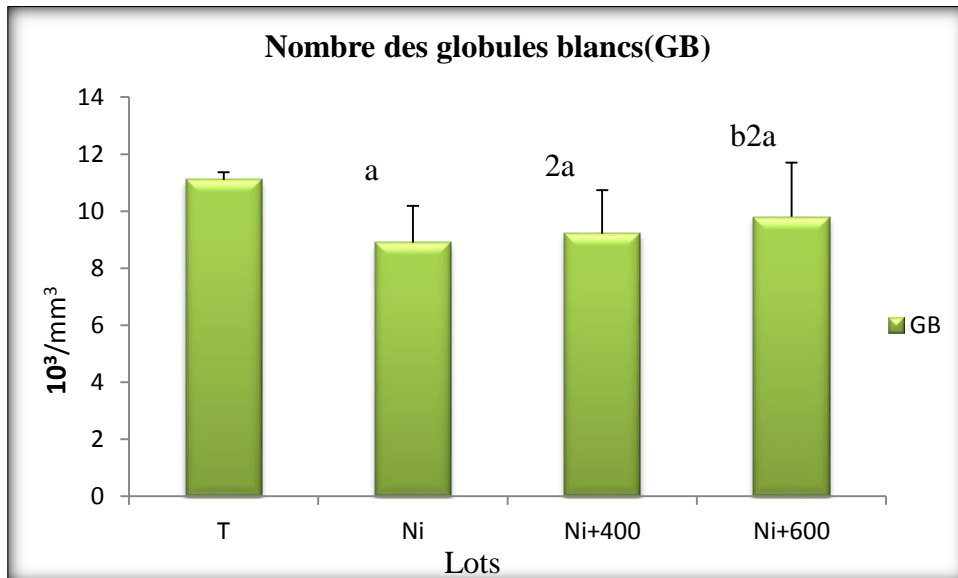
a : différences significative par rapport au témoin ($p < 0,05$).

b : différences significative par rapport au groupe traité au Ni ($p < 0,05$).

2a : différences hautement significative par rapport au témoin ($p < 0,001$).

b2a: différences hautement significative par rapport au groupe traité au Ni ($p < 0,05$) et différences par rapport au témoin. $10^6/\text{mm}^3$





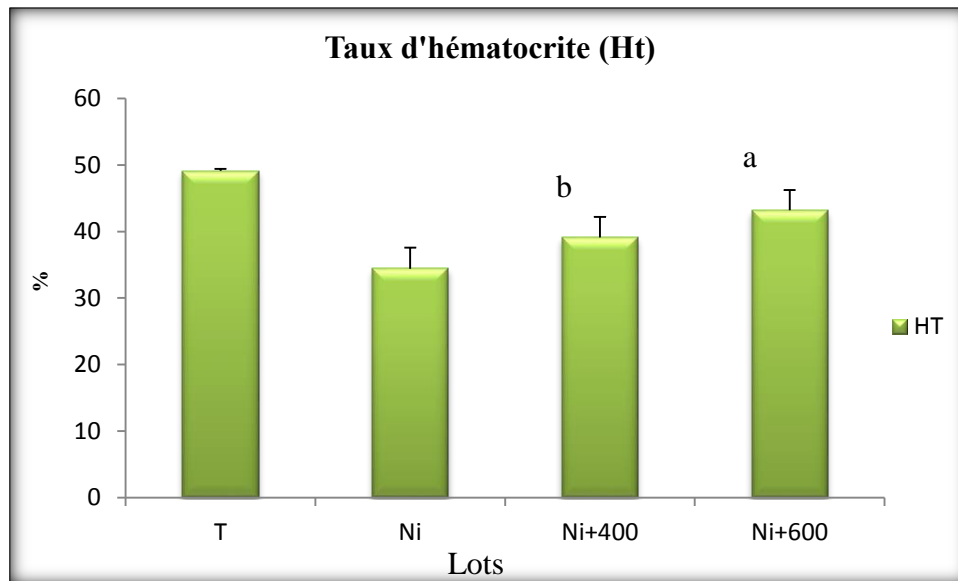


Fig.24. Variation du nombre des globules rouges (nGR), globule blancs (nGB), du taux moyen d'hémoglobine(Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil

En ce qui concerne les paramètres hématologique, nous constatons une diminution non significative, significative et hautement significative des globules rouge et des globules blanc chez le groupe traité au nickel et les lots Ni/Sil par rapport au témoin, elles sont augmenté d'une façon non significative et significative chez les rats des groupes Ni/Sil par rapport au groupe traité au nickel.

L'analyse du taux des Hb et Ht révèle l'existence d'une diminution chez les rats traités. Cette diminution est statistiquement non significative chez les groupes traités pour Hb par rapport au témoin, et elle est significative pour Ht chez les rats des groupes de silymarine par rapport au group témoin. on note une augmentation non significative de Hb, et significative de Ht chez les lots Ni/Sil en comparaison au lot de nickel.

➤ **Les paramètres biochimique :**

Dans nos conditions expérimentales, nous remarquons un déficit pondéral chez les rats traités au nickel par rapport aux témoins. Ceci est en accord avec les constatations de Dostal et al., (1985) ; Paternain et al.,(1988). et Cempel et Janicka., 2002. Cet effet peut être expliqué par l'action de ces métaux lourds sur les fonctions vitales de l'organisme, en influençant ainsi sur le transport des éléments nutritifs par le sang et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le corps.

En revanche, cette baisse du gain de poids corporel est moins importante chez les lots traités au t à la combinaison Ni/Silymarine pour les deux doses de chaque extrait par rapport au lot de témoin. Une action protectrice semblable du silymarin à améliorer le poids corporel des animaux traités dans une autre étude d' Aleksandar et al (2011).

Nos résultats révèlent une diminution de taux du glucose sérique chez les rats traités au nickel et ceux traités à la combinaison Ni/Sily en comparaison avec les rats témoins. Ceci est dû à la diminution de la gluconéogenèse (synthèse du glucose à partir des composés non glucidiques), par inhibition de l'enzyme impliqué dans ce processus qui est le Phosphoenolpyruvate (PECK) (Saker et al., 1999).

Les résultats obtenus révèlent une augmentation bien claire de la concentration sérique du cholestérol et des triglycérides chez les rats traités au nickel par rapport au témoins. Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux pour assurer l'énergie nécessaire aux fonctions vitales de l'organisme. Ce qui est accompagné par une forte activité enzymatique de lipase en présence de l'hormone de glucagon. Ces résultats ont été confirmés dans les travaux de skade et al.,1990.

Tandis que le silymarine à entrainer une diminution de la concentration sérique du cholestérol et du triglycéride, L'inhibition de l'absorption du cholestérol causée par silymarine pourrait être un mécanisme contribuant à des changements positifs dans le profil de cholestérol serique. ces resultats sont confirmés par ceux de (Sobolova et al., 2006 ; Metwallyet al.,2009).

Nous avons constaté une augmentation significative de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les lots traités par rapport au lot témoin. Ceci s'explique la dégradation de plusieurs composés protéiques du corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes qui jouent un rôle important dans ce processus où les protéines peuvent

être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Plusieurs études ont mis en évidence le pouvoir cancérigène du nickel chez l'animal pour l'expositions réalisées par voie orale ou par inhalation (Kasprzak et al., 1985; Ayala-Fierro et al., 1999; Bucher et al., 1999; Wozniak., 2002; Cavallo et al., 2003), du fait que sur le plan clinique, la néphropathie tubulo-interstitielle chronique est diagnostiquée par l'augmentation de l'urée et/ou de la créatinine sanguine (Couréges et al., 1998)

Toutefois chez les rats traité au Ni associé au silymarine on note une diminution significative par rapport au groupe traité au Ni, cette résultats est en accord avec les résultats de Samah et Ibrahim, 2012. Dans le traitement de la Nephro-Hepatotoxicité aigue induite par la Mercure.

Le foie est l'organe cible de la toxicité des métaux lourds et ses cellules définissent des enzymes hépatiques dans le sang, qui sont couramment utilisés comme indice de l'indicateur biochimique de lésions hépato-cellulaire (Dasgupta et al., 1996; Ahmed et al ., 1999). Dans la présente enquête, le nickel a provoqué une augmentation significative dans les activités de GOT, GPT et ALP, probablement en raison des dommages membranaire sur les hépatocytes, entraînant une augmentation de la libération et la fuite de ces enzymes du cytosol du foie dans le sang qui donne une indication sur l'effet hépatotoxique de ce métal (Gama et Eatmad, 2011). Ces résultats sont cohérents avec les résultats précédents par certains groupes de recherche qui ont trouvé une association entre la toxicité du nickel et du stress oxydatif accru de rats (Novelli et al., 1998;. Al Hassan et al., 2010.). Par conséquent, les perturbations biochimiques semblent être en corrélation avec le foie altération histologique comme la présence de débris cellulaires dans une veine centrale et une vacuolisation cytoplasmique. (Nouvelli et al., 1998).

Il a été signalé que l'exposition subchronique par voie orale du nickel entraîne de multiples nécroses au niveau du foie associés à des changements de l'ultrastructure et des altérations hépatiques (Tandon et al., 1984; Mickel et al., 1985; Vyskocil et al., 1993; Iscan et al., 2002).

Plus loin, Leonard et al.,1986 ont accentué qu'il y avait une corrélation excellente entre la sévérité de dégât histologique mesuré produite par une toxine et l'élévation dans l'activité de l'ALT du sérum chez les rats.

La silymarine a diminué de manière significative les niveaux d'AST, ALT, et PAL dans les groupes traité par la combinaison Ni/Sil par rapport au groupe traité du Ni. Cette résultats est confirmée par l'étude de (Babaei et al., 2012) qu'ont trouvés que la silymarine empêche et renverse la toxicité induite par le cadmium, probablement grâce à sa propriété anti-oxydante, une autre étude précédente confirme nos résultats dans laquelle silymarin protégé contre l'hépatotoxicité induite par des médicaments antituberculeux isoniazide, la rifampicine et le pyrazinamide avec la réduction de la AST de sang, d'ALAT et d'ALP enzymes indiquant la fonction hépatique (Eminzade et al., 2008).

