



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION Du DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : BIOLOGIE ANIMALE

Intitulé

**L'effet combiné du zinc et de la vitamine C
(acide ascorbique) contre la toxicité du
nickel chez les rats Wistar**

Présenté par : Mr. DJEMLI SAMIR

Membres de Jury :

DJEBAR MOHAMED REDA (Pr)	Président	Univ. BADJI MOKHTAR ANNABA
KECHRID ZINE (Pr)	Directeur de thèse	Univ. BADJI MOKHTAR ANNABA
LALAOUI KORICHI (Pr)	Examineur	Univ. MENTOURI CONSTANTINE
NECIB YUCEF (MCA)	Examineur	Univ. MENTOURI CONSTANTINE
KACEM RACHID (Pr)	Examineur	Univ. FARHAT ABBAS SETIF

2013/2014

REMERCIEMENTS

*-Je me dois de remercier **Allah** le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de ce travail.*

*-Je tiens avant tout à exprimer ma très grande gratitude à **Mr. KECHRID ZINE**, professeur à l'université **BADJI MOKHTAR ANNABA**, non seulement pour m'avoir proposé le sujet et accepter d'encadrer ce travail mais surtout pour sa disponibilité, ses précieux conseils, sa gentillesse et de m'avoir insufflé le désir et la passion de la recherche, qu'il trouve dans ses mots l'expression de mes vifs remerciements.*

*-Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Mr. DJEBAR MOHAMED REDA** Professeur et Directeur de Labo a l'université **BADJI MOKHTAR ANNABA**, pour avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse de Doctorat.*

*-Toute ma reconnaissance et gratitude et reconnaissance et mes vifs remerciements **Mr. KACEM RACHID** Professeur à l'université de Sétif pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger ce travail.*

*-Je remercie vivement **Mr. LALAOUI KORICHI** Professeur à l'université de Constantine pour avoir accepté de juger ce travail.*

*-Je remercie également **Mr. NECIB YUCEF** Maître de conférences à l'université de Constantine pour avoir accepté de juger ce travail.*

-Je remercie vivement **Mme .BOUDENE SOUHILA** du
Département de Biologie à l'université **BADJI MOKHTAR**
ANNABA pour son soutien, sa bonne humeur et sa gentillesse.
Qu'elle accepte toute ma reconnaissance et ma gratitude.

-Je tiens à remercier aussi **Mr. TICHATI LAZHAR** technicien au
laboratoire de Microbiologie et Biochimie appliquée au
Département De Biochimie a l'université **BADJI MOKHTAR**
ANNABA.

-Sans oublier de présenter mes remerciements à tous ce qui ont
contribué de près ou de loin a la réalisation de ce travail.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUMES (Français, Arabe, Anglais)

INTRODUCTION1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : NICKEL

I. Le nickel4

1. Généralités.....4

2. Identité et propriété.....5

3. Utilisations.....8

II. Principales sources d'exposition.....9

1. Sources naturelles.....9

2. Sources anthropiques.....10

III. Informations sur l'exposition.....10

1. Devenir.....11

1.1. Air.....11

1.2. Eau et sédiments.....12

1.3. Sol.....13

1.4. Organismes aquatiques14

1.5. Organismes terrestres.....	15
IV. Toxicocinétique	16
1. Devenir dans l'organisme.....	16
1.1. Le métabolisme et la disposition.....	16
1.1.1.L'absorption.....	16
1.1.2. La distribution	17
1.1.3.Le métabolisme.....	17
1.1.4. L'excrétion.....	18
2. Toxicologie aigue.....	18
2.1. Etudes chez l'homme.....	18
2.2. Etudes chez l'animal.....	19
3. Toxicologie chronique.....	21
3.1. Effets systémiques.....	21
3.1.1. Effets respiratoires.....	21
3.1.2 .Effets immunitaires.....	22
3.1.3.Effets cutanés.....	22
3.1.4.Toxicité rénale et hépatique.....	23
3.2.Effets cancérigènes.....	24
3.2.1. Effets génotoxiques.....	24
3.3. Effets sur la reproduction et le développement.....	24

3.3.1. Etudes chez l'homme.....	24
3.3.2. Etudes chez l'animal.....	25
3.4. Effets sur l'environnement.....	25

CHAPITRE II : STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS

I. Stress oxydatif.....27

1. Définition	27
2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	27
3. Les radicaux libres.....	28
4. Réactivité des ROS et conséquences liées à leur accumulation.....	28
4.1. Le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	28
4.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	29
4.3. Le radical hydroxyle ($\cdot OH$).....	29
4.4. L'oxyde nitrique (NO).....	30
4.5. Le dioxyde nitrique (NO_2).....	30
4.6. Le peroxynitrite($OONO-$).....	30
5. Origine et destinée des ROS.....	31
6. Conséquences.....	34

II. ROS et signalisation cellulaire..... 35

III. Marqueurs du stress oxydatif.....	36
1. Oxydation des protéines.....	36
2. Peroxydation lipidique.....	36
IV. Stress oxydant et pathologies.....	37
1. Le stress oxydant et le cancer.....	38
2. Le stress oxydant et le diabète.....	38
3. Le stress oxydant et l'obésité.....	39
4. Le stress oxydant et l'intoxication aux pesticides.....	40
V. Systèmes de défenses antioxydants.....	40
1. Le système antioxydant enzymatique.....	41
1.1. Les superoxydes dismutases (SOD).....	41
1.2. Les superoxydes Réductases (SOR).....	42
1.3. Les catalases.....	43
1.4. Les glutathions peroxydases (GSH-Px).....	45
1.5. Les glutathions transférases (GST).....	46
2. Systèmes antioxydant endogène non enzymatiques.....	47
2.1. Le glutathion.....	47
2.2. L'acide α lipoïque.....	48
2.3. La bilirubine.....	48

2.4. Les hormones sexuelles.....	48
3. Molécules antioxydantes exogènes non enzymatiques.....	49
3.1. La vitamine C.....	49
3.2. La vitamine E.....	49
3.3. Le β -carotène.....	52
3.4. Les polyphénols.....	53
3.5. Le sélénium.....	53
3.6. Le zinc.....	54
3.7. Le manganèse.....	55

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

I. Matériels et méthodes.....	56
1. Matériels biologique et conditions d'élevage.....	56
2. Protocole expérimental.....	56
3. Sacrifice et prélèvement des organes.....	57
3.1. Prélèvement sanguin.....	57
3.2. Prélèvement des organes.....	57
4. Dosages biochimique.....	59
4.1. Dosage du glucose.....	59
4.2. Dosage des triglycérides.....	60

4.3. Dosage des protéines totales	62
4.4. Dosage de la créatinine.....	63
4.5. Dosage de l'urée.....	65
4.6. Dosage de d'alanine aminotransférase (ALAT/TGP).....	66
4.7. Dosage d'aspartate minotransférase (ASAT/TGO).....	68
4.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	70
4.9. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH).....	71
4.10. Dosage de la bilirubine totale et directe.....	72
4.11. Dosage d'albumine.....	74
4.12. Préparation de l'homogénat.....	75
4.13. Dosage du glutathion (GSH).....	75
4.14. Dosage des protéines hépatiques	77
4.15. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px).....	78
4.16. Dosage du glutathion S-Transférase (GST).....	79
4.17. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	80
5. Evaluation de la toxicité hématologique.....	82
6. Technique histologique.....	82
7. Exploitation statistique des résultats.....	84

CHAPITRE IV : RESULTATS

I. Effets sur les paramètres pondéraux.....	85
II. Effets sur Les paramètres biochimiques.....	94
III. Effets sur le paramètre hématologique	118
IV. L'étude histologique du foie.....	128

CHAPITRE V : DISCUSSION.....134

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....146

PUBLICATION

Liste des abréviations

ALT : Alanine aminotransférase

AST : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

CAT : Catalase

CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

Cu : Cuivre

DL₅₀ : Dose Létale Moyenne

DMSO : Dimethylsulfoxyde

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène

Fl : femtolitres

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

GOD : Glucose oxydase

GSH-Px : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion S-transférase

LDH : Lactate déshydrogenase

LPL : Lipoprotéine lipase

MDH : Malate déshydrogenase

NO : Monoxyde d'azote

OX : Oxydante

PAL : phosphatase alcaline

RED : Réductrice

ROS : Reactive oxygen species

SOD : Superoxyde dismutase

SOR : Superoxyde Réductase

TGO : Transaminase glutamate oxaloacétate

TGMH : Teneur globulaire moyenne en hémoglobine

TGP : Transaminase glutamate pyruvate

U/L: Unité internationale/ Litre

Vit C : Vitamine C

VGM : Volume globulaire moyen

XO : Xanthine oxydase

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 01 : Voies métaboliques de l'oxygène et des ERO (Espèces réactives de l'oxygène).	32
Figure 02 : Origine intra et extracellulaire des ROS.....	33
Figure 03 : Représentation schématisée de la chaîne respiratoire.....	34
Figure 04 : Cycle catalytique de la Superoxyde Dismutase (SOD) $M^{2+/3+}$ correspond au métal du site catalytique de l'enzyme. SOD _{ox} : SOD oxydée ; SOD-red : SOD réduite.....	42
Figure 05 : Cycle catalytique de la superoxyde réductase.....	43
Figure 06 : Représentation schématisée du cycle catalytique de la catalase.....	44
Figure 07 : Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C).....	50
Figure 08 : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols.....	51
Figure 09 : Balance entre antioxydants et prooxydants.....	54
Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	58
Figure 11 : La gamme d'étalonnage utilisée (BSA mg/ml) pour le dosage des protéines.....	77
Figure 12 : Coulter hématologique (Coulter Conter Lympho Série « T » 540).....	82
Figure 13 : Evaluation en fonction du temps (jours) du poids corporel chez les rats témoins, les traités par le zinc et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.....	88
Figure 14 : Evaluation du poids absolu du foie chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	90
Figure 15 : Evaluation du poids relatif du foie chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	91
Figure 16 : Le taux de consommation journalière de nourriture chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	92

Figure 17 : Le taux de consommation journalière d'eau chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	93
Figure 18 : La concentration sérique du glucose chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	98
Figure 19 : La concentration sérique de l'urée chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	99
Figure 20 : La concentration sérique de la créatinine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés	100
Figure 21 : La concentration sérique de la bilirubine totale chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	101
Figure 22 : La concentration sérique de la bilirubine directe chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	102
Figure 23 : La concentration sérique des triglycérides chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	103
Figure 24 : La concentration sérique des protéines totales chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	104
Figure 25 : La concentration sérique d'albumine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	105

Figure 26 : L'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (TGO) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	108
Figure 27 : L'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (TGP) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	109
Figure 28 : L'activité enzymatique du lactate déshydrogénase (LDH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	110
Figure 29 : L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	111
Figure 30 : La teneur hépatique en glutathion (GSH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	114
Figure 31 : L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	115
Figure 32 : L'activité enzymatique du glutathion S-transférase (GST) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	116
Figure 33 : L'activité enzymatique de la catalase (CAT) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	117
Figure 34 : Variations du nombre des globules blancs chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	121

Figure 35 : Variations du nombre des globules rouges chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	122
Figure 36 : Variations du taux d'hémoglobine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	123
Figure 37 : Variations du taux d'hématocrite chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	124
Figure 38 : Variations du taux du VGM chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	125
Figure 39 : Variations du taux de TGMH chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	126
Figure 40 : Variations du taux de CCMH chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.....	127
Figure 41 : Coupe histologique du foie des rats témoins (A). (<i>Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400</i>).....	129
Figure 42 : Coupes histologiques du foie des rats traités au zinc (B) et des rats traités à la vitamine C (C). <i>Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400</i>	130
Figure 43 : Coupe histologique du foie des rats traités par le sulfate de nickel (D) montrant différents types d'altérations. (<i>Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400</i>).....	131
Figure 44 : Coupes histologiques du foie des rats traités a la combinaison Ni + Zn (E) et des rats traités a la combinaison Ni + Vit C (F). <i>Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400</i>	132
Figure 45 : Coupe histologique du foie des rats traités a la combinaison Ni + Zn+ Vit C (G). <i>Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400</i>	133

Liste des tableaux

Tableau 01 : Propriétés physiques et chimiques du nickel et ses dérivés.....	07
Tableau 02 : Les concentrations ubiquitaires du nickel.....	11
Tableau 03 : Les différentes valeurs de DL50 des composés du nickel.....	20
Tableau 04 : Les effets systémiques chez l'homme et l'animal.....	23
Tableau 05 : Principales enzymes du système de défenses antioxydantes enzymatiques	47
Tableau 06 : Variation du poids corporel en gramme chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés pendant un traitement de six semaines.....	87
Tableau 07 : Variations des poids absolus et relatif du foie et la consommation journalière de nourriture et d'eau chez les rats témoins, les traités par le zinc et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après six semaines de traitement.....	89
Tableau 08 : Variations de la concentration sérique du glucose, de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine, de la bilirubine totale, de la bilirubine directe, des triglycérides, des protéines totales et d'albumine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.....	97
Tableau 09 : Variations de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (TGO), de l'alanine aminotransférase (TGP), du lactate déshydrogénase (LDH) et de l'alcaline phosphatase (PAL) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.....	107
Tableau 10 : Variations de la teneur hépatique en glutathion (GSH), des activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GSH-Px), du glutathion S-transférase (GST) et la catalase (CAT) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés	

au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.....113

Tableau 11 : Variations du nombre des globules blancs , des globules rouges , du taux d'hémoglobine , d'hématocrite , du volume globulaire moyen (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.....120

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets éventuellement protecteurs du zinc et de la vitamine C sur certains paramètres biochimiques et hématologiques d'une part, et d'autre part sur le statut antioxydant, chez des rats exposés de façon subchronique au sulfate de nickel 800mg/l, pendant une période de six semaines.

A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable du poids corporel des rats contaminés au nickel et une augmentation du poids absolu et relatif du foie.

Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine, de la bilirubine chez les rats contaminés au nickel par rapport aux animaux témoins. Alors que, la concentration de l'albumine, des protéines totales dans le sérum et le taux du glutathion, de l'activité du glutathion peroxydase, de l'activité du glutathion S-transférase et de l'activité de la catalase dans le foie ont été diminués. Cependant, les activités des transaminases (TGO, TGP), de l'ALP et du LDH sérique ont présenté une augmentation remarquable chez les rats contaminés au nickel. L'addition du zinc et de la vitamine C combinés a amélioré certains mais pas tous les paramètres au dessus.

Les résultats obtenus révèlent également une toxicité hématologique en particulier chez les lots contaminés au nickel, avec une élévation du nombre des globules blancs, une diminution du taux des globules rouges, de la concentration d'hémoglobine, du pourcentage de l'hématocrite, pendant la contamination au nickel, tous ces paramètres sont revenus presque à la normale en présence du zinc et de la vitamine C combinée.

Aussi, les résultats ont montré clairement des altérations de structures des tissus du foie en comparaison avec les témoins, avec une veine centrolobulaire dilatée, des hépatocytes irrégulières, une inflammation et une nécrose hépatique.

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition au nickel a des effets toxiques sur les paramètres mentionnés précédemment. La supplémentation du zinc et de la vitamine C a amélioré certains paramètres et diminué les altérations histologiques du foie par la protection contre les effets toxiques du nickel. De plus la supplémentation du zinc et de la vitamine C ensemble est plus efficace que chaque élément seul.

Mots clés : Nickel, zinc, vitamine C, stress oxydant, rats.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير الزنك و فيتامين ج (حامض الاسكوربيك) على بعض المؤشرات البيوكيميائية و الدموية من جهة و من جهة أخرى على الإجهاد التأكسدي عند الفئران المعرضة لعنصر النيكل السمي شبه مزمن بجرعة 800 ملغ/ل لمدة 6 اسابيع .

من النتائج المتحصل عليها نلاحظ أن هناك إنخفاض في معدل النمو عند الفئران المعرضة لعنصر النيكل و زيادة الوزن الحقيقي والنسبي للكبد.