➤ Les parametres hematologique

L'Évaluation des effets toxiques des métaux est facilitée par les résultats des tests hématologiques de base (Brucka-Jastrz et al. 2005). Altération des paramètres hématologiques induite par Nickel ont été signalés plus tôt (ATSDR 2003). On a observé une diminution des globules rouges, des globules blancs et de taux d'hémoglobine, des rats traités au nickel par rapport aux témoins, nos résultats sont confirmés par le travail de Kusal et al 2006 qui ont étudié l'effet protectrice de l'acide L-ascorbique dans le système de défense antioxydant dans les érythrocytes des rats exposés au nickel. On a enregistré aussi une diminution de taux de l'hématocrite chez les rats traité au Ni par rapport aux témoins, même résultats trouvé dans l'étude de Jerry et al, 2008 et aussi meme résultat dans l'étude de Adjroud,et Mouffok, 2009.

Les composés du nickel, sont sus pour exposer à des activités de surface différentielles qui resulter en capacité tout à fait différente d'induire l'hémolyse des érythrocytes humain (IARC, 1984 ; Stohs et Bagchi, 1995). Les globules rouges (RBC) a été étudiée il a été montré que les composés de nickel influent sur bicouche lipidique de la membrane des érythrocytes, ainsi que les protéines de la membrane à des degrés divers en fonction du type de composés utilisés (Tkeshelashvili et al, 1989; Vest et al, 2004). Selon d'autre études la toxicité du Ni a une action négative sur l'érythropoïèse puisqu'elle entraîne une diminution de la production d'hématie ce qui déclenche des anémies sévères. Signalons aussi une diminution importante de taux de l'hémoglobine chez les rats traités au nickel par rapport aux témoins. Ceci peut être expliquée par le fait que ce métal Ni inhibe la synthèse de l'hémoglobine (Leach.,1985).

Chez les rats traités par la combinaison Ni/Sil on remarque une augmentation des paramètres hématologiques (Ht, GB, GR, et l'Hb) par rapport aux rats traités au nickel, cet effet de silymarine est confirmé par les recherches de Zeynab et Shereen, 2012 contre la toxicité de tétrachlorure de carbone.

1- Etude phytochimique :**1-1- Matériel végétal :**

Les graines de *Silybum marianum*, ont été cueillies durant le mois de Mai- Juin 2012 dans la région de Guelma. Puis, nous avons séparé manuellement les grains. Les graines sont broyées à l'aide d'un broyeur domestique et la poudre a été stockée sous forme de farines.

L'identification botanique de la plante est faite par Mme BOUHALIT Faculté des Sciences, Département de Biologie Moléculaire et cellulaire, Khenchela).

1-2- Tests préliminaires de la composition chimique :

Les recherches ont porté sur la recherche des principaux groupes chimiques (alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, saponines,) par des réactions en tubes. En utilisant les procédures standard telles que décrites par **Trease et Evans (1989) et Harborne (1998)**.

a) Saponosides :

Dans une fiole renfermant 80 ml d'eau distillé bouillante on introduit 2g de poudre, on maintient l'ébullition modérée pendant 30 min, puis on filtre le mélange. Après refroidissement on agite le filtrat verticalement. L'apparition d'une mousse qui dure quelques instants indique la présence des saponosides .

b) Tanins :

10g de poudre sont extraits par une solution hydro- alcoolique de C_2H_5OH , puis le mélange est filtré et on ajoute au filtrat quelques gouttes d'une solution $FeCl_3$. L'apparition d'une couleur verte confirme la présence des tanins.

c) Alcaloïdes :

5g de la poudre sont mélangés avec 15 ml de H_2SO_4 à 2% dans un récipient et après une demi heure de macération, le mélange est filtré sur un papier filtre. Au filtrat obtenu, on additionne quelques gouttes de réactif de Mayer (5g de KI + 1,358g de $HgCl_2$ solubilisés dans 100 ml d'eau distillé) L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes .

d) Flavonoïdes :

Macérer 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout du NH_4OH .

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

1-3- Méthodes de séparation et de purification :**➤ extraction des Flavonoïdes :**

100 g de graines broyées en une poudre fine, on ajoute un volume du mélange Méthanol /Eau (80:20) puis on laisse macérer pendant trois jours avec renouvellement du solvant chaque 24 heures (350 ml x 3). Les solutions hydro-méthanoliques obtenues sont réunies dans un même récipient pour subir une filtration afin d'obtenir une solution limpide.

Après la filtration, le résidu est ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur R 120 à une température comprise entre 40 à 45°C.



Photo.03: Photo du rotavapor utilisé pour sécher nos extraits aqueux.

➤ La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) :

Le but de cette étape est d'avoir une idée générale sur le contenu en flavonoïdes de l'échantillon à analyser et de choisir le système de solvants adéquat pour la séparation.

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silicagel 60 F254, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur feuille d'aluminium, ce qui constitue la phase stationnaire.

Sur les plaques préparées, on a déposé 10 µl d'extrait (100 mg/ml) et standard (5 mg/ml) de quercitine, d'acide gallique et de Legalon se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire, les plaques sont ensuite introduites dans des cuves conventionnelles en verre préalablement saturée par la phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Quatre systèmes de solvants sont testés (REF) :

- 1- butanol/acide acétique/eau 4/5/1.
- 2- chloroforme/acétone/acide formique 75/16,5 /8,5.
- 3- toluène/butanol/méthanol/éther de pétrole 2/1/1/2
- 4- acétate d'éthyle/méthanol/eau. 50/ 20 /10.

Nous avons retenu celui ayant donné les meilleures séparations (migrations) ; le deuxième (chloroforme/acétone/acide formique 75/16,5 /8,5).

La visualisation des taches (spots) de flavonoïdes a été faite à l'œil nu ou sous lampe UV à 254 nm et 366 nm, dans une chambre noire, puis elles ont été révélées avec FeCl₃.

Pour chaque tache nous avons calculé le facteur de rétention ou rapport frontal (R_f).

$$R_f = \frac{\text{Dis tance parcourue par la substance}}{\text{Dis tance parcourue par le solvant}}$$

1- 4- Analyse quantitative des composés phénoliques :

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols.

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon .Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi en utilisant le réactif de Folin-Siocalteu, tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de Lamaïosn et Carnat (Belguidoum, 2012).

➤ **Dosage des composés phénoliques totaux :**

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par une méthode adaptée de singleton et Ross (en 1965) avec le réactif de folin-Ciocalteu. En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu. (Daels-rakotoarison, 1999).

➤ **Mode opératoire :**

100 µl d'extrait (préparé dans l'eau distillée avec les dilutions convenables) est ajouté à 2 ml de la solution de Na₂CO₃ à 20% , après agitation, 500µl de la solution de Folin Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) est ajouté à l'ensemble, puis maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm contre un blanc sans extrait.

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire, établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0.01-0.3mg/ml) comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait mg E q AG/mgLes concentrations des polyphénols a été déterminé par la formule suivante :

$$C = \frac{A}{K} \cdot D \cdot \frac{V}{P}$$

C : concentration de polyphénols en mg/g.

A : l'absorbance à $\lambda = 760$ nm.

K : tangente de l'acide gallique. (nm*ml/mg).

D : nombre de dilution.

V : volume de récupération de l'extrait. (ml).

P : le poids d'initial de la plante (10 g).

1-5- Activité antiradicalaire des flavonoïdes :

Le DPPH (Diphenylpicrilhydrazyl) est, pratiquement, le radical libre le plus stable. En

solution dans le méthanol, le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 517 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH.

$$\% \text{ DPPH réduit} = [(DO \text{ contrôle} - DO \text{ E}) / DO \text{ contrôle}] \times 100$$

Où :

DO contrôle est l'absorbance du DPPH à t0.

DO E est l'absorbance après avoir ajouté l'extrait.

50µl des solutions d'extraits ou standard (quercétine) sont ajoutés à 1,95ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%), le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm (Mansouri et al. ,2005). Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0-3,5mg/ml, pour les extraits .

2-Etude biologique :**2-1-Matériel animal :**

Notre étude expérimentale a porté sur un échantillon de 24 rats males de la souche wistar. Pubères (ages de 8 semaines) pesants entre 150 - 270 g à leur arrivée provenant de « l'institut Pasteur » d'Alger.

➤ Conditions d'élevage :

Les rats sont regroupés par 6 dans des cages en polyéthylène, grillagées, munie par une mangeoire et un biberon d'eau. Les cages sont nettoyées régulièrement et tapissées d'une litière, qui est changée une fois tous les deux jours.

Les rats sont acclimatés pendant deux semaines avant de les mettre sur les différents traitements. A une température de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, une hygrométrie de 70% et une photopériode naturelle ($12^{\text{h}}/12^{\text{h}}$).

Les rats ont libre accès à l'eau et à une nourriture bien équilibrée (ONAB annaba, algérie) elle contient tous les éléments nécessaires pour la croissance naturelle des rats (glucides, lipides, protéines, vitamines et minéraux).

2-2 - Méthodologie :**2-2-1- Protocole expérimental :**

Les 24 rats males sont répartis en 4 groupes égaux de 6 rats chacun, les animaux témoins et traités sont pesés chaque deux jours le matin, durant la période du traitement (21 jours). et administré par gavage. les traitements ont été effectués comme suite :

* lot témoin qui reçoit le sérum physiologique (0.9% NaCl) durant la période du traitement.

* lot traité au nickel sous forme de sulfate de nickel hexa hydrate $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sigma, produits chimiques, st louis, MO) à raison de 20mg /kg IP (borders et apillian, 1983) préparés dans le sérum physiologique.

* lot traité à la même dose de sulfate de nickel (20 mg /Kg) avec l'administration PO de l'extrait brut méthanolique du chardon marie (400 mg /kg) préparé dans l'huile de maïs

* lot traité à la même dose de sulfate de nickel (20mg /Kg) avec l'administration PO de l'extrait brut méthanolique du chardon marie (600mg /kg).

2-2-2- Préparation des prélèvements :

Le sacrifice des animaux a été effectuée dans la matinée.

a) Prélèvement sanguin :

Les prélèvements sanguins ont été faits après décapitation rapide , le sang artérioveineux a été recueilli , sur des tubes :

- EDTA, pour le dosage des paramètres hématologiques (nombres des globules blanc et rouges , hématocrite, hémoglobine
- Sec, sans anticoagulant, qui subit une centrifugation de 3000 tours/minute, pendant 10 minutes, le sérum obtenu est séparé en trois fractions dans des tubes Ependorf, puis mis au -20°C jusqu'au moment du dosage biochimique.

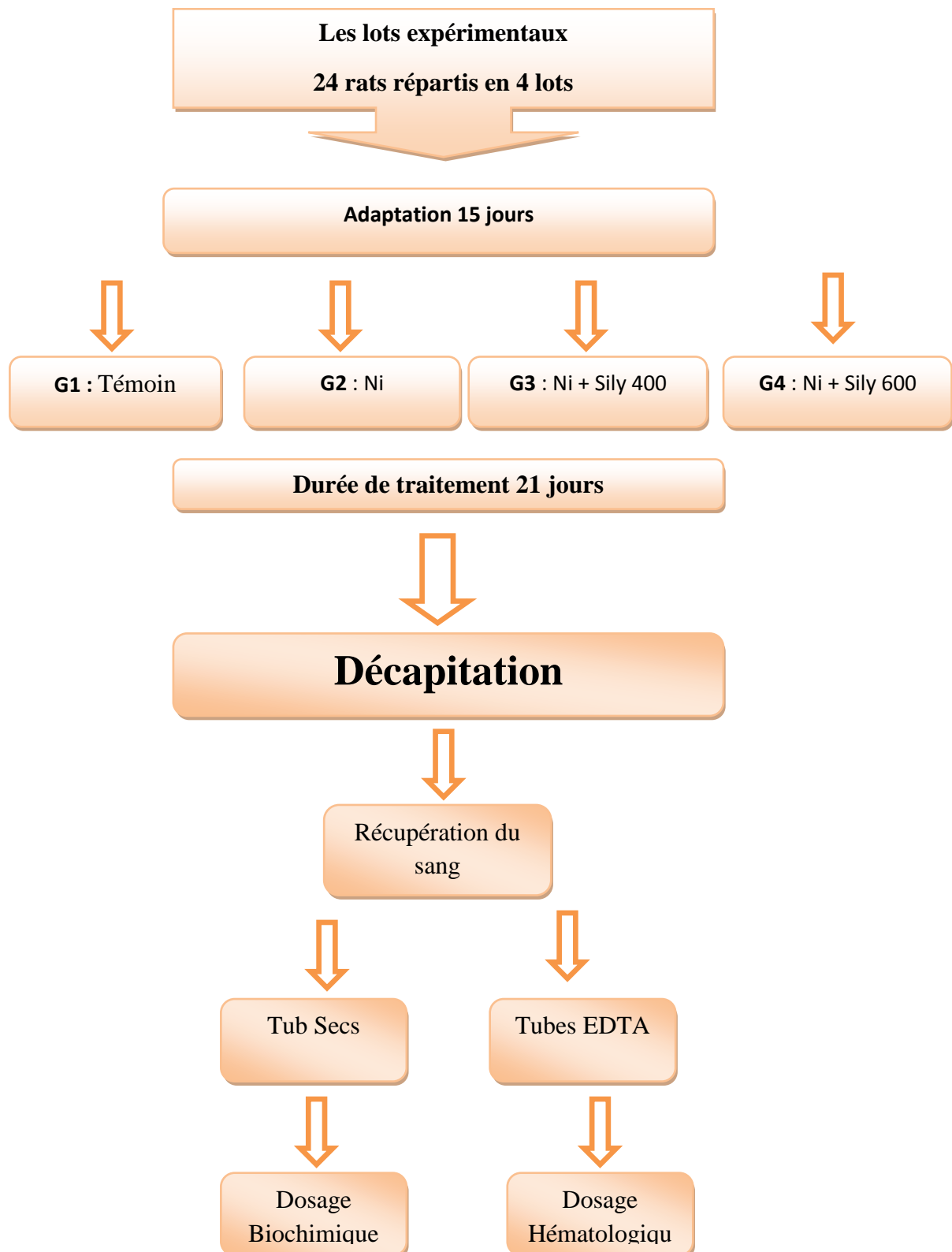


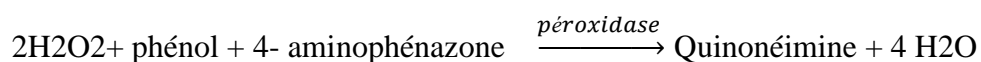
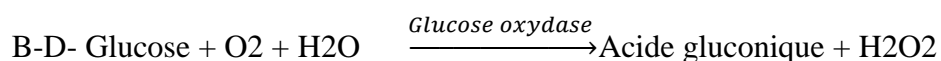
Fig.15. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2-2-3- Dosage des paramètres biochimique :

a) Dosage de glucose : (Kaplan,1984) selon la fiche technique Spinreact .

▪ Principe :

Le glucose est mesuré après une oxydation enzymatique en présence du glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit en présence de la peroxydase, avec un phénol et la 4- amino- phénazone pour former un composé rouge violet de quinonéimine qui sert d'indicateur coloré, selon les réactions suivantes :



▪ Echantillon : Serum.

▪ Les réactifs utilisés :

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R1)	TRIS pH 7,4 phénol	92 m mol/ L 0,3 m mol/ L
Tampon	Glucose oxydase (GOD) Peroxydase(POD) 4-aminophénazone (4- AP)	15000 U/L 1000 U/L 2,6 m mol/ L
Glucose cal	Etalon de glucose aqueux primaire	100 mg/dl

- **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (ul)	-	10	-
Echantillon (ul)	-	-	10

-Mélanger et incuber pendant 10 min à 37°C.

-Lire l'absorbance optique à 500 nm de l'étalon et de l'échantillon contre le blanc dans les 30 minutes.³³

- **Calcul :**

$$[\text{Glucose}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 100$$

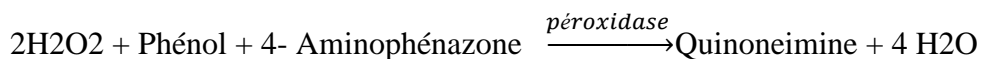
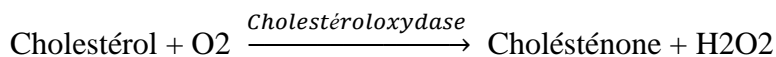
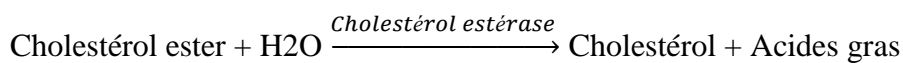
La concentration de l'étalon=100 mg/ dl

Facteur de conversion :mg/ dl \times 0,055 = m mol/l

b) Dosage de cholestérol : (Naito,1984) selon la fiche technique **Spinreact .**

- **Principe :**

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon les réactions suivantes :



- **Echantillon :** Sérum.

- **Les réactifs utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	PIPES pH 6,9	90 m mol/ L
Tampon	Phénol	26 m mol /L
R2	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
Enzymes	Cholestérol oxydase	300 U/L
	(CHOD) Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4- Aminophénazone (4- AP)	0,4 m mol/ L
Etalon	Cholestérol	200 mg/ dl

- **Préparation du réactif de travail (RT) :**

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole de réactif R1. -

Mélanger bien la solution jusqu'à elle devient homogène. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à la température ambiante.

- **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (ul)	-	10	-
Echantillon (ul)	-	-	10

-Mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à la température ambiante.

-Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc, la couleur est stable pendant une heure.

- **Calcul :**

$$[\text{Cholestérol}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200$$

La concentration de l'étalon=200 mg/ dl

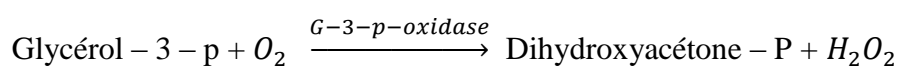
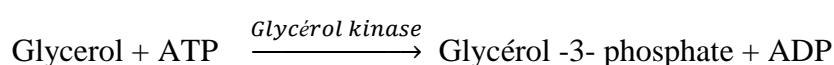
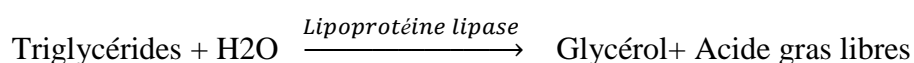
Facteur de conversion :mg/ dl \times 0,025 = m mol/l

c) **Dosage des triglycérides : (Buccolo, 1973 ; Fossati P , 1982)** selon la fiche technique **Spinreact**.

▪ **Principe :**

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipases.

L'indicateur est une quinone formée d'après les quatre réactions suivantes:



- **Echantillon :** Sérum.
- **Les réactifs utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	GOOD pH 7,5	50 m mol/L
Tampon	P- chlorophénol	2 m mol/ L
R2	Lipoprotéine Lipase (LPL)	150000 U/L
Enzymes	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3- P- Oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase	440U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 m mol/ L
	ATP	0,1 m mol/ L
Etalon	Triglycérides	200 m mol/L

- **Préparation du réactif de travail (RT) :**

- Dissoudre le contenu du réactif R2 dans la fiole de réactif R1.
- Mélanger bien la solution jusqu'à ce qu'elle devienne homogène. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à la température ambiante.

- **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (ul)	-	10	-
Echantillon (ul)	-	-	10

- mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à 15-25°C.
- Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon contre le blanc à 505 nm dans les 30 minutes.

- **Calcul :**

$$[\text{Triglycérides}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{étalon}}} \times 200$$

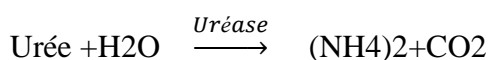
La concentration de l'étalon = 200 mg/ dl

Facteur de conversion : mg/ dl \times 0,011 = m mol/l

d) Dosage de l'urée : (Kaplan et al., 1984) selon la fiche technique Spinreact

- **Principe :**

La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode enzymatique utilisant l'uréase selon la réaction suivante :





Les ions ammonium peuvent réagir avec le salicylate et di hypochlorite de sodium pour donner un complexe coloré en vert.

- **Echantillon :** Sérum.
- **Les réactifs utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	Phosphate	50 m mol/ L
Tampon	EDTA	2 m mol/ L
	Salicylate de sodium	60 m mol/ L
R2	Hypochlorite de sodium	140 m mol/ L
NaClO	Hydroxyde de sodium	150 m mol/ L
R3 Enzyme	uréase	3000 U/L
R4 Etalon	Etalon de l'urée aqueux primaire	50 mg/dl

- **Préparation du réactif de travail (RT) :**

- Dissoudre un comprimé de R3 enzyme dans la fiole de R1
- Mélanger bien et doucement jusqu'à la dissolution complète.