النتائج أظهرت أيضا تغيرات ملموسة في مستوى المؤشرات البيوكيميائية و المتمثلة في زيادة معنوية في تركيز سكر الغلوكوز الغليسيريدات الثلاثية ,اليوريا ,الكرياتينين , مادة البيلوريبين في المصل عند الحيوانات المعرضة للنيكل مقارنة بالحيوانات الغير معرضة (الشواهد).

كما لوحظ إنخفاض في تركيز البروتينات الكلية والألبومين في المصل و محتوى الجلوتاتيون و نشاط إنزيم الجلوتاتيون التأكسدي و الجلوتاتيون الناقل و الكتلاز في الكبد في حين سجل إرتفاع في نشاط إنزيمات ناقلات الأمين و إنزيم الفوسفاتاز القلوي و لاكتات ديهيدروجيناز . و قد كان لدور الزنك و فيتامين ج تأثير واضح في تحسين نسبة من المؤشرات السالفة الذكر.

النتائج أظهرت أيضا التأثير السمي للنيكل على المؤشرات الدموية حيث سجلت زيادة في عدد كريات الدم البيضاء و إنخفاض في عدد كريات الدم الحمراء ,نسبة الهيماتوكريت و تركيز مادة الهيموغلوبين ,كما أن إضافة الزنك أو فيتامين ج حسنت أيضا مستوى بعض هذه المؤشرات و إعادتها إلى المستوى العادي تقريبا المسجل عند الشواهد.

كما لوحظ تأثير سمي واضح لعنصر النيكل على الأنسجة أدى إلى حدوث تمزق الأغشية الخلوية للخلايا الكبدية مع حدوث تشمعها.

و عموما ما يمكنه إستنتاجه من هذه الدراسة أن عنصر النيكل له تأثير سام واضح على المؤشرات سالفة الذكر و أن إضافة الزنك أو فيتامين ج أدى الى تعديل بعض هذه المؤشرات و تخفيض الأضرار على مستوى النسيج الكبدي عن طريق الحماية من التأثيرات السمية للنيكل. بالإضافة الى ذلك توضح النتائج أن إضافة الزنك و فيتامين ج معا أكثر فعالية من كل واحد على حدى.

الكلمات الدالة: النيكل , الزنك , فيتامين ج , الإجهاد التأكسدي , الفئران .

Abstract

The aim of this study was carried out to investigate the possible protective effect of combined zinc and vitamin C on certain biochemical and hematological parameters in one hand and oxidative biomarkers on the other hand in rats sub-chronically exposed to nickel sulfate 800mg/l for six weeks.

According to the results, which have been obtained. There was a reduction in body weight gain due to nickel contamination and an increase of absolute and relative liver weight .

These results indicated also changes in biochemical parameters , which are characterized by an increase in serum glucose , serum triglycerides , serum urea, serum creatinine, serum bilirubin of animals contaminated with nickel compared to the control animals, whereas concentration of albumin , total proteins in serum and glutathione content , glutathione peroxidase , glutathione S-transferase and catalase activities in liver were diminished. In addition, GOT, GPT, PAL and LDH activities were increased. However, the supplementation of zinc and vitamin C in combination improved some but not all the previous parameters.

Moreover the findings showed variation in hematological parameters of nickel treated animals. In other words there was a rise in number of white cells, and reduction of red cells counts , hemoglobin concentration and hematocrit percentage, but all these parameters returned approximately to their normal values after combined zinc and vitamin C addition.

The results clearly showed also deteriorations of liver structure tissue in comparison with the controls, including extensive degeneration of hepatocytes with necrosis , inflammation , the presence of cellular debris within a central vein and cytological vacuolization.

In conclusion, the present investigation indicated that nickel had toxicity effects on the previously mentioned parameters. However, the supplementation of combined zinc and vitamin C ameliorated some of these parameters and reduced liver histological alterations caused by nickel toxicity. In addition the results showed that the supplementation of both zinc and vitamin C together was more efficacious than each alone.

Key words : Nickel, zinc, vitamin C, oxidative stress, rats.

Introduction

Le développement rapide des sciences technologiques, des industries (chimiques et métalliques), de la médecine et de l'agriculture a exposé l'homme et son environnement aux nombreux métaux lourds toxiques. Leur présence dans l'eau, l'atmosphère et par conséquent, la chaîne alimentaire, est certainement le cas le plus intéressant parmi les problèmes majeurs de notre époque, notamment pour les pays en voie de développement (Das et *al.*, 2002).

Les métaux lourds tels que le nickel, le cadmium, le mercure, le plomb, l'arsenic et autres s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires (Harber et *al.*, 2000 ; Lauwerys, 2003). La nature de leur toxicité peut varier en fonction de la forme sous laquelle ils pénètrent dans l'organisme (métal lui-même, vapeur, dérivés inorganiques ou organiques, hydro-ou liposoluble, etc.). Certains ont des propriétés cumulatives, pouvant développer leurs effets à long terme, lorsque les excrétions ne compensent pas les absorptions. Ils peuvent alors atteindre différents organes ou fonctions essentielles ou être dans des processus de cancérogénèse (Viala, 1998).

En plus de leur grande toxicité, certains de ces métaux sont susceptibles dans l'environnement de s'accumuler fortement dans les organismes vivants, et de ce fait, se retrouvent en fin de chaîne alimentaire. On parlera alors de bioaccumulation, par exemple dans les aliments que nous pouvons être amenés à consommer (Beijer et *al.*, 1986).

Parmi ces métaux toxiques et bioaccumulables, nous avons le nickel qui est un métal qui a été identifié pour la première fois dans le 18^{ème} siècle. Le nickel et ses dérivés sont très utilisés dans l'industrie (Scansetti et *al.*, 1994).

Le nickel est un métal qui a été identifié pour la première fois dans le 18^{ème} siècle. C'est un élément trace essentiel dans plusieurs espèces animales, les plantes et la terre mais son rôle exact n'a pas encore été identifié (Puchelet, 1992). Le nickel a été identifié comme un

composé des enzymes bactériennes (Nielsen, 1984). Il affecte l'immunité en ciblant les cellules T du système immunitaire et inhibe, supprime l'activité des cellules K (Killer) chez les rats et les souris (Goutet et *al.*, 2000 ; Condevaux et *al.*, 2001).

Le nickel induit la production des radicaux libres en causant des dommages au niveau de la cellule (Chen et *al.*, 2003). Il affecte aussi l'architecture structurale des tissus. Il cause avec ses dérivés le cancer chez les humains et induit des tumeurs chez les rats de labo (Salnikow and Kasprzak, 2005).

Le zinc est un antioxydant important qui joue un rôle dans la diminution de la production de ROS (Fernandez et *al.*, 2003). Il est vital pour le développement et les fonctions mammaires. Le zinc est un élément fondamental pour au moins 200 métalloenzymes, et il affecte la conformité, la stabilité et la l'activité de plusieurs d'entre eux (Rostan et *al.*, 2002).

C'est un nutriment essentiel, il protège contre des dommages oxydatifs causés par quelques xénobiotiques (Fukino, 1986). Cependant le zinc est ubiquitaire dans le métabolisme subcellulaire et c'est un élément essentiel dans les sites catalytiques (Dhawan et *al.*, 1992).

Le zinc joue un rôle important dans la régulation du glutathion cellulaire et il est vital pour la défense cellulaire surtout contre le stress oxydatif (Sameeh et *al.*, 2009).

La vitamine C a un rôle protecteur contre la peroxydation lipidique des cytomembranes (Lee et *al.*, 2006). C'est un élément majeur du système antioxydant (Ayo et *al.*, 1998). Elle protège les cellules et les tissus contre les dommages causés par les radicaux libres (Al Hassan et *al.*, 2010).

Notre travail a pour but d'explorer l'impact du nickel sur certains aspects pondéraux, biochimiques, hématologiques et également sur l'histologie du foie chez des rats de souche

(Wistar), et d'évaluer les effets du zinc et de la vitamine C combinés, afin d'établir si ces deux éléments peuvent protéger contre les effets cytotoxiques du nickel.

Synthèse bibliographique

Chapitre I nickel

I. Le nickel :**1. Généralités :**

Le nickel est découvert dès 1751 par un chimiste suédois nommé Cronstedt (Kasprzak et *al.*, 2003). Il est largement distribué dans l'environnement. Les sources naturelles du nickel atmosphérique incluent des poussières d'émission volcaniques et l'érosion des pierres du sol. Les sources naturelles de nickel aqueux proviennent de cycles biologiques et la dissolution des composés du nickel de sol. La provenance de nickel dans l'environnement humain est approximativement 150000 tonnes métriques par année de sources naturelles et 180000 tonnes métriques par année d'anthropogénique alimentée, incluant des émissions de la consommation de combustible fossile et la production industrielle, l'utilisation et la disposition des composés de nickel et des alliages (CIRC, 1990 ; Sunderman, 2001). Les principaux dépôts des minerais de nickel, oxydes ou bien sulfoniques se trouvent en Australie, Canada, Cuba, Indonésie, Nouvelle Calédonie et Russie (Sunderman, 2001 ; Denkhauß and Salnikow, 2002).

La grande consommation des produits de nickel mène inévitablement à la pollution environnementale par le nickel et ses dérivées au niveau de toutes les étapes de production, utilisation et disposition. L'exposition humaine au nickel se produit à l'origine par inhalation et l'ingestion et elle est particulièrement haute parmi les travailleurs de métallurgie de nickel (CIRC, 1990). Dans les régions industrialisées et les grandes villes, des concentrations de nickel atmosphérique sont rapprochées de la cendre volante de combustibles fossiles brûlants dans les centrales électriques et les automobiles et peuvent atteindre 120-170 ng/m³ en comparaison de 6-17 ng/m³ dans les zones suburbaines (Doll et *al.*, 1990). La fumée de cigarettes peut plus loin augmenter le nickel inhalé (Kasprzak et *al.*, 2003). Une autre source

d'exposition humaine du nickel est diététique ou quelques produits alimentaires, particulièrement des produits alimentaires d'usine (plante), peuvent contenir plus de 1mgNi/Kg (Denkhaus and Salnikov, 2002). L'exposition professionnelle au nickel arrive principalement dans l'extraction, le raffinage, la production d'alliage, la galvanisation et le soudage. En 1990 le comité international sur la cancérogénèse du nickel chez l'homme a suggéré que les risques de cancer respiratoires soient principalement rapprochés de l'exposition aux concentrations de nickel solubles au-dessus de 1mg/m³ et de l'exposition aux formes moins solubles dans des concentrations au-dessus de 10mg/m³ (CIRC, 1990). Cependant, le comité était incapable de déterminer avec certitude le seuil auquel l'exposition au nickel est exposée aux particules aéroportées contenant de nickel dans des concentrations aux limites de 0.1 à 1mg/m³ (CIRC, 1990 ; Denkhaus and Salnikov, 2002).

L'exposition aux composés de nickel peut produire plusieurs effets indésirables à la santé humaine. L'allergie au nickel dont la forme de dermatite de contact est la réaction la plus commune. Bien que l'accumulation de nickel dans le corps par l'exposition chronique peut mener à la fibrose pulmonaire, des maladies cardiovasculaires et rénales. Les inquiétudes les plus sérieuses sont en rapport avec l'activité cancérogène du nickel (Dogra *et al.*, 1999).

2. Identité et propriétés :

Le nickel (Ni) est le vingt-quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, sa concentration moyenne étant d'environ 75 µg/g. Son numéro atomique est 28 et il a une masse atomique de 58,71. Il existe sous les états d'oxydation -1, 0, +1, +2, +3 et +4, mais son état de valence le plus courant dans l'environnement est Ni²⁺ (Cotton and Wilkinson, 1988; Nieboer *et al.*, 1988). Il est présent dans la nature en tant que constituant trace d'une grande variété de minéraux, particulièrement ceux qui contiennent beaucoup de fer et de magnésium

comme l'olivine et les pyroxènes (Avias, 1972; CIRC, 1990). Dans les minéraux dont il constitue une partie essentielle, on le retrouve le plus fréquemment en combinaison avec le soufre, l'arsenic ou l'antimoine. C'est le cas de la millérite (NiS), du minerai rouge de nickel [principalement constitué de niccolite (NiAs)], de la pentlandite [(NiFe)₉S₈] et des dépôts principalement constitués de NiSb, NiAs₂, NiAsS ou NiSbS.

Le nickel est un métal d'un blanc argenté qui possède des propriétés métalliques typiques. Sa conductivité électrique et sa conductivité thermique sont élevées, son point de fusion est de 1452 °C et il peut être étiré, laminé, forgé et poli. Il résiste à l'action de l'air et de l'eau aux températures ambiantes (-20 à 30 °C) et il est donc souvent utilisé comme revêtement électrolytique de protection. Il est magnétique, mais pas autant que le fer (Cotton and Wilkinson, 1988).

Le nickel forme couramment des complexes stables avec des ligands contenant de l'oxygène, du soufre, du phosphore ou de l'arsenic, qui jouent le rôle d'atomes donneurs (CIRC, 1990).

Il forme une série de complexes stables à l'état divalent, le seul état d'oxydation important en milieu aqueux. Les composés du nickel les plus solubles dans l'eau sont le dichlorure de nickel hexahydraté (2 500 g/L), le sulfate de nickel hexahydraté (660 g/L), le sulfate de nickel heptahydraté (760 g/L) et le dinitrate de nickel hexahydraté (2 400 g/L) (Lide, 1992).

Parmi les composés du nickel qui sont moins solubles, on compte le dinitrate d'hexaamminenickel (45 g/L), le dihydroxyde de nickel (0,13 g/L) et le carbonate de nickel (0,09 g/L) (Lide, 1992).

Le disulfure de trinickel et le monoxyde de nickel sont considérés comme étant insolubles dans l'eau, mais ils sont tous deux solubles en milieu acide (Cotton and Wilkinson, 1988; ATSDR, 1997) (Tableau 01).

Tableau 01 : Propriétés physiques et chimiques du nickel et ses dérivés (ATSDR ,1997)

Propriétés	Nickel	Sulfate de nickel	Acétate de nickel	Chlorure de nickel	Nitrate de nickel
La formule chimique	Ni	Ni So ₄	Ni (CH ₃ CO ₂) ₂	Ni Cl ₂	Ni (NO ₂) ₂
Le poids moléculaire	58.69	154.75	176.80	129.60	182.72
La couleur	Argenté	Jaune verdâtre	Vert	Jaune doré	vert
L'état physique	Solide	solide	Solide	Solide	Solide
Point de fusion	1.455°C	840°C	Se décompose	1.001°C	56.7°C
Point d'ébullition	2.730°C	Se décompose à 840°C	16.6°C	Se vaporise à 973°C	136.7°C
La densité	8.91g/cm ³	4.01g/cm ³	1.798g/cm ³	3.55g/cm ³	2.05g/cm ³
L'odeur	inodore	inodore	Odeur acétique	Aucune	Aucune donnée

3. Utilisations :

Le nickel entre dans la fabrication d'environ 3 000 alliages qui ont plus de 250 000 applications (Association canadienne de l'électricité, 1985). Par exemple, l'acier inoxydable qui renferme du nickel est employé dans les industries chimiques et alimentaires ainsi qu'en médecine. Les alliages fer-nickel sont d'importants matériaux dans l'industrie électrique. Les alliages nickel-cuivre sont utiles pour la construction des navires.

Les alliages nickel-chrome sont utilisés dans des pièces de moteurs à réaction, des réacteurs nucléaires et des ailettes de turbines. Le nickel a également des applications importantes dans la fabrication de l'équipement électronique, des véhicules moteurs et des gazoducs et oléoducs (CIRC, 1990). Les composés du nickel sont aussi employés dans divers produits et procédés. Par exemple, le [carbonato (2-)] tétrahydroxytrinickel est employé pour le revêtement électrolytique, comme catalyseur pour le durcissement de graisses et dans des couleurs et des vernis pour céramiques.