- **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (ul)	-	10	-
Echantillon (ul)	-	-	10
Mélanger, et incuber pendant 5min ou 10 min à la température de 25°C			
R2 NaClO(ml)	1,0	1,0	1,0

Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 580 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min à 15-20°C.

- **Calcul :**

$$[\text{Urée}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 50$$

e) **Dosage de la créatinine :** (Murray et al., 1984) selon la fiche technique Spinreact

- **Principe :**

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

- **Echantillon :** Sérum

- **Les réactifs utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	Acide picrique	17,5 mol/ L
R2	Hydroxyde de sodium	0,29 mol/ L
Etalon	Etalon de la créatinine aqueux primair	2 mg/ dl

Préparation et stabilité :

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

Réactif du travail : mélanger à part égales R1 et R2.

- **Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (ul)	-	100	-
Echantillon (ul)	-	-	100

Mélanger et lire la densité optique DO1 après 30 sec, à 492 nm

Lire ensuite DO2 exactement 1minute après.

- **Calcul :**

Calculer $\Delta DO = DO2 - DO1$ pour pour le standard et les échantillon

$$[\text{Créatinine}] \text{ (mg/dl)} = \frac{\Delta DO \text{ échantillon}}{\Delta DO \text{ étalon}} \times 2$$

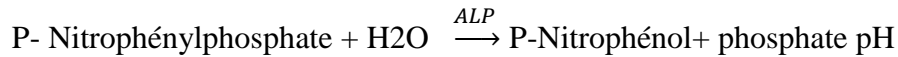
La concentration de l'étalon=2 mg/ dl

Facteur de conversion :mg/ dl \times 88,4 = m mol/l

f) **Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) : (Wenger et Kaplan,1984)** selon la fiche technique **Spinreact** :

▪ **Principe :**

L'activité enzymatique de la PAL est déterminée selon la réaction suivante:



- **Echantillon :** Sérum.
- **Les réactifs utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	-Diethanolamine (DEA) pH 10,4	1 m mol /L
Tampon	-Chlorite du magnésium	0,5 m mol/ L
R2	P-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 m mol!L
Substrat		

▪ **Préparation du réactif de travail (RT) :**

- Dissoudre un comprimé du R2 dans une fiole du R1
- Mélanger doucement jusqu'à la dissolution complète. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 5 jours à la température ambiante.

▪ **Mode opératoire :**

Réactif de travail (ml)	1,2
Echantillon (ul)	50

- Mélanger et incuber les tubes pendant 1 min.
- Lire l'absorbance initiale (A) des échantillons à 405 nm avec trois répétitions (chaque 1 minute d'incubation).

▪ **Calcul :**

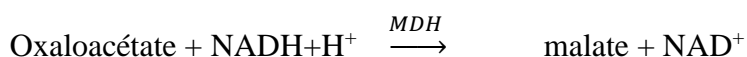
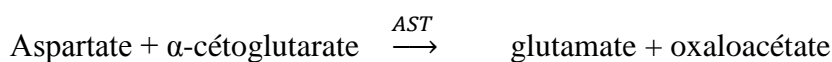
$$\text{Activité PAL (U/L)} = \ddot{A}A / \text{min} \times 3300$$

$\ddot{A}A / \text{min}$: la valeur moyenne des trois lectures par minute.

g) Dosage de TGO : (Bergmyer, 1980) selon la fiche technique spinréact

▪ **Principe :**

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi L'oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH,H⁺ :



▪ **Echantillon :** Plasma.

▪ **Réactif utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	-Tris pH 7.8	80 mmol/L 200 mmol/L
Tampon	-L- Aspartate	0.18 mmol/L 800 U/L
R2	-NADH	600 U/L
Substrat	-Lactate déhydrogenase (LDH) -Malate déhydrogenase (MDH) - α -cétoglutarate	12 mmol/L

▪ **Préparation du réactif :**

Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

▪ **Mode opératoire :**

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (ul)	100

Mélanger, incubé pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance (A) initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

▪ **Calcul :**

La concentration de TGO est calculée par la formule suivante :

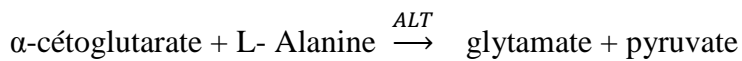
$$\text{Activité TGO (U/L)} = \ddot{A}/\text{min} \times 1750$$

\ddot{A}/min : la valeur moyenne des trois lectures par minute.

h) Dosage de TGP : (Bergmyer, 1980) selon la fiche technique spinréact :

▪ **Principe :**

Le principe est présenté selon la réaction suivante :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon.

- **Echantillon :** Plasma.
- **Réactif utilisés :**

Réactifs	Composition	Concentration
R1	-Tris pH 7.8	100 mmol/L
Tampon	-L- Alanine	500 mmol/L
R2	-NADH	0.18 mmol/L
Substrat	-Lactate déhydrogenase (LDH)	1200 U/L

▪ **Préparation du réactif :**

Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C.

▪ **Mode opératoire :**

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (ul)	100

Mélanger, incubé pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (\ddot{A} Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

▪ Calcul :

La concentration de TGP est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité TGP (U/L)} = \text{AA/min} \times 1750$$

2-2-4- Evaluation de la toxicité hématologique :

La toxicité hématologique a été mise en évidence à travers la détermination de la formule sanguin numérique (FNS).

• L'hémogramme :

L'hémogramme a été réalisé sur un automate : le CELL-DYN 1700. C'est un appareil qui permet la numération des éléments figurés du sang par impédance, la mesure du taux d'hémoglobine par spectrophotométrie, le calcul des constantes érythrocytaires avec des alarmes pour tous les paramètres.

• Principe :

L'appareil aspire 30 µl de sang total bien homogénéisé à partir d'un tube de prélèvement ouvert et maintenu au contact de la sonde d'aspiration.

Un volume de 7,5 ml de diluant est ajouté dans la cuve de pré mixage pour atteindre un rapport de dilution 1/251.

L'échantillon dilué est alors divisé en deux parties distinctes.

- 100 µl de l'échantillon dilué sont mélangés avec 5 ml de diluant pour l'analyse des paramètres érythrocytaires et plaquettaires.

- Le reste est mélangé avec 1 ml de réactif de lyse dans la chambre de mélange pour les globules blancs. Ce réactif altère les membranes des globules rouges et permet la libération de l'hémoglobine. Cette dilution est utilisée pour mesurer les globules blancs ainsi que le taux d'hémoglobine.

L'impédance électrique est utilisée pour effectuer le comptage des globules. Dès qu'une cellule se présente devant l'ouverture, une modification de la résistance électrique se produit, ce qui a pour effet de générer un pic de tension équivalent. Le nombre de pics correspond au nombre de cellules.

L'amplitude de chaque pic, est directement proportionnelle au volume de la cellule qui lui a donné naissance.

Le CELL-DYN 1700 mesure l'hémoglobine par spectrophotométrie. La longueur d'onde de la source lumineuse est de 540 nm.

L'hématocrite, la CCMH et la TCMH sont calculés dès que les paramètres concernés sont mesurés :

Hématocrite= Volume Globulaire Moyen \times nombre de globules rouges

CCMH = hémoglobine / hématocrite

TCMH = hémoglobine / nombre de globules rouges

2-2-5- Analyse statistique des données :

L'analyse statistique des données a été effectuée grâce au logiciel *MINITAB* (Min, Ver. 13.31). Une analyse de la variance à un critère de classification « ANOVA » et une comparaison des moyennes par le test *t* de *Student* ont été effectuées. $p \leq 0,05$ est considéré comme significatif.

Conclusion et perspectives

Nos résultats montrent que le nickel administré chez des rats de souche Wistar généré un stress oxydant qui réfère à une perturbation dans la balance métabolique, les paramètres hématologique et biochimique. Dans notre étude aussi et après la caractérisation phytochimique et la recherche d'activité antioxydante à partir d'une plante médicinale *silybum marianium*, l'effet de l'extrait brut méthanolique est tester sur la toxicité de nickel et à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que:

- cette espèce constitue un ensemble riche en substances actives à savoir les saponosides, les alcaloïdes, et les flavonoïdes. En plus, la chromatographie sur couche mince a confirmé la présence du principal constituant actif qui est la silymarine.
- l'étude physiologique montre un déficit pondéral remarquable. chez le groupe traité au nickel. Signalons que la Silymarine a amélioré l'effet de nickel sur le poids.
- Pour les paramètres biochimique le nickel a provoqué une diminution de glucose, avec une augmentation des triglycérides, de cholestérol, de l'urée, et de la créatinine, aussi l'augmentation de l'activité enzymatique des marqueurs hépatique, les transaminases (TGO et TGP), et de la phosphatase alcaline (ALP) Or le traitement par l'extrait de chardon marie a amélioré ces paramètres biochimiques, et restauré l'activité des transaminases.
- une perturbation des paramètres hématologiques ; la diminution de nombres des globules rouges, des globules blanc, d'hémoglobine et d'hématocrites chez le groupe traité aux nickel, ces taux sont changés par l'addition de silymarine.

Nous concluons que l'extrait méthanolique de *silybum marianium* a montré un remarquable effet cytoprotecteur contre les radicaux libres générés par le nickel.

Vu l'importance de ces résultats, il serait intéressant de poursuivre la recherche, on prend en considération les recommandations suivantes :

- Appréciation de l'activité antioxydante de cette plante à travers l'analyse de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification.
 - Etudier l'histologie des organes.
 - Prolonger la durée du traitement de 3 à 6 mois et plus en présence de différentes doses du xénobiotiques et Travailler sur d'autres dérivés de nickel,
-

- Développer la recherche in vitro afin bien connaître le mécanisme réel par lequel agit la silymarine sur le nickel
 - Détermination la distribution et la concentration de xénobiotique dans le sang et quelques organes cibles en particulier le foie et les reins.
-

Liste des tableaux

N°	Tableau	Page
01	Propriétés physiques et chimiques des composés de nickel. D'après Kirk (1981).	2
02	Tableau récapitulatif des principaux antioxydants et de leurs modes d'action. D'après Powers et Jackson (2008).	29
03	Rendements des extractions exprimés en g de matière sèche et en % par rapport au poids du graines	66
04	Résultats des réactions de caractérisation	66
05	Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits des graines de <i>Silybum marianum</i> ainsi que ceux des témoins utilisés.	70
06	Variation de gain du poids corporel chez le lot témoin (T) et traités au nickel et à la combinaison Ni/Silymarine	71
07	Variation de la concentration sérique du glucose, des triglycérides, du cholestérol chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.	73
08	Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.	75
09	L'activité enzymatique de GOT, GPT et de phosphatase alcaline(ALP) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil	76
10	Variation du nombre des globules rouges (nGR), globule blancs (nGB), du taux moyen d'hémoglobine(Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil	79

Listes des figures

N°	Figure	Page
01	interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchioalveolar du poumon. (Oller et al. 1997).	12
02	Sources cellulaires et interconversions des ROS et RNS. (Beaudoux J L et al , 2006)	16
03	Principales sources cellulaires de radicaux libres (Bonnefond-Rousselot et coll., 2003).	20
04	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR(D'après Kohen et Nyska, 2002).	21
05	Les trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev et Davies, 2008).	23
06	Sites d'action des nutriment antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (d'après OPARA, 2002).	25
07	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (d'après Matés, 1999)	25
08	Structure générale du noyau des flavonoïdes (D'après Heim et al., 2002)	30
09	Structures des différentes classes de flavonoïdes(Gamet-Payraastre et al., 1999).	31
10	Réaction des flavonoïdes avec les EOR(D'après Densiov et Afanas'ev, 2005)	33
11	Piégeage des ROS (R·) par les flavonoïdes	34
12	Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić et al, 2003)	35
13	Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me ⁺ⁿ) (Tiqwari, 2001)	37
14	Les flavanolignanes majeures de la silymarine	44
15	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.	53
16	Droite d'étalonnage de l'acide gallique	68

17	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH● en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'extrait méthanolique.	69
18	Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de Silybum marianum et des standards.	70
19	Evaluation en fonction du temps (jours), gain du poids corporel (g) chez le lot témoin et les lots traités au nickel, et à la combinaison Ni/Sil.	72
20	Variation de poids chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.	73
21	Variation de la concentration sérique du glucose des triglycérides, du cholestérol chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil.	75
22	Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil	77
23	L'activité enzymatique de GOT, GPT et de phosphatase alcaline(ALP) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil	79
24	Du nombre des globules rouges (ngr), globule blancs (ngb), du taux moyen d'hémoglobine(Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht) chez le lot témoin(T) et les lots traité au Ni, et à la combinaison Ni/Sil	82

Liste des photos

N°	Photo	Page
01	la fleure de chardon marie	40
02	Les fruits chardon marie	40
03	Photo du rotavapor utilisé pour sécher nos extraits aqueux	45
04	l'extrait méthanolique de chardon marie	65

- ✓ **Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F.** (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherapy Research*, 24, 1423–1432.
 - ✓ **Agency for Toxic Substances and diseases Registry (ATSDR).** Toxicological profile for nickel. **2003**, US department of Health and Human Services, ATSDR. Atlanta, Georgia, USA: US Government Printing.
 - ✓ **Ambros ,A.M.,Larson P.S., Borzelleca J.R and Henniga G.R.**(1976). Long-term Toxicologic Assesement of nickel in rats and dogs, *J. Food Sci. Technol.*13: 181-187.
 - ✓ **American Biogenics Corporation.** (1988). Ninety day gavage study in albinos rats using nickel. US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste. Research Triangle Institute and American Biogenics Corporation. Final report.
 - ✓ **Anonyme,** (1984). Document technique n°01. Station nationale d'essais de semences. Liste alphabétique des principales espèces de plantes cultivées et des mauvaises herbes. Noms latins et noms communs français. 2eme Ed. Ed Geues.
 - ✓ **Association minière du Canada.** (1991). les mines au Canada :faits et chiffres, Ottawa(Ont).
 - ✓ **Atsdr.** (1997). Toxicological Profiles for nickel. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Services.
 - ✓ **Atsdr.** (1988). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, «Toxicological Profile for Nickel», ATSDR/TP-88/19, 111 p.
 - ✓ **Atsdr.,**(1997).Toxicological Profile for Nickel. (Final Report). NTIS Accession NO.PB98-101199.Atlanta,GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.293.
 - ✓ **Baize D.** (1997).Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA Edition, Paris, 408 p.
 - ✓ **Barceloux, D.G. J.** (1999) . *Toxicol.Clin. Toxicol.*, 37, 239-258.
 - ✓ **Beaudeau J L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, and Peynet J.** (2006).Composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* 2 :144–150.
 - ✓ **bel khada, J.** (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. ISBN. IBIS Press, p202.
-

- ✓ **Beloued, A.** (1998). Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des publications Universitaires INA EL HRACH, p 68.
 - ✓ **Bencko V., Wagner V., Wagnerova M. and Reichrtova E.** (1983) . Immuno-biochemical findings in groups of individuals occupationally and non-occupationally exposed to emissions containing nickel and cobalt. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, **27**, 4, 387-394.
 - ✓ **Bencko V., Geist T., Arbetova D., Dharmadikari D.M. and Svandova E.** (1986) - Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to some trace elements. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, **30**, 1, 1-10.
 - ✓ **Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H.** Identification of 4- hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta*.
 - ✓ **Beniston, NT. WS.** (1984). Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise Nationale de livre Alger p274.
 - ✓ **Beniston, NT. WS.** (1984). Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise Nationale de livre Alger p274
 - ✓ **Bennett BG.** (1984). Environmental Nickel Pathways to man.In:'Nickel in the human environment'. Proceedings of a joint symposium held at IARC Lyon France International Agency for **Research on Cancer** 487-495.
 - ✓ **Benson J.M., Burt D.G., Cheng Y.S., Eidson A.F., Gulati D.K., Hahn F.F., Hobbs C.H. and Pickrell J.A.** (1990) - Subchronic Inhalation Toxicity of Nickel Subsulfide to Rats and Mice. *Inhal Toxicol*, **2**, 1-19.
 - ✓ **Benson JM, Barr EB, Bechtold WE, et al.** (1994). Fate of inhaled nickel oxide and nickel subsulfide in F344/N rats. *Inhal Toxicol* 6:167-183.
 - ✓ **Bezanger., beauquesne L., Pinka M., Trotin F.** (1990). Plantes médicinales des régions tempérées. 2eme édition .Maloin .Paris: 45-65.
 - ✓ **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Beaudeau, JL., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J.** (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann Biol Clin* 59 (4) : 453-459.
 - ✓ **Bosisio E, Benelli C, Pirola O.** (1992). Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacological Research*, **25**, 147-165.
-

- ✓ **Bruneton J.** (2009). pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 3ème édition. Tec & Doc Lavoisier. 1120 p.
 - ✓ **Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plants médicinales. 3eme édition.Lavoisier. Paris.
 - ✓ **Bruneton, J.** (1964). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris,Lavoisier. Ishii, K., Furuta, T., et Kasuya, Y. (2003). "High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection." *Journal of Chromatography B* 794(1): 49-56.
 - ✓ **Burnie G.** (1997). Encyclopédie de botanique et de l'horticulture. Plus de 10.000 plantes du monde entier. Ed. Random house Australia ptyltd. P 843
 - ✓ by Springborn Laboratories, Inc., Spencerville, OH, for Nickel Producers Environmental Research Association, Durham, NC (Study No. 3472.2).
 - ✓ **Cai Y & Zhuang Z.** (1999). AND damage in human peripheral blood lymphocyte caused by nickel and cadmium., *Zhonghua Yu fange Yi Xue Za Zhi*.33:75-77.
 - ✓ **Calnan ,CD.**(1956). Nickel dermatitis. *Br . Dermatol Clin*.68 : 229-36.
Cancer Res 1994; 54 : 6407-12.
 - ✓ **Carames C.** (1990). Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie, leurs plantules, leurs semences. Publication agricole n° 27. p 102 – 3. *Chem. Enge. News.* (1991) .69 (37): 25.
 - ✓ **Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G.** (1992). Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model: Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. *Biochemical Pharmacology*, 43, 2111–2115.
 - ✓ **Casley-Smith JR.** (1986). The importance of the lymphatic system. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 24:53.
 - ✓ **Chashschin V.P., Artunina G.P. and Norseth T.** (1994). Congenital defects, abortion and other health effects in nickel refinery workers. *Sci Total Environ*, **148**, 2-3, 287-291.
 - ✓ **Chen CY, Huang YF, Huang WR, Huang YT.** (2003). Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* b; 189 : 153-9.
 - ✓ **Chen CY, Huang YF, Lin YH, Yen SF.** (2003). Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Arch Toxicol* a; 77 : 123-30.
-

-
- ✓ **Christensen OB et Lagesson V.** (1981). Nickel concentration of blood and urine after oral administration'. *Ann Clin Lab Sci* 11:2,119-125.
 - ✓ **Clemons G, Garcia JF.** (1981). Neuroendocrine effects of acute nickel chloride administration in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*; 61 : 343-8.
 - ✓ **Coogan , T.P ., Latta, D. M., Snow E.T and Costa M.**(1989). **Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds, in: Critical Reviews in toxicology, Vol 19.** McClellan,R.O., ed., CRC Press, Boca Raton, FL. PP. 341-384
 - ✓ **Cornell R.G. and Landis J.R.** (1984). Mortality patterns among nickel/chromium alloy foundry workers. Nickel in the Human Environment. Lyon, France, IARC scientific publication, vol n.53, pp. 87-93.
 - ✓ **Costa M, Salnikow K, Sutherland J E, Broday L, Peng W, Zhang Q & Kluzi T.** (2002). The role of oxidative stress in nickel and chromate geotoxicity'. *Mol Cell Biochem.* 234-235, 265-275.
 - ✓ **Costa, M.; Simmons-Hansen, J.; Bedrossian, C.W.M.; Bonura, J.; Caprioli, R.M.** *Cancer Res.* (1981). 41, 2868-2876.
 - ✓ **Cox J.E., Doll R., Scott W.A. and Smith S.** (1981). Mortality of nickel workers: experience of men working with metallic nickel. *Br J Ind Med*, 38, 3, 235-239.
 - ✓ **Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C and Remesy C.** (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277:G120-126.
 - ✓ **Crespy, V., C. Morand, C., Besson, C., Manach, C., Christian, D., et Rémaéy, C.** (2001). "Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats." *The Journal of Nutrition* 131(8): 2109-2114.
 - ✓ **Crocenzi FA, Basiglio CL, Pérez LM, Portesio MS, Pozzi EJS, Roma MG.** (2005). Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP. *Biochem. Pharmacol.*, 69, 1113–1120.
 - ✓ **D'ANDREA V , Pérez LM, Sánchez Pozzi EJ.** (2005).Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci.*, 77, 683–692.
 - ✓ **Dacosta, E.** (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
 - ✓ **Dai J, and Mumper R J.** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* 15 :7313-7352, 2010.
-