Le carbonate de nickel est employé dans des pièces électriques; le dichlorure de nickel anhydre sert d'adsorbant pour l'ammoniac dans les masques à gaz et pour le nickelage; le dihydroxyde de nickel est employé pour la fabrication des électrodes dans les piles secondaires.

Le monoxyde de nickel est principalement utilisé dans les opérations métallurgiques, où il constitue une importante matière première pour les procédés de fonte et de production d'alliages, et il est aussi employé comme catalyseur et dans les couleurs pour le verre; le sulfate de nickel est employé dans la fabrication de catalyseurs, de solutions électrolytiques et

de bijoux; le dinitrate de nickel est employé pour le nickelage et dans les piles nickel-cadmium (CIRC, 1990).

Le sulfate de nickel est utilisé dans les bains de nickelage, come intermédiaire dans la fabrication de carbonate de nickel et de sulfate d'ammonium et de nickel. C'est le principal intermédiaire pour la fabrication de sels de nickel. Il sert à produire des catalyseurs et il est employé comme mordant pour les textiles, il est également employé pour le noircissement du zinc et du bronze. Le sulfure de nickel est utilisé dans la production de catalyseurs et dans l'hydrogénation des composés de soufre en pétrochimie (INERIS, 2006).

II. Principales sources d'exposition :

Le nickel représente 0.8 à 0.9% de la croute terrestre. Il est présent dans divers minerais. Le nickel est ubiquitaire. Il est présent dans de très nombreux objets de la vie courante, ce qui rend l'éviction très difficile, chez les sujets sensibilisés dans la population générale, le nickel qui pénètre dans l'organisme est de nickel ingéré et les principaux apports sont alimentaires ; ils sont de 100 a 300µg/j.

Les aliments les plus riches en nickel sont le cacao et le chocolat, le soja, les légumes secs, les noix et les céréales (Lauwerys, 2003). Le nickel est rejeté dans l'environnement sous des formes variées à partir de sources naturelles et anthropiques :

1. Sources naturelles :

L'altération et l'érosion naturelles de matériaux géologiques (p. ex., les moraines et leur sous-sol rocheux) libèrent du nickel dans les eaux superficielles et les sols. Les sources naturelles de nickel atmosphérique comprennent la poussière du sol, le sel de mer, les volcans,

les feux de forêt et les exsudats particuliers de la végétation (Warren and Delavault, 1954; Schmidt and Andren, 1980 ; Hutchinson et *al.*, 1982).

Dans la poussière du sol, le nickel est probablement présent en tant que constituant trace de minéraux qui renferment du fer et du manganèse (p. ex., les silicates et les oxydes) (Hutchinson et *al.*, 1986). Les embruns marins peuvent contribuer beaucoup à la présence de nickel dans l'atmosphère dans les régions éloignées de sources anthropiques pendant les mois d'hiver. Les feux de forêt peuvent aussi constituer des sources brèves mais intenses.

2. Sources anthropiques :

Les principales sources anthropiques sont la combustion de charbon ou de fuel, l'incinération des déchets, l'épandage des boues d'épuration, l'extraction et la production de nickel, la fabrication de l'acier, le nickelage et les fonderies de plomb.

Le nickel rejeté dans l'air par les fonderies se trouve probablement sous forme de sulfate de nickel, de disulfure de trinickel et de monoxyde de nickel (Gilman and Ruckerbauer, 1962).

L'incinération des ordures ménagères et des boues d'épuration ne représente qu'une petite partie du nickel rejeté dans l'atmosphère, principalement sous forme de composés solubles (39 - 58 %), sulfurés (<10 %) et oxygénés (40 - 61 %) (Steinsberger et *al.*, 1994).

Pendant la fabrication du ciment, du nickel est émis soit à partir des argiles, des calcaires et des schistes (matières premières), soit sous forme d'oxydes se formant à haute température dans les fours.

III. Informations sur l'exposition :

I. Devenir :**1.1. Air :**

La plus grande partie du nickel pénètre dans l'atmosphère sous forme de particules. Généralement les particules nickélifères de source anthropique n'ont pas la même composition et sont plus petites que les particules d'origine naturelle.

Les particules de nickel de source anthropique ont un diamètre qui varie de 0,1 à 2 μm , alors que les particules provenant des poussières soulevées par le vent, des embruns marins, des émissions volcaniques et des exsudats végétaux ont un diamètre compris entre 2 et 10 μm .

Bien que la distribution granulométrique des particules de nickel soit surtout fonction de leur source, des processus secondaires, comme la coagulation et la condensation, peuvent la faire varier un peu à mesure que l'aérosol vieillit (Schmidt and Andren, 1980) (Tableau 02).

Tableau 02 : Les concentrations ubiquitaires du nickel (INERIS, 2006)

Milieux	Concentrations
Air	$< 3\text{ng/m}^3$
eau douce de surface	$< 10\mu\text{g/L}$
Eau de mer	$< 0,5\mu\text{g/L}$
Eau de pluie	$< 1\mu\text{g/L}$
Sols	20mg/Kg
Sédiments	$< 20\text{mg/Kg}$

Comparativement aux grosses particules ($>10\ \mu\text{m}$), les particules fines ($1 - 10\ \mu\text{m}$), les particules fines ($1 - 10\ \mu\text{m}$) séjournent plus longtemps dans l'atmosphère et y sont transportées plus loin (Beijer and Jernelov, 1986).

Schmidt et Andren (1980) ont estimé que le temps de séjour dans l'atmosphère de la plupart des particules nickélifères d'origine naturelle et d'origine anthropique était de 5 à 8 jours.

Ces particules sont éliminées par dépôt sec et par dépôt humide presque dans les mêmes proportions. La persistance du tétracarbonylnickel dans l'atmosphère est faible.

Par exemple, à $25\ ^\circ\text{C}$, la demi-vie de ce composé, à des concentrations mesurées en nanogrammes par mètre cube, est inférieure à 1 minute (Stedman et Hikade, 1980; CIRC, 1990). Les composés du nickel n'absorbent pas le rayonnement (Lide, 1992).

1.2. Eau et sédiments :

Le nickel est un métal lourd relativement mobile. Dans les eaux naturelles, il est transporté sous forme de particules et sous forme dissoute.

Le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la force ionique, le type et la concentration des ligands organiques et inorganiques (en particulier les acides humiques et fulviques) et la présence de surfaces solides pour l'adsorption (en particulier les oxydes de fer et de manganèse hydratés) sont autant de paramètres qui peuvent influencer sur le transport, le devenir et la biodisponibilité du nickel en eau douce et en eau de mer (Callahan et *al.*, 1979; Schmidt et *al.*, 1980 ;Snodgrass, 1980).

Dans certains sédiments, en milieu réducteur et en présence de soufre, il se forme du sulfure de nickel, relativement insoluble (Ankley et *al.*, 1991).

Dans des conditions aérobies et à un pH inférieur à 9, les composés que forme le nickel avec des hydroxydes, des carbonates, des sulfates et des ligands organiques naturels sont suffisamment solubles pour maintenir des concentrations de Ni^{2+} aqueux supérieures à 60 $\mu\text{g/L}$ (Callahan et *al.*, 1979).

La plus grande partie du nickel présent dans les sédiments et les solides en suspension se partage entre les matières organiques, les revêtements précipités et coprécipités de particules et les particules cristallines.

L'activité microbienne ou des changements dans certains des paramètres physiques et chimiques (p. ex., baisse du pH ou augmentation des concentrations de ligands organiques) peuvent entraîner la désorption du nickel des particules ou des sédiments en suspension dans la tranche d'eau (Ditoro et *al.*, 1986).

1.3. Sol :

On trouve des quantités décelables de nickel dans la plupart des types de roches et ce nickel peut être mobilisé dans l'environnement superficiel au cours de l'altération chimique et mécanique qui transforme les roches en sol.

Kabata-Pendias et Pendias (1992) ont déterminé que les concentrations typiques de nickel dans les roches variaient d'un minimum de 5 à 20 $\mu\text{g/g}$ dans le cas des granites, des grès et des calcaires, par exemple, jusqu'à un maximum d'environ 2 000 $\mu\text{g/g}$ dans le cas des roches ultramafiques (dunites, pyroxénites et péridotites), dans lesquelles le nickel est présent sous forme de réseaux cristallins d'olivine et de pyroxènes.

La solubilité du nickel dans l'eau et, par conséquent, sa biodisponibilité à l'égard des végétaux dépendent du pH du sol; le nickel est généralement mobilisé lorsque le pH devient inférieur à 6,5 (Sunderman and Oskarsson, 1988 ; Sunderman et *al.*, 1989).

D'après les concentrations de nickel dans les sols et des estimations de la perte de nickel à partir des continents, on évalue à environ 3 500 ans le temps de séjour du nickel dans les sols (Sunderman et *al.*, 2001).

1.4. Organismes aquatiques :

En général, chez les organismes aquatiques, les facteurs de bioconcentration du nickel (rapports des concentrations dans les tissus secs aux concentrations dans l'eau) varient d'environ 100 à 5 000 l/kg.

Par exemple : des facteurs de bioconcentration de 12 l/kg 0 à 550 l/kg dans le cas de lichens submergés (Dietz, 1973); de 2 000 l/kg à 4 500 l/kg pour *Daphnia* spp. (Cowgill, 1976); de 200 à 1 000 pour les bivalves, le zooplancton et les organismes benthiques (Mathis and Cummings, 1973; Hutchinson et *al.*, 1976) et de 230 à 330 l/kg pour les poissons (Hutchinson et *al.*, 1976), selon la concentration d'exposition et l'âge de l'organisme.

Des facteurs de bioconcentration plus élevés (>10 000) ont été mesurés dans le cas de certaines espèces végétales tolérantes aux acides et aux métaux (Hutchinson et *al.*, 1976; Mann et *al.*, 1988).

Certains organismes benthiques, comme les unionidés, le périphyton et les écrevisses, peuvent accumuler des quantités de nickel plus importantes que les organismes pélagiques (c.-à-d. vivant dans la tranche d'eau) (Hutchinson et *al.*, 1976 ; Forester, 1980; Krantzberg, 1990).

Toutefois, pour les organismes vivant dans les sédiments, les facteurs de bioconcentration (soit, dans ce cas, les rapports des concentrations dans les tissus humides aux concentrations dans les sédiments secs) sont généralement de 1 ou moins (Hutchinson et *al.*, 1976; Wren et *al.*, 1988; Eriksen et *al.*, 1989).

La bioamplification est possible en raison des concentrations élevées de nickel dans les algues et les macrophytes, mais les animaux semblent capables de réguler la teneur en nickel de leurs tissus, soit en limitant l'absorption du nickel, soit en augmentant son excrétion (Stokes, 1988; Darmono, 1990).

Lorsque les algues et les macrophytes meurent, les détritiques produits constituent la principale source de nourriture pour les champignons et les bactéries, ce qui permet au nickel de s'introduire de nouveau dans la chaîne alimentaire (Mudroch, 1980; CIRC, 1990).

Les bactéries peuvent influencer la chimie et le transfert du nickel dans toute la chaîne alimentaire aquatique. Par exemple, dans des conditions réductrices, l'eau peut entraîner la transformation microbienne des sulfates en sulfures et la précipitation subséquente du sulfure de nickel insoluble (Babich and Stotzky, 1983^a, 1983^b).

1.5. Organismes terrestres :

Les paramètres du sol qui influent sur la disponibilité du nickel à l'égard des plantes et sur son absorption par celles-ci comprennent le pH, la teneur en matières organiques, la teneur en argile, la teneur en oxydes de fer et de manganèse hydratés et la capacité d'échange de cations (Halstead et *al.*, 1969; Haq et *al.*, 1980; Richter and Theis, 1980).

Le pH du sol est particulièrement important. Lorsqu'il est faible, les composés du nickel solubles en milieu acide [tels que les sulfures nickélifères et, dans une moindre mesure,

les minéraux silicatés (Buckman and Brady, 1960; Rencz and Shilts, 1980)] sont instables, et la capacité du sol d'éliminer le nickel de l'eau de porosité par adsorption (p. ex., sur des oxydes de fer hydratés) est très faible.

En présence d'un pH faible (<6,0), la biodisponibilité est donc fortement favorisée (Halstead et *al.*, 1969; Bisessar, 1989). Le nickel complexé par des ligands organiques dissous dans l'eau de porosité du sol devrait être moins disponible pour absorption par les plantes que les ions nickel libres (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

IV. Toxicocinétique :

1. Devenir dans l'organisme :

1.1. Le métabolisme et la disposition :

1.1.1. L'absorption :

L'absorption pulmonaire est l'itinéraire majeur pour la toxicité induite par le nickel. Le nickel soluble peut être absorbé sous forme d'ion (Ni^{+2}) pendant que les composés de nickel peu solubles peuvent être phagocyté (ATSDR, 1991). Le nickel et ses composés sont absorbés par les voies respiratoires et dans une moindre mesure par le tube digestif. Environ 20 à 35% du nickel inhalé (sous forme de composés peu solubles) sont absorbés dans le sang à partir des voies respiratoires (ATSDR, 1997). Les composés solubles du nickel (chlorure, sulfate) sont plus facilement absorbés par le tractus respiratoire. Par voie orale, quarante fois plus de nickel sont absorbés par le tractus gastro-intestinal, lorsque le sulfate de nickel est administré dans l'eau de boisson par rapport à son administration par la nourriture (Sunderman et *al.*, 1989). L'absorption du nickel existe également par voie cutanée. Cette voie est peu significative quantitativement mais importante cliniquement dans la pathogénie de la dermatite

de contact (ATSDR, 1997). Il n'existe pas de différence d'absorption du nickel par voie cutanée entre les sujets hyper sensibles et les autres (Sunderman et *al.*, 2001). Chez des rats exposés par gavage à une dose unique de différents composés du nickel (10mg de nickel) dans une solution saline, le pourcentage de la dose absorbée varie de 0.01% pour le monoxyde de nickel 0.47% pour le sulfure de nickel 11.12% pour le sulfate 9,8% pour le chlorure et 33,8% pour le nitrate (Iavicoli, 2003).

1.1.2. La distribution :

La distribution du nickel varie selon la voie d'exposition. Des travailleurs exposés par inhalation au nickel présentent des taux pulmonaires plus élevés que la population générale (ATSDR, 1997). Il est distribué dans tout l'organisme mais peut être varié selon l'itinéraire d'exposition, la forme chimique et le temps après l'exposition (Wahlberg, 1990). Bien que le rein et poumons soient les sites fondamentaux d'accumulation de nickel, autres organes tels que la rate, le foie, le cœur et les testicules peuvent aussi accumuler le métal à une ampleur beaucoup moindre. Dans le sérum et le placenta le nickel est lié aux protéines spécifiques et acides aminés. Ces ligands sont instrumentaux dans le transport et la distribution de nickel dans le corps (INERIS, 2006).

1.1.3. Le métabolisme :

Le nickel n'est pas détruit dans le corps, mais sa forme chimique peut être changée. Beaucoup de la toxicité du nickel peut être associée à son intervention avec le processus physiologique de zinc, calcium et manganèse et magnésium (Lauwerys, 2003). La plupart des maladies se déclarent (infarctus myocardique) et les blessures (blessures de la brûlure) sont associées aux concentrations de nickel dans le sérum (ATSDR, 1997). Dans le sérum, le nickel est lié à l'albumine, la L-histidine et l' α -macroglobuline. Chez les hommes,

les rats et les bovins, la fixation du nickel à l'albumine sérique se réalise au niveau d'un résidu histidine (ATSDR, 1991).

1.1.4. L'excrétion :

L'excrétion est principalement rénale ; elle est assez rapide. Le nickel ingéré (non absorbé) est excrété dans les fèces (ATSDR, 1997). La demi-vie plasmatique est de 12 à 24 heures et la demi-vie urinaire chez les travailleurs exposés est comprise entre 17 et 53 heures, selon l'hydrosolubilité des composés (Chantal, 2000). Après administration intrachéale, la voie d'élimination du nickel chez les rats dépend de la solubilité des composés. Pour les composés solubles (chlorure, sulfate), environ 70% de la dose administrée est excrétée dans l'urine en 3 jours. Pour les composés moins solubles (oxyde, sulfure de nickel), une grande partie de la dose est excrétée dans les fèces (Ho and Furst, 1973 ; ATSDR, 1997).