- ✓ **Daldrup T, Haarhoff K, Szathmary SC.** (1983). Toedliche nickel sulfaye-intoxikation. *Berichte zur Serichtlichen Medizin*; 41 : 141-4.
 - ✓ **Das KK, Buchner V.** (2007). Effect of nickel exposure on peripheral tissues: Role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. *Rev Environ Health*; 22 : 133-49.
 - ✓ **Das KK, Dasgupta S.** (2002). Effect of nickel sulphate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. *Environ Health Perspect*; 110 : 923-6.
 - ✓ **Deák G, Müzes G, Láng I, Nékám K, González-Cabello R, Gergely P, et al.** (1990). Effects of two bioflavonoids on certain cellular immune reactions in vitro. *Acta Physiol Hung*, 76, 113–121.
 - ✓ **Deysson, G.** (1979). Organisation et classification des plantes vasculaires. 2eme partie.
 - ✓ **DODD, J.** (1989). Phenology and seed production of varbегatee thistle. *Silybum marianum (L) Gaertn.*, in Australie in relation to mechanical an biological control. *Weed Research* 29 , pp 255-263.
 - ✓ **Dolovich J., Evans S.L. and Nieboer E.** (1984). Occupational asthma from nickel sensitivity: I. Human serum albumin in the antigenic determinant. *Br J Ind Med*, 41, 1, 51-55.
 - ✓ **Dostal, L. A., Hopfer, S. M., Lin S. M and Sunderman, FW Jr.** (1989). Effects of Nickel chloride on Lactating rats and their sucking pups, and the transfer of nickel throughralmilk *Toxicol Appl Pharmacol.*101(2): 220-31.
 - ✓ **Duke JM.** (1980a). Nickel in rocks and ores. Nickel in the environment. J.O. Nriagu John Wiley and Sons, New York, NY 27-50.
 - ✓ **Dunnick J.K., Elwell M.R., Benson J.M., Hobbs C.H., Hahn F.F., Haly P.J., Cheng Y.S. and Eidson A.F.** (1989) - Lung toxicity after 13-week inhalation exposure to nickel oxide, nickel subsulfide, or nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 12, 3, 584-594.
 - ✓ **Eiserich J P, Patel R P, O'Donnel V B.** (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules . *Molec. Aspects. Med.*, 19:222.
 - ✓ **Enterline P.E. and Marsh G.M.** (1982). Mortality among workers in a nickel refinery and alloy manufacturing plant in West Virginia. *J Natl Cancer Inst*, 68, 6, 925-933.
-

- ✓ **EPA (US Environmental Protection Agency).**(1985). *Drinking water criteria document for nickel*. NTIS PB86-117801. Cincinnati,OH: Environmental Criteria and Assessment Office, U.S. Environmental Protection Agency; Excellence for Risk Assessment.
 - ✓ **F. Condevaux, J. Guichard, A. Forichon, M. Aujoulat, J.** (2001). Descotes. *Appl Toxicol.*, , 21(5), 431–434.
 - ✓ **Faulstich H, Jahn W, Wieland T.** (1979). Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver. *Arzneimittelforschung*, 30, 452–454.
 - ✓ **Favier A.** (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 55 (1) : 9 16.
 - ✓ **Foresman, J.B.; Head-Gordon, M.; Pople, J.A.; Frisch, M.J.** (1992). Toward a systematic molecular orbital theory for excited states. *J. Phys. Chem.*, 96, 135-149.
 - ✓ **Fullerton A, Andersen JR, Hoelgaard A, et al.** (1986). Permeation of nickel salts through human skin *in vitro*. *Contact Dermatitis* 15:173-177.
 - ✓ **Gabay, R., Plitmann, U. et Danin,A.** (1994). Facteurs affectant le dominante du marianum L. (Asteraceae) de Silybum dans ses habitats spécifiques. *Flore* 189 pp 201- 206.
 - ✓ **Gaby., R. P. Litmann., Damin.** (1994). Facteurs affectant le domaine du *marinum*. L. (Asteraceae) de *Silybum* dans ses habitats spécifiques. *Flore* (189): 201-206.
 - ✓ **Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M.P.,Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B.** (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*. 32: 279- 286.
 - ✓ **Gee, J. M., DuPont, M. S., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., et Johnson, I. T.** (2000). "Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway." *The Journal of Nutrition* 130(11): 2765-2771.
 - ✓ **Ghedira, K.** (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4: 162-169.
 - ✓ **Gordon T, Amdur MO.** (1991). Responses of the respiratory system to toxic agents. In: Amdur MO, Doull J, Klaassen CD, eds. *Casarett and Doull's toxicology*. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill, Inc., 383-406.
-

- ✓ **Goyer R.** (1991). Toxic effects of metals. In: Amdur MO, Doull JD, Klaassen CD, editors. *Casarett and Doull's toxicology*, 4th ed. New York: Pergamon Press;. p. 623-80.
 - ✓ **Graefe EU and Veit M.** (1999). Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* 6:239-246.
 - ✓ **Graefe EU, Derendorf H and Veit M.** (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37:219-233.
 - ✓ **Grandjean P.** (1984) 'Human exposure to Nickel' 'Nickel in the Human Environment' 53:469-485.
 - ✓ **Guignard J.L.** (1998). Botanique. 11eme ED. Ed Masson. NP 278.
 - ✓ **Guittonneau G., Huon A.** (1983). Connaitre et reconnoitre la flore et la vegetation méditerranéennes. Ed. Ouest France. P 331.
 - ✓ **Gupta AD, Dhundasi SA, Ambekar JG.** (2007). Das KK. Effect of Lascorbic acid on antioxidant defense system in testes of albino rats exposed to nickel sulphate. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*; 18 : 87-95.
 - ✓ **H. Chakroun, N Hfaïdh, F. Makni-Ayadi, F. Guermazi, A. Kammoun, A. Elfeki.** *Sexologies.* (2002). 12, 1-4.
 - ✓ **H. Puchelt.** (1992). In: F.O. Hutzinger, *The Handbook of Environmental Chemistry*, (Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, 2763
 - ✓ **Haber L.T., Diamond G.L., Zhao Q., Erdreich L., Dourson M.L. Hazard.** (2000). identification and dose response of ingested nickel-soluble salts – Regul. Toxicol. Pharmacol., 31(2-1), 231-241.
 - ✓ **Halliwell B, Gutteridge JMC.** (1989). *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press; p. 543.
 - ✓ **Halliwell, B.** (1994). Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutr. Rev.* 52: 253- 265.
 - ✓ **Hariharan, P.C.; Pople, J.A.** (1973). The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chem. Acc.* 28, 213-222.
 - ✓ **Hattori I, Nakamura H, Masutai H et al.** (2003). Thiroedoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. Critical review of
-

- oxidative stress and aging. RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific. Vol II pp 87 – 101.
- ✓ **HAUF, M.** (1982). Les adventices d'Europe, leurs plantules, leurs semences. Ed BASF. 90p.
 - ✓ **Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.** (2002) Flavonoid antioxidants : chemistry ,metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 572-584.
 - ✓ **Hendel RC, Sunderman FW Jr.** (1972). Species variations in the proportions of ultrafiltrable and protein-bound serum nickel. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 4:141-146.
 - ✓ **Hendrich, A.B.** (2006) Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta pharmacologica Sinica. 27: 27-40.
 - ✓ **Herlant-Peers, M.C., Hildebrand, H.F and Kerckaert, J-P.** (1983). in vitro and in vivo incorporation of ⁶³Ni(II) into lung and liver subcellular fractions of Balb/C mice. Carcinogenesis. 4:387-92
 - ✓ **Hikino H, Kiso Y, Wagner H, Fiebig M.** (2007). Antihepatotoxic Actions of Flavonolignans from *Silybum marianum* Fruits. *Planta Medica*, 50, 248–250.
 - ✓ **Hirano S, Shimada T, Osugi J, et al.** (1994b). Pulmonary clearance and inflammatory potency of intratracheally instilled or acutely inhaled nickel sulfate in rats. Arch Toxicol 68:548-554.
 - ✓ **Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M.** (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Chemico Biological Interactions. 139: 1-21.
 - ✓ **Hollman, P. C. H., Van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., et Katan, M. B.** (1997). "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man." FEBS Letters 418(1-2):152-156.
 - ✓ **Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J.** (2005). Chimie et Biochimie Radicalaires”, Belin edition.
 - ✓ **Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J.** (2005). “Chimie et Biochimie Radicalaires”, Belin edition,
 - ✓ <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.html>.
-

- ✓ **Iarc.** (1990). Nickel and nickel compounds. In: *Chromium, nickel and welding*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 257–445 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49).
 - ✓ **Icncm.** (1990). Report of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 16:1–82.
 - ✓ **Ineris.** (2006). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Nickel et ses dérivés. INERIS-DRC-02-25590-02DF44, 60 p.
 - ✓ **Inrs.** (2009). Fiche toxicologique FT 68, Nickel et ses oxydes. Éd. 2009. 10 p.
 - ✓ **Ishimatsu S, Kawamoto T, Matsuno K et Kodama Y.** (1995). Distribution of various nickel compounds in rat organs after oral administration'. *Biol Trace Elem Res*, 49:1,43-52.
 - ✓ **J. Deka, H. P. Sarma.** *Arch. Appl. Sci. Res.* (2012). 4 (2):831-836.
 - ✓ **Jacquet P, Mayence A.** (1982). Application of the in vitro embryo culture to the study of the mutagenic effects of nickel in male germ cells. *Toxicology Letters*, 11:193–197.
 - ✓ **Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP.** (2003). Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med.*, 69, 44–49.
 - ✓ **Kakela RA, Kakela A, Hyvarinen H.** (1999). Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol*; 123 : 27-37.
 - ✓ **Kirk O.** (1981). *Encyclopedia of chemical technology*'New York John Wiley and Sons 15:787-819
 - ✓ **Kren V, Walterová D.** (2005). Silybin and silymarin--new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 149, 29–41.
 - ✓ **Kvasnicka F, Bíba B, Sevcík R, Voldrich M, Krátká J.** (2003). Analysis of the active components of silymarin. *J Chromatogr A*, 990, 239–245.
 - ✓ **Lee A.Y., Lee Y.S.** (1990). A case of allergic contact dermatitis due to nickel in inderground water – *Contact Dermatitis*, , 22(3), 141-143.
 - ✓ **Leopoldini M, Russo N, Toscano M.** (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125:288–306,.
-