2. Toxicologie aigue :

2.1. Etudes chez l'homme :

Le composé du nickel ayant la plus forte toxicité aigue est le tétracarbonylnickel (ATSDR, 1991). Un résumé de 179 cas d'intoxications par inhalation survenus en Chine depuis 1961 a été publié par Shi (1986). Les concentrations dans l'air étaient supérieures à 50mg de tétracarbonylnickel/m³, avec des périodes d'exposition variant de 30 minutes à plus de 2 heures. Le temps de récupération varie de 7 à 40 jours selon la sévérité des symptômes.

La toxicité aigue se décompose en deux phases : immédiate et retardée. La symptomologie immédiate se manifeste par des maux de tête, des vertiges, des nausées, des vomissements, de l'insomnie et de l'irritabilité. Elle est suivie d'une période asymptomatique avant le début de

phase retardée. Celle-ci est essentiellement pulmonaire avec des douleurs constrictives dans la poitrine, une toux sèche, une dyspnée, une cyanose, une tachycardie, des symptômes gastro-intestinaux occasionnels, une sudation, des perturbations visuelles et une débilité. La symptomologie ressemble à une pneumonie virale (INERIS, 2006).

Un décès par syndrome de détresse respiratoire a été observé chez une personne qui pulvérisait du nickel lors d'un procédé de soudure sans porter d'équipement de protection (ATSDR, 1997). La mort est survenue 13 jours après l'exposition de 90 minutes à une concentration estimée de nickel métallique de 382mg/m^3 . Le décès d'un enfant de 2 ans a été observé après ingestion accidentelle de 570 mg de nickel/kg (sous forme de sulfate de nickel). Un arrêt cardiaque est survenu 4 heures après l'ingestion et l'enfant est décédé 8 heures après l'exposition (ATSDR, 1991). Des effets toxiques ont été observés chez 35 travailleurs d'installation de galvanisation ayant bu accidentellement de l'eau contaminée par du sulfate du chlorure de nickel, et de l'acide borique (Sunderman *et al.*, 1988). L'exposition a été estimée entre $7,1$ et $35,7\text{ mg}$ de nickel par kg . Les symptômes incluent des nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, maux de tête, sensation d'ébriété et une augmentation transitoire des érythrocytes (7 travailleurs), de la bilirubine sérique (trois travailleurs) et de l'albumine urinaire (trois travailleurs).

2.2. Etudes chez l'animal :

Chez 28 rats soumis par inhalation à une exposition unique de $36,5\text{ mg}$ de nickel/ m^3 (sous forme de sulfate) pendant 2 heures, quatre morts ont été observés dans les deux jours suivant l'exposition (Hirano *et al.*, 1994). Des hémorragies sévères des poumons ont été observées chez les rats décédés. Une augmentation de la susceptibilité aux infections à streptocoques a été observée chez des souris exposées à $0,46\text{ mg}$ de nickel/ m^3 (sous forme de

chlorure ou de sulfate) pendant 2 heures (Adkins *et al.*, 1979). Après un test de provocation avec des streptocoques, le taux de mortalité était environ 20 % supérieur chez les souris exposées au nickel par rapport aux témoins.

Les données de toxicité aiguë du nickel par voie orale indiquent que les composés solubles du nickel (acétate, sulfate) sont plus toxiques que les composés moins solubles (monoxyde et sous sulfure de nickel). La plupart des études d'inhalation aiguë portaient sur le tétracarbonylnickel; les doses létales 50 (DL₅₀) (Tableau 03).

Tableau 03 : Les différentes valeurs de DL50 des composés du nickel (INERIS ,2006)

Types de voies	Composés	DL50 (mg/Kg)	Espèces	Références
Inhalation	Tétracarbonylnickel	0,100	Rats, 20 minutes	OMS IPCS, 1991
Inhalation	Tétracarbonylnickel	0,240	Rats, 30 minutes	OMS IPCS, 1991
Inhalation	Tétracarbonylnickel	0,067	Souris, 30 minutes	OMS IPCS, 1991
Voie orale	Sulfate de nickel	39	Rats Sprague-Dawley (F)	Mastromatteo, 1986
Voie orale	Acétate de nickel	116	Rats Fischer 344 (F)	Haro <i>et al.</i> , 1968
Voie orale	Acétate de nickel	136	Souris Swiss-Webster (M)	Haro <i>et al.</i> , 1968
Voie orale	Monoxyde de nickel	> 3930	Rats Sprague-Dawley	Mastromatteo, 1986

Voie orale	Monoxyde de nickel	> 3665	Rats Sprague-Dawley	Mastromatteo, 1986
------------	--------------------	--------	---------------------	--------------------

3. Toxicologie chronique :

3.1. Effets systémiques :

3.1.1. Effets respiratoires :

L'exposition répétée aux dérivés inorganiques du nickel produit une irritation des voies respiratoires (rhinite, ulcérations de la cloison nasale, anosmie, sinusite, bronchite chronique). Des rhinites et des asthmes allergiques ont également été rapportés chez des travailleurs exposés à des sels ou à des fumées sensibilisation cutanée. Plusieurs cas de pneumoconiose sont publiés ; dans toutes les observations, l'imputabilité au nickel est incertaine, du fait de coexpositions à d'autres nuisances (Sunderman et *al.*, 2001).

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 à des concentrations supérieures à 0,04 mg de nickel/m³, sous forme de monoxyde ou de métal (Doll et *al.*, 1990). Les effets respiratoires étaient de type bronchite chronique, emphysème, diminution de la capacité vitale. Cependant, la toxicité observée ne peut être uniquement attribuée au nickel puisque les travailleurs étaient également exposés à d'autres métaux comme l'arsenic, l'uranium, le fer, le plomb et le chrome. D'autres études ne mettent pas évidence d'augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire (Cox et *al.*, 1981 ; Shannon et *al.*, 1991).

Des cas d'asthme ont été décrits à la suite d'une exposition professionnelle au nickel (Novey et *al.*, 1983 ; Siemiatycki et *al.*, 1988 ; Shirakawa et *al.*, 1990).

3.1.2. Effets immunitaires :

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 (Benson et *al.*, 1990). 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.

3.1.3. Effets cutanés :

Certains sels de nickel sont irritants ; c'est en particulier le cas du chlorure et du sulfate. Les dermatoses allergiques au nickel sont très fréquentes chez les ouvriers exposés et dans la population générale. En Europe, on estime qu'environ 10% des femmes et 2 % des hommes sont sensibilisés au nickel. Environ 10 % des eczémas des mains sont des eczémas au nickel. Chez les hommes, les eczémas au nickel sont habituellement professionnels ; chez les femmes, ce sont les contacts cutanés répétés avec des bijoux fantaisie, des boutons ou des parties métalliques d'accessoires vestimentaires qui sont les causes les plus fréquentes de sensibilisation. Chez les sujets sensibilisés, des doses très faibles ($3\mu\text{g}/\text{cm}^3$) sont suffisantes pour produire une poussée ; celles-ci peuvent également résulter de l'ingestion d'aliments contenant du nickel ou de la diffusion du métal à partir d'une prothèse. Il importe donc de pouvoir détecter le nickel dans les objets de la vie ordinaire des personnes allergiques ; c'est ce que permet le test au diméthylglyoxime : une coton tige imbibée d'une solution alcoolique a

1% de diméthylglyoxime et d'une goutte d'ammoniaque a 10 % est frotté sur l'objet suspect ; il se colore en rose si ce dernier contient du nickel (Sunderman et *al.*, 2001).

3.1.4. Toxicité rénale et hépatique :

Des atteintes rénales tubulaires ont été rapportées chez les travailleurs exposés au nickel, dont la nickelurie était supérieure à 100µg/l (ATSDR, 1998). Au niveau hépatique ; chez les rats il a été observé un gonflement des hépatocytes (à 15 jours), une nécrose focale et une vacuolisation (à 30 jours) (Purvi et *al.*, 2003). Cependant il n'est pas précisé si les rats avaient la possibilité de lécher la zone d'application du nickel sur la peau.

Tableau 04 : Les effets systémiques chez l'homme et l'animal (NERIS, 2006)

Substance chimique	Voies d'exposition	Taux d'absorption		Organe cible	
Substance	Voies	Homme	Animal	Principal	secondaire
Nickel	Inhalation	20 à 35 %	ND	poumons	Thyroïde, surrénales, reins
Nickel	Ingestion	0,7 à 27 % ¹	0,01 % à 33,8 % ²	Reins	Foie, cœur, poumons
Nickel	Cutanée	ND	ND	ND	ND

1 : pour le sulfate de nickel administré respectivement par la nourriture et dans l'eau.

2 : selon la forme chimique du nickel.

ND : Non disponible

3.2. Effets cancérogènes :

Les différentes études épidémiologiques portant sur les effets cancérogènes du nickel ont été basées sur des études des travailleurs de raffineries et ont mis en évidence une augmentation du risque de cancer du poumon et du nez. L'analyse de la majorité des études épidémiologiques par Doll *et al.*, (1990) a montré que les cancers du poumon et du nez sont principalement liés à des expositions à des composés peu solubles du nickel pour des concentrations supérieures à 10 mg de nickel/m³. Le centre international de recherche sur le cancer et l'union européenne a classé les oxydes et les sulfures de nickel dans le groupe 1 des substances certainement cancérogènes pour l'espèce humaine (CIRC, 1990).

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, soit une concentration de nickel d'environ 0,7 mg/m³) a entraîné une augmentation des tumeurs pulmonaires chez des rats Fisher 344 (Ottolenghi *et al.*, 1974). Les tumeurs incluaient des adénomes, adénocarcinomes, épithéliomes spinocellulaires et des fibrosarcomes.

3.2.1. Effets génotoxiques :

Il y'a quelques évidences pour suggérer que le nickel est clastogène et peut endommager l'ADN. Les brèches ou les aberrations chromosomiques ont été rapportées dans les lymphocytes d'ouvriers de la raffinerie du nickel (Waksvik and Boysen, 1982), les cellules de la moelle épinière de la souris après une injection intrapéritoniale (Waksvik *et al.* , 1984) , et les cellules épithéliales bronchiques humains (Wataha *et al.* , 2002).

3.3. Effets sur la reproduction et le développement :

3.3.1. Etudes chez l'homme :

Il n'existe pas des études chez l'homme quant aux effets sur la reproduction et le développement du nickel par voie orale ou cutanée (CIRC, 1991 ; ATSDR, 1997). Chez 356 femmes employées dans une raffinerie de nickel , exposées par inhalation a des concentrations de 0,084 a 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 (Smith et *al .*, 1993).

3.3.2. Etudes chez l'animal :

Chez le rat l'administration de sulfate de nickel a produit une nécrose des tubes séminifères. Chez la souris les sels de nickel sont tératogènes (anencéphalie, exencéphalie, fente palatine et autres malformations squelettiques) (CIRC ,1990). Par inhalation, les différentes études réalisées suggèrent que, par rapport au tractus respiratoire, le nickel n'est pas toxique pour la reproduction (ATSDR, 1997).

Une diminution du poids fœtal a été observée chez des nouveaux- nés de rats exposés 23,6 heures/jour a 1,6 mg de nickel/m³ (sous forme de monoxyde de nickel) du jour 1 au jour 21 de la gestation (Weischer et *al .*, 1980). Une dégénérescence tubulaire des testicules a été observée chez des rats exposés par voie cutanée avec du sulfate de nickel a la dose de 60 mg de nickel/kg/jour pendant 30 jours (Mathur et *al .*, 1977).

3.4. Effets sur l'environnement :

Le nickel est un élément naturel qui est présent dans l'environnement surtout à l'état divalent. Le nickel métallique, les alliages de nickel métallique, les alliages de nickel ainsi que divers composés du nickel sont largement employés dans les transports, l'électricité, l'industrie chimique et d'autres secteurs industriels.

Le nickel et ses composés ne pénètrent pas dans l'environnement en une quantité ou une concentration ou dans des conditions qui mettent ou peuvent mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie humaine (Sunderman et *al.*, 1988). Dans les sols acides, les minéraux nickélifères sulfurés et, dans une moindre mesure, silicatés (et peut-être le monoxyde de nickel) peuvent se dissoudre avec le temps, et une quantité relativement faible de nickel est éliminée de l'eau de porosité par adsorption.

Le nickel formant des complexes avec des ligands organiques dissous dans l'eau de porosité des sols devrait être moins biodisponible que les ions nickel libres (Sunderman and Oskarsson, 1988). Les concentrations de nickel dans des tissus végétaux constituent aussi une indication des concentrations des formes de nickel biodisponibles dans les sols.

Le nickel est présent en faibles concentrations (généralement d'environ 5 ng/m³) dans les particules en suspension dans l'atmosphère, son temps de séjour dans l'atmosphère est de 5 à 8 jours et il n'absorbe pas le rayonnement infrarouge. Le seul composé gazeux du nickel qui soit notable, le tétracarbonylnickel, se décompose dans l'air avec une demi-vie de moins d'une minute. Par conséquent, le nickel et ses composés ne devraient pas contribuer au réchauffement planétaire ni à l'appauvrissement de la couche d'ozone stratosphérique.

La biodisponibilité du nickel dans les sols varie, en particulier selon la forme sous laquelle se présentent le nickel et le pH du sol. Le nickel qui est fixé dans le réseau cristallin de minéraux silicatés naturels (p. ex., olivine ou pyroxènes) est relativement peu disponible pour être absorbé par les plantes comparativement aux formes solubles dans l'eau, comme le sulfate de nickel, qui peuvent se déposer sur les sols superficiels à partir de l'atmosphère. En général, la biodisponibilité augmente lorsque le pH du sol diminue.

Chapitre II : Stress oxydatif et Antioxydants

I. Stress oxydatif :

1. Définition :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (Wolin et *al.*, 1996 ; Wassmann et *al.*, 2004 ; Angelos et *al.*, 2005 ; Wolin et *al.*, 2005).

2. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) :

Les mitochondries, "poumons" de la cellule, sont responsables de la production de l'énergie indispensable au travail cellulaire. C'est au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale que s'effectue la réduction de l'oxygène en eau impliquant la formation de 6 molécules d'adénosine triphosphate (ATP), molécules à haut potentiel énergétique, pour une molécule de dioxygène réduite. Cependant, une réduction incomplète du dioxygène entraîne la formation d'espèces intermédiaires très réactives, à savoir les espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species).

La production de ces espèces pro-oxydantes est normale et s'accompagne d'un rôle physiologique important (Fridovich, 1995). Du fait de leur haute réactivité, elles régulent le phénomène d'apoptose, en entraînant la mort de cellules évoluant vers un état cancéreux.

Elles activent des facteurs de transcription, eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (phagocytose). Elles modulent encore l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (Angelos et *al.*, 2005).

Le paradoxe d'un tel processus provient d'une production accrue de pro-oxydants. Ces espèces, lorsqu'elles sont présentes en trop grande quantité dans l'organisme, provoquent des dégâts cellulaires importants, souvent irréversibles, tels que la cassure et la mutation de l'ADN, l'inactivation des protéines et des enzymes, l'oxydation de sucres ou encore la peroxydation lipidique au sein d'acides gras polyinsaturés.

3. Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui ont perdus un ou plusieurs électrons de l'orbite externe. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (système redox) (Halliwell, 1996). Les principales espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour reactive oxygen species).

4. Réactivité des ROS et conséquences liées à leur accumulation :

4.1. Le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) :

Les propriétés réductrices et oxydantes du radical anion superoxyde sont évidentes dans la dismutation. Le radical anion superoxyde occupe une place suffisamment négative dans l'échelle des potentiels d'oxydoréduction pour se comporter comme un

réducteur efficace vis-à-vis d'une série de molécules et de cations métalliques (Imlay and Linn, 1988).

Il vis-à-vis présente néanmoins une réactivité spécifique du fer ou d'autres cations métalliques comme le cuivre. En tant qu'oxydant, il entraîne en particulier la destruction (totale ou partielle) des centres fer-soufre (Fridovich, 1997).

4.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Bien que présentant une réactivité assez limitée, l'une des caractéristiques essentielles d' H_2O_2 est sa réactivité spécifique avec les résidus cystéine ou méthionine des protéines (Gilbert, 1990).

L'oxydation d'une cystéine par H_2O_2 entraîne la formation d'un acide sulfénique (Cys-SOH). Celui-ci peut réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure, ou s'oxyder en acide sulfonique (Cys-SO₂H) ou sulfinique (Cys-SO₃H).

Le peroxyde d'hydrogène est aussi responsable de certains dommages : pontages ADN/protéines ou lésions de l'ADN provoqués par les radicaux formés par la réaction de Fenton (Imlay et *al.*, 1988; Imlay and Linn, 1988).

4.3. Le radical hydroxyle ($\cdot OH$) :

Le radical hydroxyle, incontestablement le plus agressif des ROS, peut réagir avec l'ensemble des composants cellulaires. Les réactions d'additions conduisent par exemple à l'hydroxylation des bases puriques, pyrimidiques et de certains acides aminés aromatiques. $HO\cdot$ peut également arracher un électron, le plus souvent sous forme $H\cdot$ à une autre molécule qui devient à son tour radicalaire ($ROOH + HO\cdot \rightarrow ROO\cdot + H_2O$).

Ce phénomène est par exemple impliqué dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique (Halliwell, 1997 ; Laight et *al.*, 2000).

4.4. L'oxyde nitrique (NO):

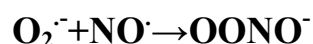
C'est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (Lombard et *al.*, 2000). L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et capable d'entamer la lipide peroxydation (Halliwell, 1996).

4.5. Le dioxyde nitrique (NO₂):

Il est formé à partir de la réaction du radical peroxyyle avec NO. Le dioxyde nitrique est un puissant déclencheur du lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés.

4.6. Le peroxynitrite (OONO⁻) :

La réaction du NO avec l'anion superoxyde donne naissance au peroxynitrite (Wozniak and Blasiak 2002).



Le Peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL (Halliwell, 1997). Il apparaît comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales.

Le peroxynitrite (OONO^-) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Knight et *al.*, 2001).

5. Origine et destinée des ROS :

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet, deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante.

En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui est un radical modérément réactif (Lee and Kim, 2006).

Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, en particulier de fer (Fe^{+2}), elle est transformée en radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$ par la réaction de Fenton. (Barouki and Morel, 2001). (Figure 01).

Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres.

Les ERO peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques (Figure 02). En effet, toute réaction impliquant de l' O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. C'est ainsi que la chaîne respiratoire (Figure 03) provoque une libération importante d'ERO, mais dont l'intensité demeure controversée.

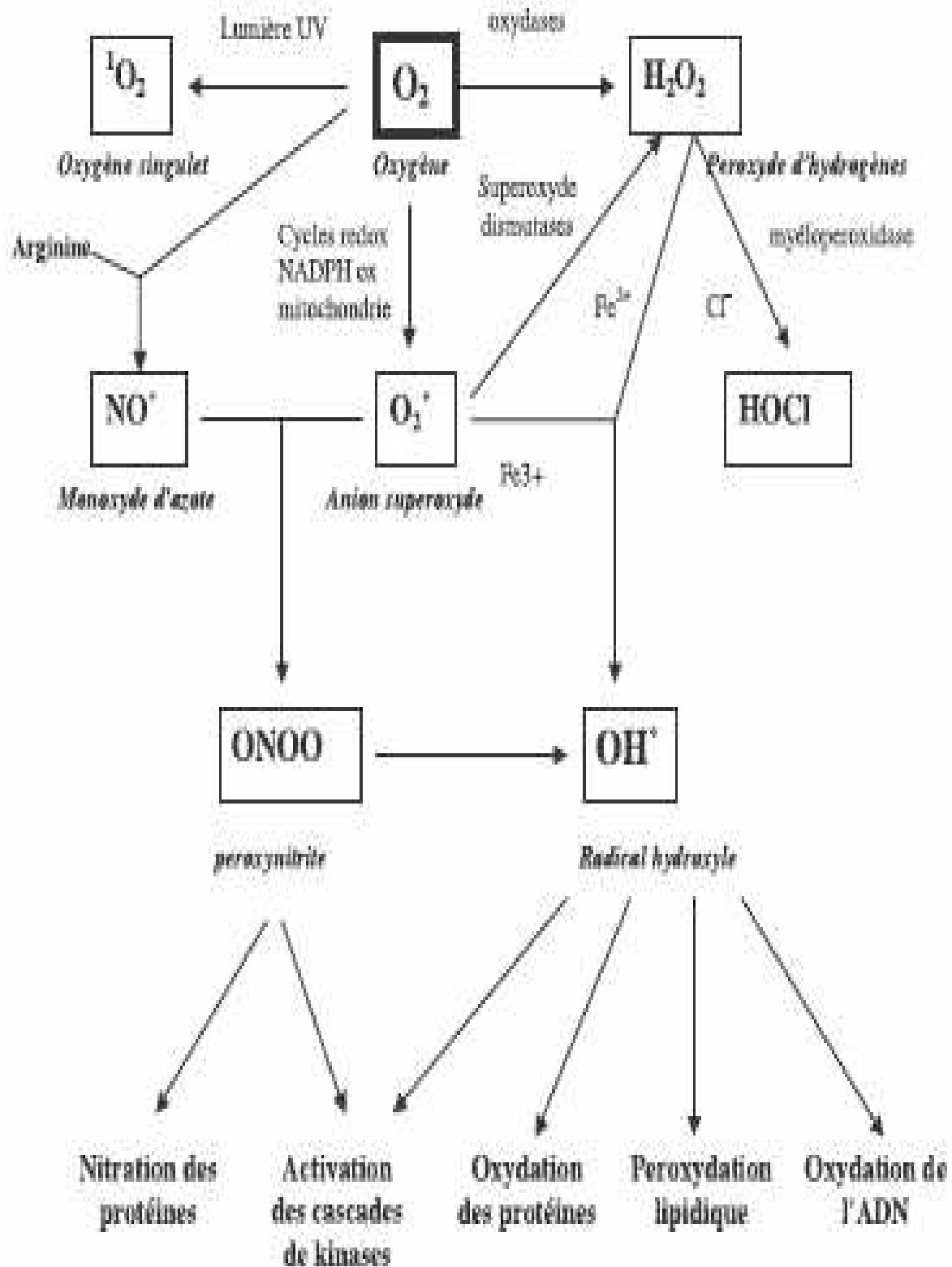


Figure 01 : Voies métaboliques de l'oxygène et des ERO (Espèces réactives de l'oxygène) (Barouki and Morel, 2001)

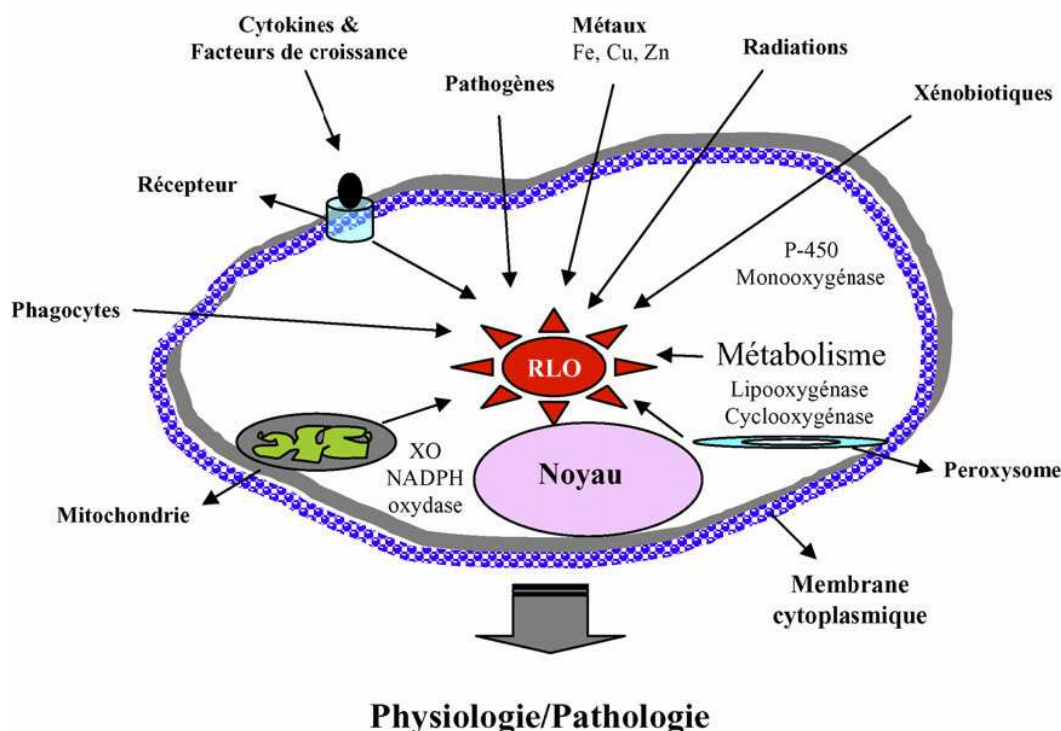


Figure 02 : Origine intra et extracellulaire des ROS (Berger, 2006)

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

D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des ERO, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO (Barouki and Morel ,2001).

Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques. Or, le NO interagit avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite, composé extrêmement réactif et toxique.

L'oxyde nitrique (NO) et peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés. D'autres molécules comme les hydroquinones se retrouvent sous forme de radicaux libres après leur réaction avec le radical $\bullet\text{OH}$.

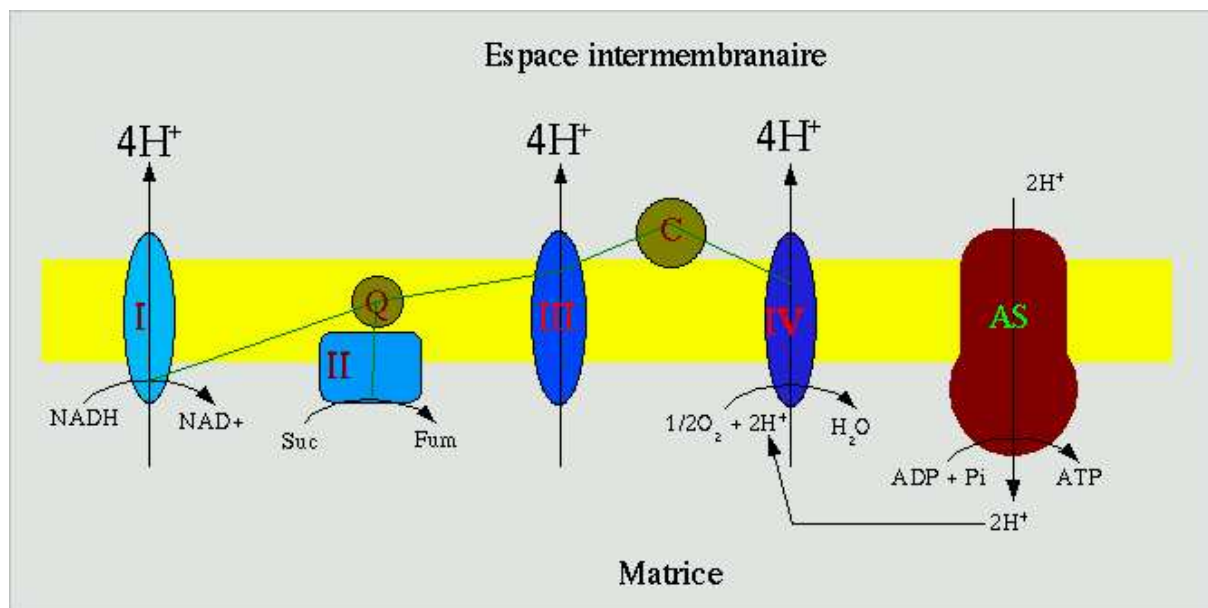


Figure 03 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire (Barouki and Morel ,2001)

6. Conséquences :

Les ROS étant capables de réagir à différents niveaux dans les cellules; les conséquences liées à leur accumulation peuvent être très graves (Stedman et *al.*, 1980 ; Berlett and Stadtman , 1997).

Les dommages sur les lipides, principalement ciblés sur les acides gras de la bicouche membranaire, entraînent une cassure des parois cellulaires. L'oxydation d'un ou plusieurs acides aminés des protéines peut conduire d'une part à une inactivation de celles-ci et d'autre part à des pontages protéine-protéine ou ADN/protéine. Cette oxydation augmente la sensibilité à la protéolyse (Berlett and Stadtman, 1997).

Les dommages oxydatifs sur les acides nucléiques entraînent des mutations et des dégradations des bases pouvant provoquer le clivage d'un brin d'ADN. Les pontages ADN/protéine générés par oxydation de l'ADN ou de la protéine peuvent provoquer un

dérèglement de la machinerie répliquative (Beckman and Ames, 1997; Burrows and Muller, 1998).

Toutes les réactions engendrées par ces dommages oxydatifs peuvent être la cause de mutations, de cancers et au final provoquer la mort cellulaire.

II. ROS et signalisation cellulaire :

La majeure partie des publications concernant le stress oxydatif démontre clairement les effets toxiques des ROS. Il ne faut cependant pas négliger que de manière très fortement contrôlée, les ROS jouent des rôles cruciaux dans certaines fonctions cellulaires (Scandalios, 2004).

O₂⁻ et H₂O₂ sont notamment décrits comme étant des messagers secondaires dans des mécanismes tels que la division cellulaire, la signalisation par les facteurs de croissance, le transport d'ions (Ca²⁺), l'activation des facteurs de transcription et l'apoptose. Ainsi, les ROS ne sont pas que des « déchets » issus de l'adaptation des organismes à l'oxygène.

Il est désormais admis qu'ils font partie intégrante des mécanismes de signalisation cellulaire et de l'homéostasie redox (Lander, 1997; Delaunay et *al.*, 2000; Zheng and Storz, 2000 ; Scandalios, 2004).

Certaines plantes produisent de façon rapide et transitoire d'abondantes quantités de ROS pour lutter contre une invasion de pathogènes (Scandalios, 1997). L'activation des systèmes permettant la mise en place des mécanismes de dégradation des ROS est finement contrôlée par des régulateurs spécifiques. Ces régulateurs réagissent le plus souvent de façon directe avec l'espèce réactive concernée.

Quelques systèmes de régulation seront décrits dans la suite du manuscrit. Auparavant, nous nous intéresserons aux systèmes permettant de palier une accumulation de ROS dans la cellule.

III. Marqueurs du stress oxydatif :

Le stress oxydatif, dû aux radicaux libres, entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines, de l'ADN ou des lipides (Laight et *al.*, 2000).

1. Oxydation des protéines :

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation. En effet, les protéines peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires.

En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues vulnérables à l'action des protéases. Lors d'un stress oxydatif important, les cellules sont incapables d'éliminer par protéolyse les protéines oxydées accumulées, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète.

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés.

Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables (Laight et *al.*, 2000).

2. Peroxydation lipidique :

Les lipides, principalement les acides gras polyinsaturés, peuvent subir une attaque radicalaire, par le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy.

Une réaction en chaîne se produit conduisant à la transformation du radical peroxy, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et *al.*, 1992).

Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont les substances réagissantes aux malonaldehyde/acide thiobarbiturique, les diènes conjugués, les hydroperoxydes lipidiques et les isoprostanes (Serafini et *al.*, 2000).

Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides (PL) membranaires que les lipoprotéines circulantes, avec des conséquences différentes. En effet, l'atteinte des PL entraîne une modification de la fluidité membranaire, altère les systèmes de transfert d'ions, ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecte les voies de transduction des signaux (Favier, 2003).