-
- ✓ **Lloyd GK.** (1980). Dermal absorption and conjugation of nickel in relation to the induction of allergic contact dermatitis: Preliminary results. In: Brown SS, Sunderman FW Jr, eds. Nickel toxicology. London, UK: Academic Press, 145-148.
 - ✓ **Lopez G V, Batthyany C, Blanco F, Botti H, Trostchansky A, Migliaro E, Radi R, Gonzalez M, Cerecetto H, and Rubbo H. Design.** (2005). synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:5787–5796,.
 - ✓ **Luper S.** (1998). A review of plants used in treatment of liver disease: part I. *Altern. Med. Rev. Dec.* 3 (6): 410-21.
 - ✓ **Lynn S, Yew FH, Chen KS, Jan KY.** (1998). Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair. *Environ Mol Mutagen*; 29 : 208-16.
 - ✓ **M. Goutet, M. Ban, S. Binet.** *Toxicology*, (2000), 145 (1), 15–26.
 - ✓ **M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK.** (1980). Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol* 2007; 81 : 89-99.; 620 : 281-96.
 - ✓ **M'Bemba-Meka P, Lemieux N, Chakrabarti SK.** (2005). Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in nickel sulphate-induced human lymphocyte death *in vitro*. *Chem Biol Interact*; 156 : 69-80.
 - ✓ **Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M. L., Agullo, G., Regeat, F., et Remesy, C.** (1995). "Quercetin Metabolites In Plasma of Rats Fed Diets Containing Rutin or Quercetin " *The Journal of Nutrition* 125(7): 1911-1922.
 - ✓ **Marcussen, PV.** (1957). 'Spread of nickel dermatitis' *.Dermatologica*.115: 596-607. Denkhau
 - ✓ **Mathur A.K., Datta K.K., Tandon S.K. and Dikshith T.S.** (1977) - Effect of nickel sulphate on male rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 17, 2, 241-248.
 - ✓ **Mathur AK, Gupta BN.** (1994). Dermal toxicity of nickel and chromium in guinea pigs. *Vet Hum Toxicol* 36(2):131-132.
 - ✓ **Messegue, M.** (1975). *Mon hercier de santé. Les plantes qui guérissent.* Ed Robert Laffont, Paris, 334 p.
 - ✓ **Miguez M-P, Anundi I, Sainz-Pardo LA, Lindros KO.** (1994). Hepatoprotective mechanism of silymarin: No evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chemico-Biological Interactions*, 91, 51–63.
-

- ✓ **Milkiewicz P, Roma MG, Elias E, Coleman R.** (2002). Pathobiology and experimental therapeutics in hepatocellular cholestasis: lessons from the hepatocyte couplet model. *Clin. Sci.*, 102, 603–614.
 - ✓ **Mira L, Silva M, Manso CF.** (1994). Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochemical Pharmacology*, 48, 753–75
 - ✓ **Münter K, Mayer D, Faulstich H.** (1986). Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 860, 91–98.
 - ✓ **Muriel P, Moreno MG.** (2004). Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 94, 99–104.
 - ✓ **Washington, DC, NAS, Mutagen.** (1997). National Academy of Sciences. Nickel., 29, 208-216.1975, 275pp.
 - ✓ **Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH.** (1999). Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clin. Biochem.*, 32, 519– 536.
 - ✓ **Nielsen G.D., Soderberg U., Jorgensen P.J., Templeton D.M., Rasmussen, Andersen K.E., Grandjean P.** (1999). Absorption and retention of nickel from drinking water in relation to food intake and nickel sensitivity – *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154(1), 67-75.
 - ✓ **Nielsen G.D.; Flyvholm, M.** (1984). In: *Nickel in the Human Environment.* Sunderman FW Jr, Ed., Lyon: International Agency for Research on Cancer, pp. 333-338.
 - ✓ **Norgaard O.** (1955). Investigation with radioactive Ni-57 into the resorption of nickel through the skin in normal and in nickel-hypersensitive persons. *Acta Derm Venereol* 35:111-117.
 - ✓ **Norgaard O.** (1957). Investigations with radioactive nickel, cobalt and sodium on the resorption through the skin in rabbits, guinea pigs and man. *Acta Derm Venereol* 37:440-445.
 - ✓ **Novoy H.S., Habib M. and Wells I.D.** (1983) - Asthma and IgE antibodies induced by chromium and nickel salts. *J Allergy Clin Immunol*, **72**, 4, 407-412.
 - ✓ **NTP.** (1996a). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel oxide (CAS No. 1313-99-1) in F344/N rats and B6C3F1
-

- mice (inhalation studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Research Triangle Park, NC. NTP-TRS No. 451.
- ✓ **NTP.** (1996b). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel subsulfide (CAS No. 12035-72-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Research Triangle Park, NC. NTP-TRS No. 453.
 - ✓ **NTP.** (1996c). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel sulfate (CAS No. 10101-97-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. Research Triangle Park, NC. NTP-TRS No. 454.
 - ✓ **O. Majolagbe, A. A. Paramole, H. O. Majolagbe, O. Oyewole, M.O. Sowemimo** *Arch. Appl. Sci. Res* (2010). 2 (2):170-178.
 - ✓ **OMC IPCS.** (1991). Environmental Health Criteria n° 108:Nickel. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety.
 - ✓ **OMS.** (Organisation mondiale de la santé). 1991. Nickel. Critère d'hygiène de l'environnement 108. OMS, Programme international sur la sécurité des substances chimiques, Genève.
 - ✓ **Oskarsson, A.; Tjalve, H.** *Br. J. Ind. Med.* 1979, 36, 326–35.
 - ✓ **Oskarsson, A.; Tjalve, H.**(1979). Binding of ⁶³Ni by cellular constituents in some tissues of mice after the administration of ⁶³NiCl₂ and ⁶³Ni(Co)₄. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenhagen).45(4):306-14.
 - ✓ **Ottolenghi A.D., Haseman J.K., Payne W.W., Falk H.L. and MacFarland H.N.** (1974) - Inhalation studies of nickel sulfide in pulmonary carcinogenesis of rats. *J. Natl Cancer Inst*, 54, 5, 1165-1172.
 - ✓ **Patriarca M, Lyon TD, Fell GS.** 1997. Nickel metabolism in humans investigated with an oral stable isotope. *Am J Clin Nutr* 66(3):616-621.
 - ✓ **Pepping.** (1999). Milk thistle: *Silybum marianum*. *AM. J Health system pharm.* (56): 551-556.
-

- ✓ **Peynet J, Beaudoux J L, Legrand A. Stress oxydant et athérosclérose. In: Delattre J, Beaudoux J L, Bonnefont D, Rousselot, . (2005). editors. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Tec Doc Lavoisier Ed.**
 - ✓ **Pforte H, Hempel J and Jacobasch G. (1999) Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. Nahrung 43:205-208.**
 - ✓ **Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. 63: 1035-1042.**
 - ✓ **PISSC (Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques), Nickel, Critères d'hygiène de l'environnement, n° 108, Organisation mondiale de la santé, Genève (Suisse), 384 p. (1991).**
 - ✓ **Powers, S. and M. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev 88: 1243-1276.**
 - ✓ **PSSC (Programme international sur la Sécurité des Substances Chimiques).(1991). Nickel, Critères d'hygiène de l'environnement, n°108, Organisation mondial de la santé, Genève (Suisse). P.384.**
 - ✓ **QUEZEL, P. et SANTA, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales T2. Ed. CNRS p1011.**
 - ✓ **QUEZEL, P. et SANTA, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales T2. Ed. CNRS p1011.**
 - ✓ **Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. Proc. Natl. Acad. USA. 101:4003-4008,**
 - ✓ **Rechner, A. R., Spencer, J. P. E., Kuhnle, G., Hahn, U., et Rice-Evans, C. A. (2001). "Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo." Free Radical Biology and Medicine 30(11): 1213-1222.**
 - ✓ **Rendall REG, Phillips JI, Renton KA. 1994. Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. Ann Occup Hyg; 38 : 921-30.**
 - ✓ **Rezuke WN, Knight JA & Sunderman FW Jr (1987) ' Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile'. Am J Ind Med 11: 4, 419-426.**
 - ✓ **RIVM. (2001). Re-evaluation of Human-toxicological maximum permissible risk levels. National Institute of public Health and the environment.711-701.**
 - ✓ **ROCHE, C. 1991. Milk thistle (*Silybum marianum (L.) Gaertn.*) Pacific Northwest Extension Publication. Washington State University, Oregon State University and University of Idaho Cooperative Extension. PNW p382.**
-

- ✓ **Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R.** (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forsch Komplementmed*, 14, 70–80.
 - ✓ **Salnikow K, Su W, Blagosklonny MV, Costa M.** (2000). Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res*, 60 : 3375-8.
 - ✓ **Salvayre R, Auge N, and Nègre-Salvayre A.** Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost and J. (2003)Chapman, Eds. Masson: Paris, Vol. 14, pp 269-290.
 - ✓ **Sarkar B.. Nickel metabolism. In: Sunderman FW Jr, Aitio A, Berlin A.** (1984). eds. Nickel in the human environment. IARC scientific publication no. 53. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 367-384.
 - ✓ **Shannon H.S., Julian J.A. and Roberts R.S.** (1984). A mortality study of 11,500 nickel workers. *J Natl Cancer Inst*, 73, 6, 1251-1258.
 - ✓ **Shannon H.S., Walsh C., Jadon N., Julian J.A., Weglo J.K., Thornhill P.G. and Cecutti A.G.** (1991). Mortality of 11,500 nickel workers--extended follow up and relationship to environmental conditions. *Toxicol Ind Health*, 7, 4, 277-294.
 - ✓ **Shi X, Dalal NS, Kasprzak KS.** (1992). Generation of free radicals from lipid hydroperoxides by Ni²⁺ in the presence of oligopeptides. *Arch Biochem Biophys*; 299 : 154-62.
 - ✓ **Shi X, Dalal NS, Kasprzak KS.** (1993). Generation of free radicals in reactions of Ni (II)-thiol complexes with molecular oxygen and model lipid hydro-peroxides. *J Inorg Biochem*; 50 : 211-25.
 - ✓ **Shirakawa T., Kusaka Y., Fujimura N., Kato M., Heki S. and Morimoto K.** (1990) - Hard metal asthma: cross immunological and respiratory reactivity between cobalt and nickel? *Thorax*, 45, 4, 267-271.
 - ✓ **SINDEL, B.M.** (1991°). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research*. Vol.31, pp 189-201.
 - ✓ **SLI.** (2000). An oral (gavage) two-generation reproduction toxicity study in Sprague Dawley rats with nickel sulphate hexahydrate. Prepared.
-