L'attaque des lipoprotéines circulantes, notamment des LDL, aboutit à leur oxydation, puis leur captation par les macrophages pour donner des cellules spumeuses à la base du dépôt lipidique de la plaque d'athérome (Mohandas, 2010).

IV. Stress oxydant et pathologies :

Les recherches menées au cours des dernières décennies ont montré que de nombreuses situations physiopathologiques, ainsi que les maladies osseuses et cancéreuses,

seraient associées et favorisées par la production de radicaux libres lorsque cette production dépasse les capacités de défense anti-oxydantes, ce qui correspond alors à l'état dit de stress oxydatif (Mumtaz et *al.*, 2002 ; Salnikow and Kasprzak, 2005 ; Ashraf et *al.*, 2007).

Pourquoi les craindre ? Parce qu'elles réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives par extension de proche en proche. Elles s'attaquent aux composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN), lésant ainsi :

- les acides nucléiques, par fragmentation et désordre de réplication de l'ADN, entraînant des mutations et des cancers.
- les structures lipidiques, ainsi que les composantes matricielles.
- les fibres de collagènes et donc la rigidité des tissus y compris l'os.

Ils sont aussi impliqués dans l'oxydation des protéines qui peuvent mener à leur fragmentation chimique, ou à leur susceptibilité accrue à l'attaque protéolytique.

1. Le stress oxydant et le cancer :

Les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les ROS intervenaient dans l'activation des pro-oncogènes, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 (Yao et *al.*, 2001).

Il a été démontré que le stress oxydatif stimule l'angiogenèse tumorale (Gerald et *al.*, 2004 ; Gerald et *al.*, 2005 ; Pouyssegur and Mehta, 2006). Il paraît que la vitamine E jouerait un rôle dans la minéralisation et que son déficit provoquerait le début de maladies des os et du foie.

2. Le stress oxydant et le diabète :

Le stress oxydant est augmenté dans les différents tissus à la fois dans le cas de diabète expérimental ou pour les patients diabétiques, l'hyperglycémie induit une production prolongée des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire et ceux-ci prolongent le gradient électrochimique des protons généré dans la chaîne mitochondriale menant à une surproduction d'anion superoxyde, qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène qui peut endommager les cellules dans de nombreuses voies à travers le stress oxydatif, en l'absence d'une compensation appropriée de la réponse des réseaux antioxydants endogènes des cellules, le système est débordé, entraînant un déséquilibre d'oxydo-réduction, ce qui aggrave encore la situation (Korshunov et *al.*, 1997).

Les espèces réactives de l'oxygène générées lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides. En plus il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies de stress sensible par l'élévation du glucose et des acides gras conduit à deux niveaux de résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline et la dysfonction des cellules B sécrétrice de l'insuline (Evans et *al.*, 2003).

3. Le stress oxydant et l'obésité :

L'obésité est depuis peu considérée comme un état inflammatoire caractérisé par une augmentation du stress oxydant systémique. En effet, la concentration urinaire en 8-épi-PGF_{2α} (marqueur de stress oxydant) est directement corrélée à une augmentation de l'indice de masse corporelle (Grimsrud et *al.*, 2007).

De plus l'induction de l'obésité chez des souris, par un régime hyperlipidique, augmente significativement les concentrations circulantes des marqueurs de la peroxydation lipidique et induit l'oxydation de l'albumine plasmatique (Yamamoto et *al.*, 2007).

La concentration des protéines carbonylés dans le tissu adipeux (conséquence directe d'un stress oxydant) est de 2 à 3 fois plus élevée chez les souris obèses que chez les témoins (Grimsrud et *al.*, 2007).

De même la concentration dans le tissu adipeux de la glutathion s-transférase A4, la première enzyme qui neutralise le 4-hydroxynonéal (aldéhyde très réactif issu de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés n-6), est diminuée de 3 à 4 fois.

La concentration des protéines modifiées par le 4-hydroxynonéal (4-HNE) dans le tissu adipeux des souris obèses est par conséquent plus élevée (Grimsrud et *al.*, 2007).

Le 4-HNE produit, se fixe de manière covalente sur plusieurs protéines du tissu adipeux des souris obèses, notamment, la fatty acid binding protein (FABP), modifiant ainsi son affinité pour les acides gras libres et interférant avec son activité (Grimsrud et *al.*, 2007).

4. Le stress oxydant et l'intoxication aux pesticides :

L'utilisation des pesticides dans notre environnement ainsi que leur présence résiduelle dans les aliments favorisent le stress oxydant (Bayoumi et *al.*, 2000). La vitamine E jouait un rôle très important contre le stress oxydant généré par les intoxications, notamment aux pesticides et aux métaux lourds (Nemmiche et *al.*, 2007).

V. Systèmes de défenses antioxydants :

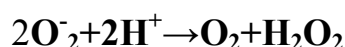
L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro- ou liposolubles. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Emerson et *al.*, 2003).

1. Le système antioxydant enzymatique :

1.1. Les superoxydes dismutases (SOD) :

Les superoxydes dismutases (SOD) (EC : 1.15.1.1) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions peroxydes en oxygènes moléculaires et peroxydes d'hydrogène composés stables et moins toxiques (Comhair and Erzurum, 2001) selon la réaction suivante :



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases (Figure 04).

Les SOD étaient connues comme les seules enzymes capables d'éliminer le radical anion superoxyde, jusqu'à la découverte en 2000 des superoxyde Réductase (SOR) (Lombard et *al.*, 2000).

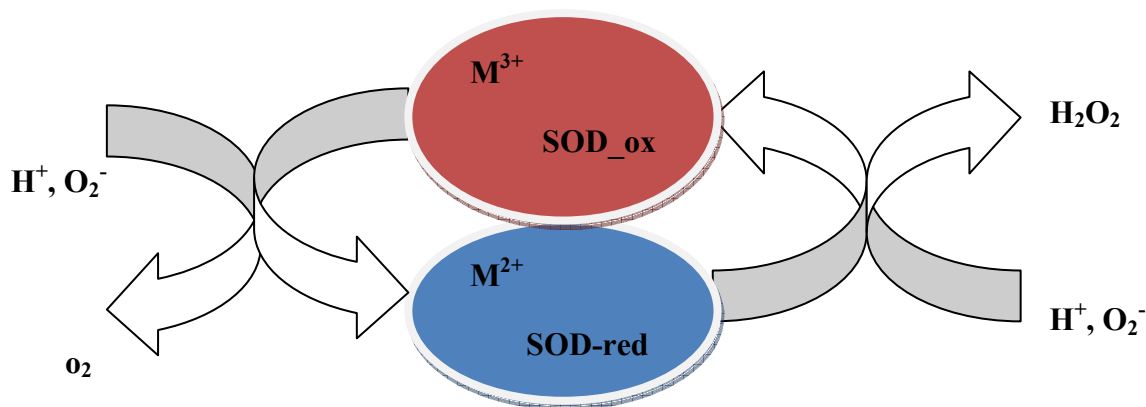


Figure 04 : Cycle catalytique de la Superoxyde Dismutase (SOD) M^{2+/3+} correspond au métal du site catalytique de l'enzyme. SOD_{ox} : SOD oxydée ; SOD-red : SOD réduite (Lombard et *al.*, 2000).

1.2. Les superoxydes Réductases (SOR) :

La Superoxyde Réductase est une enzyme qui élimine le radical anion superoxyde par réduction à un électron (Figure 05). Cette enzyme a été identifiée chez des bactéries strictement anaérobies comme *Desulfoarculus baarsi*, *Archeoglobus fulgidus* ou encore *Treponema palildum*.

La SOR est une métalloprotéine contenant un site actif à fer ferreux non-héminique (Lombard et *al.*, 2000; Niviere and Fontecave, 2004). La vitesse de réaction de

réduction d' O_2^- au niveau du site catalytique de l'enzyme est de l'ordre de $10^9 M^{-1} s^{-1}$ et permet de limiter efficacement la diffusion du radical anion dans la cellule.

Après réduction du radical anion, l'enzyme est régénérée car elle est capable d'accepter les électrons d'une large gamme de donneurs (NADPH-flavodoxine réductase Fpr, cytochromes, rubrédoxine). L'enzyme ne semble pas reconnaître un réducteur spécifique (Emerson et *al.*, 2003).

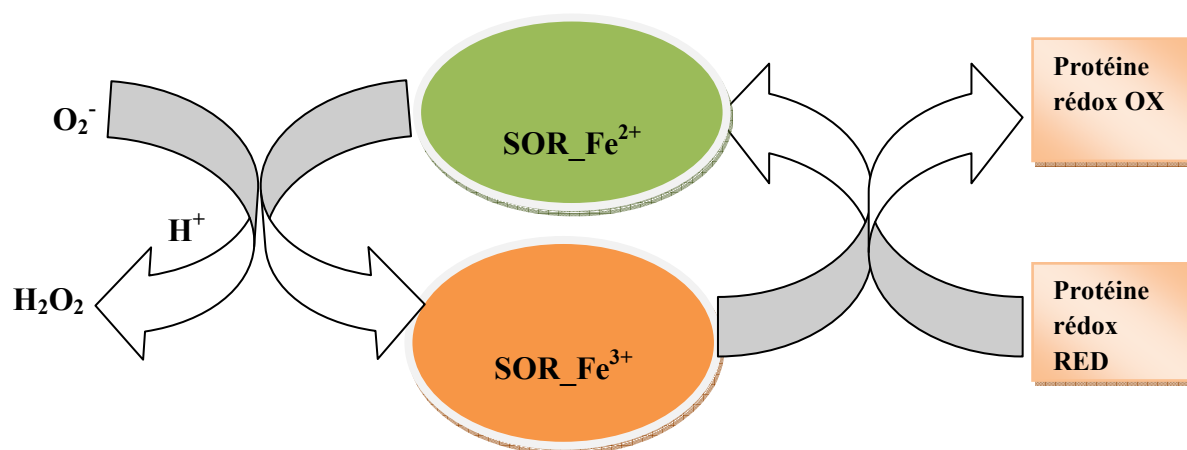


Figure 05 : Cycle catalytique de la superoxyde réductase (Niviere and Fontecave, 2004).

RED : réductrice ; OX : oxydante

Les Superoxyde Dismutases et les Superoxyde Réductases permettent ainsi de prévenir la toxicité liée au radical anion superoxyde. Cependant, ces réactions de dismutation ou de réduction d' O_2^- conduisent à la formation de peroxyde d'hydrogène.

1.3. Les catalases :

Les catalases font partie des toutes premières enzymes caractérisées chez *E. coli* (Loewen, 1984). Ce sont des protéines hémiques présentes dans tous les organismes.

Localisées dans le peroxysome, elles possèdent une très forte affinité pour H_2O_2 permettant de limiter sa diffusion dans la cellule. (Scandalios, 2005).

Le cycle catalytique passe par un intermédiaire de type Fe(V)-oxo. A faible concentration en H_2O_2 (inférieure à $1\ \mu\text{M}$), elle agit comme une peroxydase, qui fait intervenir des cofacteurs donneurs d'électrons selon la réaction : $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$.

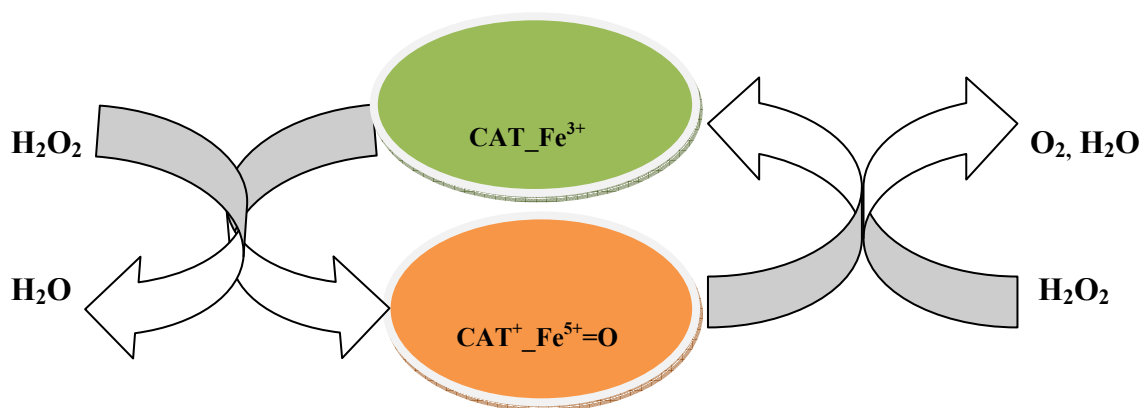


Figure 06 : Représentation schématique du cycle catalytique de la catalase (Loewen et al., 2004).

Les catalases sont uniques du fait qu'elles n'ont pas besoin de cofacteur réducteur, ce qui est plus économique d'un point de vue énergétique pour la cellule. En cas de stress impliquant une surproduction de H_2O_2 , les catalases ont la capacité de dégrader rapidement et efficacement H_2O_2 et ceci sans consommer d'énergie.

La catalase est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^3 et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 (Scandalios et al., 2005).

La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Scandalios et *al.*, 1997).

1.4. Les glutathions peroxydases (GSH-Px) :

Les GSH-Px constituent une famille d'enzymes capables de réduire des composés hydroperoxydes en leurs composés hydroxyles correspondants en utilisant du glutathion ou des agents réducteurs équivalents comme co-substrats (Cantin, 1999).



Le glutathion oxydé sera régénérée grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH, H^+ , formé principalement par la voie des pentoses phosphates (Meister and Anderson, 1983 ; Deneke and Fanburg, 1989).

On distingue 5 isoenzymes de la GSH-Px contenant du sélénium chez les eucaryotes: la GSH-Px1 ou CGSH-Px cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 ou giGPx gastrointestinale, la GSH-Px3 ou pGSH-Px plasmatique, la GSH-Px4 ou HP-GSH-Px localisée à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme et la GSH-Px5 ou snGSH-Px épидидymaire (Comhair and Erzurum, 2000). La plus abondante est la GSH-Px1. Elle est exprimée dans la plupart des cellules.

A la différence des autres GSH-Px qui n'est capable de réduire les peroxydes membranaires qu'après l'action de la phospholipase A_2 et qui n'agit que sur les acides gras hydroperoxydés, la GSH-Px4 peut directement réduire, sans action préalable de la

phospholipase A₂, les hydroperoxydes des phospholipides et du cholestérol au niveau des membranes cellulaires en alcools correspondants et en utilisant le GSH comme deuxième substrat réducteur.

Ainsi, la GSH-Px4 joue un rôle fondamental dans la protection des membranes cellulaires contre les effets délétères de la peroxydation lipidique (Delattre et *al.*, 2005). Il est important de noter que les GSH-Px séléno-cystéine sont spécifiques du glutathion bien que la GSH-Px plasmatique (GSH-Px3) puisse utiliser un autre thiol réducteur : la thiorédoxine (Delattre et *al.*, 2005). (Tableau 04).

Tableau 05 : Principales enzymes du système de défenses antioxydantes enzymatiques (Delaunay et *al.*, 2000)

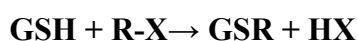
Catégorie	Localisation	Propriétés
Cu/ZnSOD	Cytosol et noyau	Catalyse la dismutation d'O ₂ ⁻ en H ₂ O ₂ et O ₂
MnSOD	Mitochondries	Catalyse la dismutation d'O ₂ ⁻ en H ₂ O ₂ et O ₂
Catalase	Peroxisomes	Catalyse la dismutation du H ₂ O ₂
Glutathion peroxydase	Cytosol et mitochondries	Catalyse la réduction du H ₂ O ₂ et des hydroperoxydes

1.5. Les glutathions transférases (GST) :

Glutathion S-transférase (GST EC 2.5.1.18) est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka et *al.*, 2003). La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Gattás et *al.*, 2004 ; Zhihua et *al.*, 2004).