- ✓ **Solomons NW, Viteri F, Shuler TR et Nielsen FH.** (1982). Bioavailability of nickel in man :Effects of food and chemically defined dietary constituents on the absorption of inorganic nickel'. *J Nutr* 112:3 9-50.
 - ✓ **Sonnenbichler J, Goldberg M, Hane L, Madubunyi I, Vogl S, Zetl I** (1986). Stimulatory effect of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malign cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 538–541.
 - ✓ **Sonnenbichler J, Zetl I.** (1984). [Mechanism of action of silibinin. V. Effect of silibinin on the synthesis of ribosomal RNA, mRNA and tRNA in rat liver in vivo]. *Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem.*, 365, 555–566.
 - ✓ **Soto C, Mena R, Luna J, Cerbón M, Larrieta E, Vital P, et al.** (2004). Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sci.*, 75, 2167–2180.
 - ✓ **Soto C, Pérez J, García V, Uría E, Vadillo M, Raya L.** (2010). Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus. *Phytomedicine*, 17, 1090–1094.
 - ✓ **Soulère L, Viodé C, Périé J. and Hoffmann P.** (2002). Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50:578-582.
 - ✓ **Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK and Rice-Evans C** (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458:224-230.
 - ✓ **SPICHIGER, R. E., SAVOLAINEN, V. et FIGEAT M.** (2000). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. 1ier Ed. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 372p.
 - ✓ **Spiegelberg T., Kordel W. and Hochrainer D.** (1984) - Effects of NiO inhalation on alveolar macrophages and the humoral immune systems of rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 8, 6, 516-525.
 - ✓ **Sunderman FW Jr, Hopfer SM, Sweeney KR, Marcus AH, Most BM et Creason J** (1989)' Nickel absorption and Kinetics in Human Volunteers'. *Proc Soc Exp Biol Med* ,191:1,5-11.
-

- ✓ **Sunderman FW Jr et al.** (1978) Embryotoxicity and fetal toxicity of nickel in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 43:381–390.
 - ✓ **Sunderman FW Jr et Oskarsson A** (1991) ‘Nickel’. *Metals and their compounds in the environment*. Meriam E,(éd), VCH Verlagsgesellschaft, 1101-1126.
 - ✓ **Sunderman FW Jr, Coulston F, Eichhorn GL.** 1975. *Nickel*. Washington DC: National Academy of Science;. p. 97- 143.
 - ✓ **Sunderman FW Jr, Hopfer SM, Sweeney KR, et al.** 1989b. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Proc Soc Exp Biol Med* 191:5-11.
 - ✓ **Sunderman FW Jr.** 1986. Sources of exposure and biological effects of nickel. In: O'Neill IK, Schuller P, Fishbein L, eds. *Environmental carcinogens selected methods of analysis. Volume 8: Some metals: As, Be, Cd, Cr, Ni, Pb, Se, Zn.* IARC scientific publication no. 71. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 79-92.
 - ✓ **TERA** (1999) *Toxicological review of soluble nickel salts*. Research Triangle Park, NC, Toxicology.
 - ✓ **TORJUSSEN W, HAUG F, ANDERSEN I.** (1978). Concentration and distribution of heavy metals in nasal mucosa of nickel exposed workers and of controls, studied with atomic absorption spectrometry and with Timms' sulphide silver method. *Acta Otolaryngol*, **86** : 449-463
 - ✓ **Tyagi AK, Agarwal C, Chan DCF, Agarwal R.** (2004). Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol. Rep.*, 11, 493–499.
 - ✓ **U.K.W.I.R.** (1996). A review of allergy and dermatitis associated with domestic water supplies - Rapport n°95/DW/05/14, U.K. Water Industry Research Limited eds, , 27p.
 - ✓ **USAF.**(1990).Nickel,In :Instalation Restoration Program Toxicology Guide, Vol.5. Harry G.Armstrong Aerospace Medical Research Laboratory, Wright Patterson AFB,OH.
 - ✓ **van Hoogstraten M.W., von Blumberg M.E. and Boden D.** (1994). Effects of oral exposure to nickel or chromium on cutaneous sensitization. *Curr Probl Dermatol*, **20**, 237-241.
-

- ✓ **Vertuani S, Angusti A, and Manfredini S.** 2004. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* 10:1677-1694,.
 - ✓ **Vial B.** (1998). *Botanique médicale.* Ed. Imilia. Paris. 363-40.
 - ✓ **VOLAK, J. et STODOLA, J.,** 1984. *Plantes médicinales. Illustrations de Frantisek Severa,* Ed. ARITA Grund Paris, p 319.
 - ✓ **Vyskocil A., Senft V., Viau C., Cizkova M. and Kohout J.** (1994) - Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. *Hum Exp Toxicol*, **13**, 4, 257-261.
 - ✓ **Walle, T.** (2004). "Absorption and metabolism of flavonoids." *Free Radical Biology and Medicine* 36(7): 829-837.
 - ✓ **Widmer.N.** (2001). *Cardui maria fructus (Dosage des flavonolignanes).* 1-2.
 - ✓ **Williams, C. A. et Grayer R. J.** (2004). "Anthocyanins and other flavonoids." *Natural Product Reports* 21(4): 539-573.
 - ✓ **Williamson, G., Day, A. J., Plumb, W., et Couteau, D.** (2000). "Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates." *Biochemical Society Transactions* 28: 16-22.
 - ✓ www.avogel.fr/encyclopedie-plantes/silybum_marianum.php (2007)
 - ✓ **Wynn S, Fougere B** (2006). *Veterinary Herbal Medicine.* Mosby. Saint Louis (MO), 714 p.
 - ✓ **Zuo, Z., Zhang, L., Zhou, L., Chang, Q., et Chow, M.** (2006). "Intestinal absorption of hawthorn flavonoids - in vitro, in situ and in vivo correlations." *Life Sciences* 79(26): 2455-2462.
-

الملخص

عملنا يميل إلى تسليط الضوء على التأثير الضار للنيكيل في كبار ذكور الفئران من سلالة ويستار في أعقاب مكاسب وزن الجسم، والتغيرات في القياسات البيوكيميائية والدموية، والدور الوقائي لمركبات الفلافونويد الموجودة في السيليبيوم ماريانيوم في الحد أو إزالتها للأثار السامة للخلايا الناجمة عن النيكيل

لهذا، تم علاج 24 فأر قسمت إلى أربع دفعات من ستة فئران لكل منها 3 عقود عولجت بالنيكل عن طريق الحقن تحت الجلد بجرعة من 20 ملغ / كغ من وزن الجسم. مستخلص الفلافونويد من السيليبيوم ماريانيوم يعطى شفويا في تركيزان 400 ملغ و 600 ملغم / كغم من وزن الجسم. الفئران الشاهدة تلقت جرعات من الماء الفسيولوجية عن طريق الحقن تحت الجلد. بعد ثلاثة أسابيع من العلاج، تم التضحية الفئران ويتم تحديد معايير مختلفة

من تحليل النتائج لدينا، كشفت الدراسة أن هذا المصنع الكيميائي النباتي غني الصابونين، وقلويدات وفلافونيدات لوحظ وجود انخفاض في الجسم وزيادة الوزن في الفئران المتعاملة بالنيكل مع اضطراب واضح للمعطات الكيميائية الحيوية والدم.

وجدنا انخفاضا كبيرا في تركيز الجلوكوز مع زيادة في المصل الشخصي الدهون (الكوليسترول، الدهون الثلاثية)، والتوازن الكلوي (اليوريا والكرياتينين) ونشاط الإنزيمات الكبدية مقارنة بالجرذان الشاهدة

فيما يتعلق بمعطات

الدم، نجد انخفاضا في خلايا الدم الحمراء، خلايا الدم البيضاء، والهيموغلوبين في المجموعات المعالجة تعكس السمية الدموية من النيكيل

وعلاوة على ذلك، المعاملة مع سيليمارين تحسین جميع المعطات الفسيولوجية، والكيمياء الحيوية والدموية عند مستوياتها الطبيعية تقريبا

في الختام، أظهرت هذه الدراسة أن التعرض للنیکل له آثار سامة على المعطات المذكورة أعلاه، وهبت استخراج سيليمارين مع النشاط المضادة للأكسدة ملحوظا. وبالتالي قد يكون لها تأثير وقائي ضد سمية النیکل

الكلمات الرئيسية: النیکل، سيليمارين، الجرذان، سمية.

Summary

Our work tends to highlight simultaneously the harmful effect of nickel in adult Wistar male rats following the body weight gain, changes in biochemical and hematological parameters, and the protective role of flavonoids Silybum marianum reducing or removed from the cytotoxic effects induced by nickel.

For this, 24 rats divided into four batches of six rats each were treated with 3 lots of nickel by ip injection at a dose of 20 mg / kg body weight. The flavonoid extract of Silybum marianum is orally administered at 400 mg two concentrations and 600 mg / kg body weight. Control rats receiving physiological saline by ip injection. After three weeks of treatment, the rats were sacrificed and the various parameters are determined

From the analysis of our results, the phytochemical study revealed that this plant is rich in saponins, alkaloids and flavonoids.

a decrease in body weight gain was observed in rats treated with a clear disruption of biochemical and hematological parameters.

We found a significant decrease in the concentration of glucose with an increase in serum lipid profile (cholesterol, triglycerides), the renal balance (urea, creatinine) and enzyme activity (GOT, GPT, ALP) of Neither treated rats compared to untreated

Regarding hematological parameters, we find a decrease in red blood cells, white blood cells, Hb and Ht in the treated groups Ni reflecting hematologic toxicity of nickel

Furthermore, treatment with silymarin improved all physiological, biochemical and hematological parameters at approximately normal levels.

In conclusion, the present study showed that exposure to nickel has toxic effects on the parameters mentioned above, extract silymarin is endowed with a remarkable antioxidant activity. Thus it may be a protective effect against the toxic nickel.

Keywords: Nickel, Rats, silymarin, Silybum marianum, toxicity.