En plus de l'activité de conjugaison du GSH et la réduction des peroxydes, GST est associée avec d'autres processus biologiques. Quelques GST sont impliquées dans la modulation des canaux ioniques (Dulhunty et *al.*, 2001), d'autres dans la synthèse des eicosanoides, leukotrienes et les prostaglandines, (Bartling et *al.*, 1993) (Fernandez-Canon and Penalva, 1998).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



2. Systèmes antioxydant endogène non enzymatiques :

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q.

De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le $\cdot\text{NO}$ (Favier, 2003).

2.1. Le glutathion :

Le glutathion est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. C'est un constituant intracellulaire ubiquiste présent à des concentrations millimolaires dans la plupart des cellules et micromolaires dans le plasma (Gerard-Monnier and Chodière, 1996).

En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases.

Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vit C, la vit E et les superoxydes dismutases (Gerard-Monnier and Chaudiere, 1996).

Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente la très grande majorité du glutathion total (90 à 98%) ; lors d'un stress oxydant le GSH est oxydé avec la formation de pont disulfure, GSSG, et/ou de pont disulfure mixte, GSSR (R étant fixé à un autre thiol radicalaire) (Stamler and Slivka, 1996).

Le glutathion agit également comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (Ravi *et al.*, 2004).

2.2 L'acide α -lipoïque :

C'est un cofacteur des enzymes impliquées dans les processus de décarboxylation oxydative. Il exerce son rôle sous forme réduite, l'acide α -dihydrolipoate. (Delattre *et al.*, 2005). Son utilisation comme permet de réduire l'effet du stress oxydant (Vertuani and Manfredini, 2004).

2.3 La bilirubine :

La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxydes ROO $\cdot$ et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil and Stocker, 1993).

2.4 Les hormones sexuelles :

Les hormones sexuelles femelles, grâce à la présence d'un hydroxyle phénolique au niveau de leur structure chimique, peuvent inhiber la peroxydation lipidique des LDL in vitro, à des concentrations micromolaires (Keaney *et al.*, 1994).

Des composés comme les thiorédoxines, les glutarédoxines et les métallothionéines, joueraient sans doute un rôle protecteur, même si l'importance de leur action n'a pas été encore clairement établie (Favier, 2003).

3. Molécules antioxydantes exogènes non enzymatiques :

3.1. La vitamine C :

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et pyroxyles, et de l'oxygène singulet.

Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (Delattre *et al.*, 2005).

La vitamine C est primordiale à la formation et au maintien du collagène, protéine qui maintient les cellules du corps en place. Le collagène est indispensable aux os, aux dents et à la guérison des blessures.

3.2. La vitamine E :

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singuet (O_2) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Madu and Devi, 2000).

Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ($ROO\cdot$) pour former un radical tocophéryle. L' α -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies ; d'une part, la vitamine C, ou l'acide ascorbique, est capable de réduire le radical tocophéryle, d'autre part, une enzyme spécifique, glutathion dépendante, la tocophéryl réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol. Parallèlement, le glutathion à l'état réduit (GSH) est oxydé en glutathion oxydé (GSSG) (Madu and Devi, 2000).

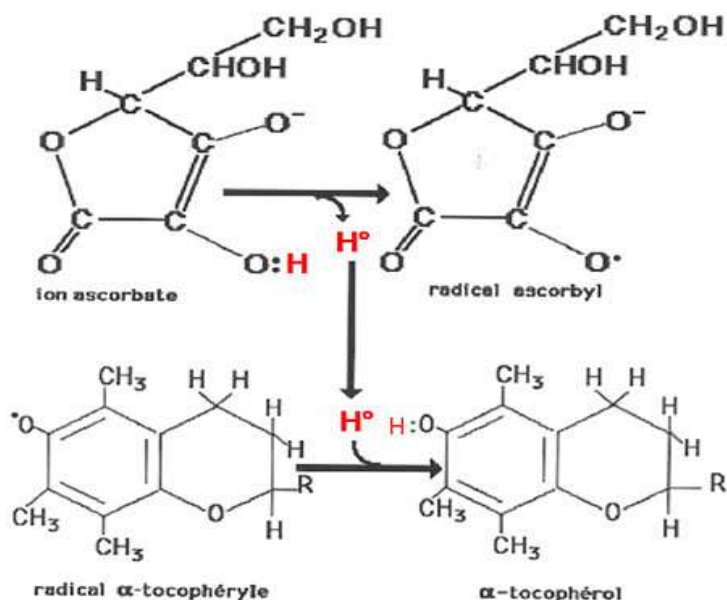


Figure 07 : Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C) (Madhu and Devi ,2000)

Elle existe sous différentes formes chimiques (Figure 07). Le composé le plus actif est l'alpha tocophérol (Figure 08) (scavenger). Elle se trouve dans tous nos tissus. La vitamine E est antioxydante, elle protège les acides gras poly-insaturés des membranes cellulaires de nos tissus contre les dommages de l'oxydation en neutralisant ces radicaux libres.

Elle fonctionne de pair avec les autres anti-oxydants tels que les vitamines C et A et le sélénium. La vitamine E jouait un rôle préventif dans le développement des cancers et aurait un effet bénéfique sur les maladies cardiovasculaires en limitant les effets néfastes du cholestérol (Pham et *al.*, 2005).

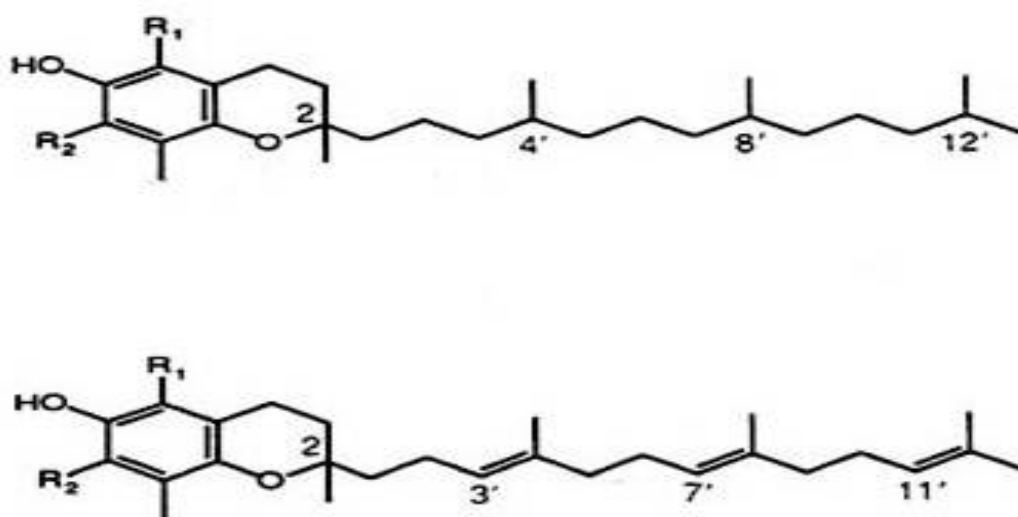


Figure 08 : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols (Wu et *al.*, 2002) .

Il est fortement suggéré que la vitamine E ait un rôle préventif contre le cancer. Cependant, les données de la littérature se contredisent (Wu et *al.*, 2002 ; Virtamo et *al.* , 2003 ; Pham et *al.*, 2005).

Une vaste étude clinique menée en Finlande et une étude épidémiologique indiquent que ces suppléments peuvent réduire le risque de cancer de prostate chez les fumeurs (Kirsh *et al.*, 2006).

Un suivi de l'essai finlandais démontre que l'incidence du cancer de la prostate est revenue à la normale après l'arrêt de la vitamine E, ce qui signifie que, pour exercer son effet protecteur, la prise devrait être continue (Virtamo *et al.*, 2003).

L'effet préventif de la vitamine E est attribué à son activité antioxydante. En effet, la vitamine E se fixe au sein des membranes lipidiques grâce à sa longue chaîne lipidique, et c'est sa fonction phénolique qui est responsable de son activité antioxydante. Ainsi, sa présence permet la conservation de l'intégrité des lipides membranaires (Nemmiche *et al.*, 2007).

Il est possible que le tocophérol agisse également sur le plan hormonal, puisque la vitamine E abaisse le taux sanguin hormones stéroïdiennes notamment la testostérone et l'androstènedione (Hartman *et al.*, 2001).

Dans deux études américaines, la prise de vitamine E est associée à la réduction de moitié des risques de cancer de l'oropharynx (GRIDLEY) et de 68% de cancer du côlon (BOSTICK).

Un essai clinique avec placebo de grande ampleur est en cours depuis 2001 afin de vérifier les effets préventifs du mélange vitamine E naturelle/sélénium sur le cancer de la prostate. Elle sera menée jusqu'en 2013 auprès de plus de 35 000 sujets (Klein *et al.*, 2003).

3.3. Le β -carotène :

Le β -carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités : il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Vertuani and Manfredini, 2004).

3.4. Les polyphénols :

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes .

En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et *al.*, 2005).

3.5. Le sélénium :

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des scléroprotéines (Vertuani and Manfredini, 2004).

3.6. Le zinc :

Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD. Cependant, au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (Delattre et *al.*, 2005) .

Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions, en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton. (Kasprzak, 1997). Il protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires (Figure 09).

Son activité antioxydante pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (Delattre et *al.*, 2005).

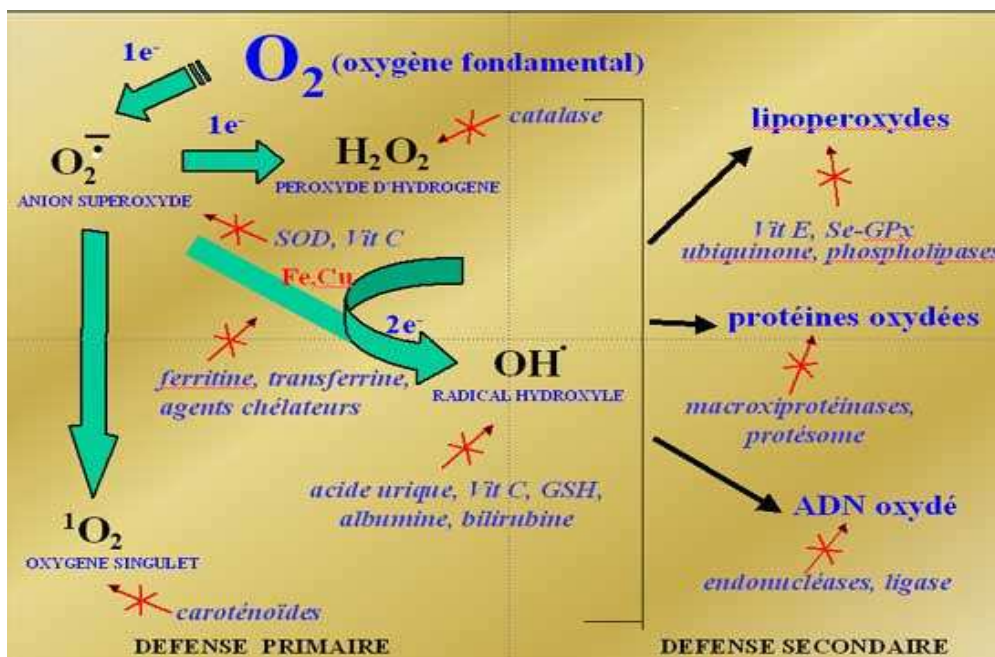


Figure 09 : Balance entre antioxydants et prooxydants (Delattre et *al.*, 2005)

3.7. Manganèse :

Le manganèse (Mn) est lui aussi l'un des constituants de la superoxydysmutase (SOD) et peut être considéré à ce titre comme un antioxydant majeur.

Il participe aussi avec d'autres enzymes au contrôle du sucre et à la production des cellules sanguines. Il favorise l'utilisation de diverses vitamines (C, B, E).

Il intervient dans le métabolisme des sucres, des graisses, et des protéines. Il est indispensable à la production des hormones sexuelles ainsi qu'au bon fonctionnement du système nerveux central et périphérique. Enfin, il favorise le fonctionnement de la glande thyroïde. (Sies, 1991).

Il est contenu dans les céréales, les fruits, le poisson, les légumes. Une carence peut provoquer : une fatigue, des allergies, un retard de croissance, une intolérance au glucose et un dérèglement de la coordination musculaire.

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes :**1. Matériel biologique et conditions d'élevage :**

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé 56 rats males de la souche Wistar albinos, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevage Kouba, Alger). A leur arrivée, ces rats pesaient entre 130 à 180g. Afin d'éviter la variabilité inter-sexe, nous n'avons utilisé que des males. Ils ont été préalablement acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant deux semaines. Les conditions sont caractérisées par une hygrométrie de 70 %, une température de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode naturelle (12h de lumière /12h d'obscurité). Les animaux ont librement accès à l'eau et à la nourriture (ONAB, Annaba) qui est équilibré en protéines, glucides, vitamines et sels minéraux.

2. Protocol expérimental :

Les rats males ont été répartis en 7 lots de 8 rats chacun, il s'agit de :

Lot (1) : Témoin

Lot (2) : Traité par le zinc (Zn) (227mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau).

Lot (3) : Traité par la vitamine C (VitC) (1g/l acide ascorbique dans l'eau).

Lot (4) : Contaminé par le nickel (Ni) (800mg/l $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau). (Sidhu et *al.*, 2006).

Lot (5) : Contaminé par le nickel (Ni) (800mg/l $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau) et traité par le zinc (Zn) (227mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). (Sidhu et *al.*, 2006).

Lot (6) : Contaminé par le nickel (Ni) (800mg/l $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau) et traité par la vitamine C (VitC) (1g/l acide ascorbique dans l'eau). (Omonkhua and Obi , 2008).

Lot (7) : Contaminé par le nickel (Ni) (800mg/l $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau) et traité par le zinc (Zn) (227mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et la vitamine C (VitC) (1g/l acide ascorbique dans l'eau).

La pesée des rats se fait un jour sur trois pour évaluer le gain corporel. Le traitement va durer une période de six semaines en mesurant la consommation de nourriture et de l'eau.

3. Sacrifice et prélèvement des organes :

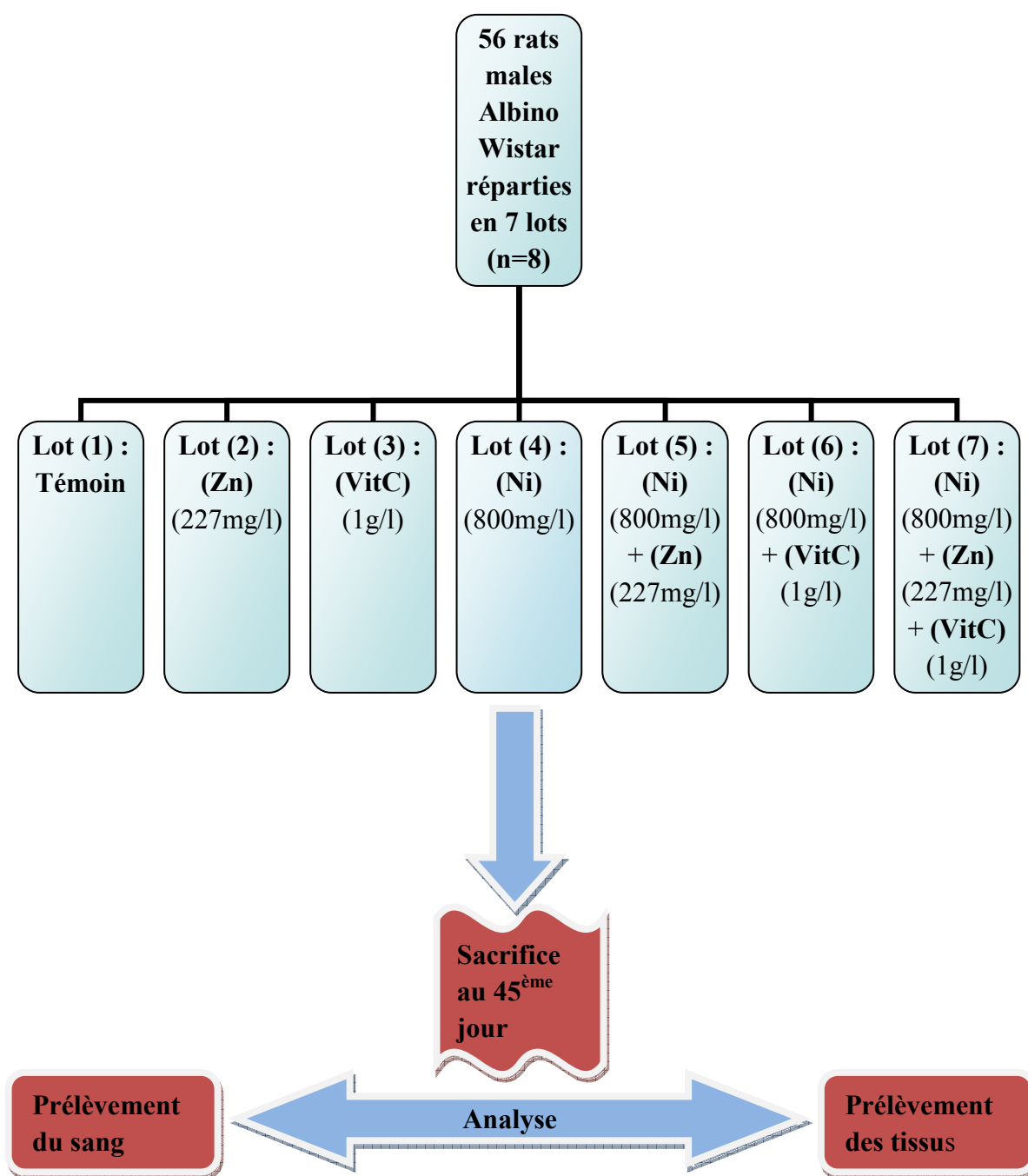
3.1. Prélèvement sanguin :

Après six semaines de traitement les groupes sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes polyéthylènes étiquetés. L'un contient l'anticoagulant EDTA et l'autre étant sec, ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes, les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse. Alors que les tubes à EDTA sont immédiatement transportés dans une glacière au laboratoire d'analyse pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS). On note que le poids corporel des rats a été pris juste avant la décapitation.

3.2. Prélèvement des organes :

Après la dissection, le foie, les reins et les testicules sont prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, puis pesés. Un fragment du foie et un rein sont conservés dans une solution de Bouin alcoolique (26ml formol, 7ml acide acétique, 45ml de solution d'acide picrique à 1% dans l'éthanol 95° et 22ml d'eau distillée) jusqu'au moment de faire les coupes histologiques. Le deuxième fragment du foie est maintenu à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (glutathion, les protéines hépatiques et l'activité enzymatiques de la catalase, GSH-Px et GST).

La figure 10 schématise les différentes étapes du protocole expérimental utilisé :



Biochimiques	Hématologiques	Activité enzymatiques	Microscopique
-Glucose	-Globules rouges	Antioxydant et Glutathion	-Histologie
-Urée	-Globules blancs...	-GSH-Px, CAT, GSH	du foie
-Créatinine...etc	-Hémoglobine....	-GST	
	-Hématocrite....		

Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

4. Dosages biochimiques :

4.1. Dosage du glucose : Selon la fiche technique *Spinreact*.

4.1.1. Principe :

Le glucose est transformé par la glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine), selon les réactions suivante (Kaplan, 1984).



4.1.2. Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	Tris pH 7.4	92mmol/l
	Phénol	0.3mmol/l
Réactif 2 : Enzymes	Glucose oxydase (GOD) Peroxydase (POD)	15000U/L 1000U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	2.6mmol/l
Etalon	Glucose aqueux (standard)	100mg/dl

4.1.3. Réactifs de travail :

Dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

4.1.4. Echantillon : Sérum

5. Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

Mélanger, incuber pendant 10min à 37°C, ou 15-20min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc à 505 nm. La coloration finale est stable au moins de 30 minutes.

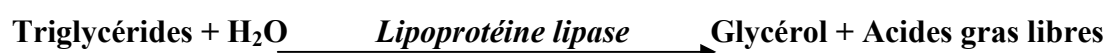
6. Calcul de la concentration :

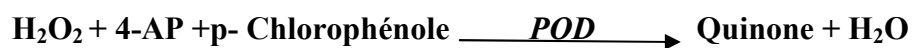
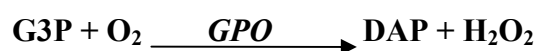
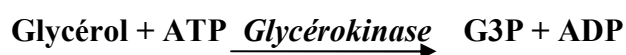
La concentration du glucose est calculée par la formule suivante :

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (100mg/dl)}$$

4.2. Dosage des triglycérides : Selon la fiche technique *Spinreact*.**4.2.1. Principe :**

Détermination enzymatique des triglycérides suivant les réactions suivantes (Kaplan et al., 1984).





4.2.2. Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	GOOD pH 7.5	50mmol/l
	P-chlorophenol	2mmol/l
Réactif 2 : Enzymes	Lipoprotein lipase (LPL)	150000U/L
	Glycerolkinase (GK)	500U/L
	Glycerol-3-oxidase(GPO)	2500U/L
	Peroxidase (POD)	440U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.1 mmol/l
	ATP	0.1mmol/l
Etalon	Triglycérides aqueux (standard)	200mg/dl

4.2.3. Réactif de travail : Dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

4.2.4. Echantillon : Sérum

4.2.5. Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins de 30minutes.

4.2.6. Calcul de la concentration :

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (200mg/dl)}$$

4.3. Dosage des protéines totales :

4.3.1. Principe :

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'iode est inclus comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (Burtis, 1999).

4.3.2. Réactifs :

Réactif 1 : Biuret	Sodium potassium tartrate	15mmol/l
	Sodium iodique	100mmol/l
	Potassium iodique	5mmol/l
	Sulfate de cuivre (II)	19mmol/l
Etalon	Sérum albumine bovin	7g/dl

4.3.3. Réactif de travail : Le réactif est prêt à l'emploi.

4.3.4. Echantillon : Sérum**4.3.5. Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	25	--
Echantillon (µl)	--	--	25

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm. La coloration finale est stable au moins de 30minutes.

4.3.6. Calcul de la concentration :

$$\text{Protéines totales (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (7g/l)}$$

4.4. Dosage de la créatinine : Selon la fiche technique *Spinreact*.**4.4.1. Principe :**

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon (Murry, 1984).

4.4.2. Réactifs :

Réactif 1 :	Acide picrique	17.5mmol/l
Réactif 2 :	Hydroxyde de sodium	0.29mol/l
Etalon	Créatinine aqueux (standard)	2mg/dl

4.4.3. Réactif de travail : Dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

4.4.4. Echantillon : Sérum.

4.4.5. Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	100	--
Echantillon (µl)	--	--	100

- Mélanger et insérer la cuvette dans le photomètre. Mettre le chronomètre en marche.
- Enregistrer l'absorbance à 492nm (A1) après 30 secondes et (A2) après 90 secondes.
- Calculer $\Delta A = A2 - A1$

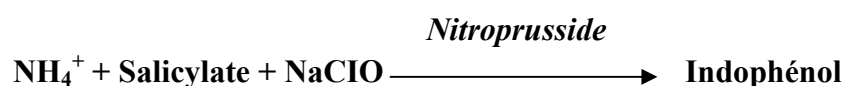
4.4.6. Calcul de la concentration :

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{(\Delta A) \text{ Echantillon}}{(\Delta A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (2mg/dl)}$$

4.5. Dosage de l'urée : Selon la fiche technique *Spinreact*.**4.5.1. Principe :**

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et le dioxyde de carbone (CO_2).

L'ion ammonium réagit avec le salicylate et hypochlorite dans une réaction catalysée par Nitroprusside pour donner indophénol (Kaplan, 1984).

**4.5.2. Réactifs :**

Réactif 1 : Tampon	Phosphate pH 6.7	50mmol/l
	EDTA	2mmol/l
	Salicylate de sodium	400mmol/l
	Nitroprusside de sodium	10mmol/l
Réactif 2 : NaClO	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140mmol/l
	Hydroxyde de sodium	150mmol/l
Réactif 3 : Enzymes	Uréase	3000U/L
Etalon	Urée aqueux (standard)	50mg/dl

4.5.3. Réactif de travail : Dissoudre le contenu de réactif 3 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.

4.5.4. Echantillon : Sérum.**4.5.5. Mode opératoire :**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante.

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif 2 (ml)	1.0	1.0	1.0

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 580 nm. La coloration finale est stable au moins de 30minutes.

4.5.6. Calcul de la concentration :

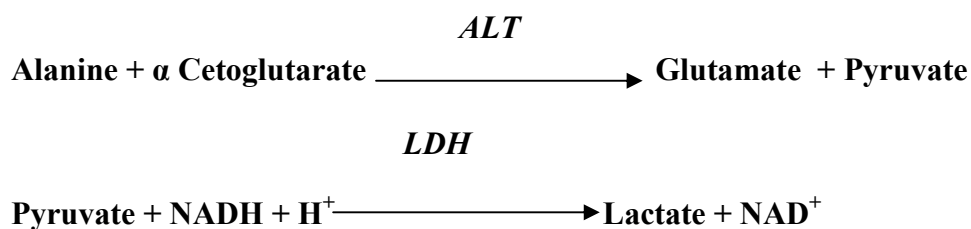
$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (50mg/dl)}$$

4.6. Dosage d'alanine aminotransférase (ALAT/TGP) : Selon la fiche technique

Spinreact.

4.6.1. 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 (Murry, 1984).

4.6.2. Réactifs :

Réactif 1 :	Tris pH 7.8	100mmol/l
Tampon	L- alanine	500mmol/l
Réactif 2 :	NADH	0.18mmol/l
Enzyme	Lactate déshydrogenase (LDH)	1200U/L
Substrat	α Cetoglutarate	15mmol/l

4.6.3. Réactif de travail : Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

4.6.4. Echantillon : Sérum.

4.6.5. Mode opératoire :

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

Mélanger, incuber 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 ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$) pour calculer l'activité.

4.6.6. Calcul de l'activité enzymatique :

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

4.7. Dosage d'Aspartate aminotransferase (ASAT/TGO) : Selon la fiche technique *Spinereact*.

4.7.1. Principe :

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétooglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par le malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H^+ (Murry, 1984).



4.7.2. Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	Tris pH 7.8	80mmol/l
	L-aspartate	200mmol/l
Réactif 2 :	NADH	0.18mmol/l
Enzyme	Lactate déshydrogenase (LDH)	800U/L
Enzyme	Malate déshydrogenase (MDH)	600U/L
Substrat	α Cetoglutarate	12mmol/l

4.7.3. Réactif de travail : Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

4.7.4. Echantillon : Sérum.

4.7.5. Mode opératoire :

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

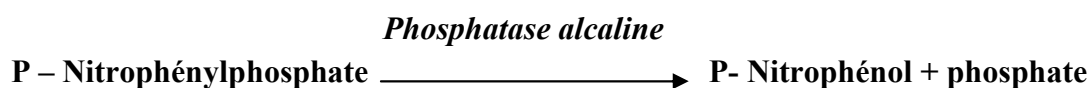
Mélanger, incuber pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1,2 et 3 minutes.

4.7.6. Calcul de l'activité enzymatique :

$$ASAT (U/L) = \Delta Abs/min \times 1750$$

4.8. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) : Selon la fiche technique *Spinreact*.**4.8.1. Principe :**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate a pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, ou elle est proportionnelle a l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon (Rosalki et *al.*, 1993).

4.8.2. Réactifs :

Réactif 1 : Tampon	Diethanlamine (DEA) pH 10.4	1mmol/l
	Chlorure de magnésium	0.5mmol/l
Réactif 2 : Substrat	Nitrophényl phosphate (PNPP)	10mmol/l

4.8.3. Réactif de travail : Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

4.8.4. Echantillon : Sérum.

4.8.5. Mode opératoire :

Réactif de travail (ml)	1.2
Echantillon (µl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1,2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes ($\Delta \text{Abs/min}$) pour calculer l'activité enzymatique.

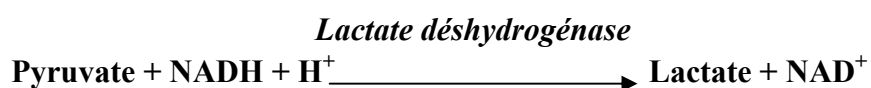
4.8.6. Calcul de l'activité enzymatique :

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

4.9. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH) : Selon la fiche technique *Spinreact*.

4.9.1. Principe :

L'activité enzymatique de LDH est présentée par la réaction suivante :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel

à l'activité de LDH présenté dans l'échantillon (Pesce, 1984).

4.9.2. Réactifs :

Réactif 1 :	Tampon Tris pH 7.5	80 mmol/l
Tampon	Pyruvate	1.6 mmol/l
Réactif 2 :	NADH	0.18 mmol/l
Substrat		

4.9.3. Réactif de travail : Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

4.9.4. Echantillon : Sérum.

4.9.5. Mode opératoire :

Réactif de travail (ml)	3.0
Echantillon (µl)	50

Mélanger bien et laisser pendant une minute à une température de 37°C. Puis lire l'absorbance à 340 nm avec trois répétitions chaque 1 minute d'incubation.

4.9.6. Calcul de l'activité enzymatique :

$$LDH (U/L) = \Delta A/min \times 9690$$

4.10. Dosage de la bilirubine totale et directe : Selon la fiche technique *Spinreact*.

4.10.1. Principe :

La bilirubine se couple avec l'acide sulfanique diazoté pour donner l'Azobilirubine coloré.

Le dosage de la bilirubine indirecte se fait en présence de Dimethylsulfoxyde (DMSO).

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle a la concentration de la bilirubine (Kaplan et *al.*, 1984).

4.10.2. Réactifs :

Réactif 1 : (D)	Acide sulfanque	30mmol/l
	Acide hydrochlorique (HCl)	150mmol/l
Réactif 2 : (T)	Acide sulfanque	30mmol/l
	Acide hydrochlorique (HCl)	50mmol/l
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7mmol/l
Réactif 3 :	Nitrate de sodium	29mg/dl

4.10.3. Réactif de travail : Les réactifs sont prêts à l'emploi.

4.10.4. Echantillon : Sérum.

4.10.5. Mode opératoire :

	Blanc	Bilirubine totale	Blanc	Bilirubine directe
Réactif 1(D) (ml)	--	--	1.5	1.5
Réactif 2(T) (ml)	1.5	1.5	--	--
Réactif 3 (µl)	--	50	--	50
Echantillon (µl)	100	100	100	100

Mélanger, incubé pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 555nm

4.10.6. Calcul de la concentration :

$$\text{Bilirubine totale (mg/dl)} = [(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc de l'échantillon}] \times 19.1$$

$$\text{Bilirubine directe (mg/dl)} = [(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc de l'échantillon}] \times 14$$

4.11. Dosage d'albumine : Selon la fiche technique *Spinreact*.**4.11.1. Principe :**

L'albumine forme un complexe coloré en bleu vert intensif avec le vert de bromocrésol dans un milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration d'albumine dans l'échantillon. (Burtis et *al.*, 1999).

4.11.2. Réactifs :

Réactif	vert de bromocrésol pH 4.2	0.12mmol/l
Etalon	sérum albumine aqueux (standard)	5g/dl

4.11.3. Réactif de travail : Réactif et étalon sont prêts à l'emploi.

4.11.4. Echantillon : Sérum.

4.11.5. Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	5	--
Echantillon (µl)	--	--	5

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 630nm. La coloration finale est stable au moins 1 heure.

4.11.6. Calcul de la concentration :

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (5g/dl)}$$

4.12. Préparation de l'homogénat :

Un gramme de foie de rats de chaque groupe étudié, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4), on a procédé a une centrifugation de la suspension cellulaire (10000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés a -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

4.13. Dosage du glutathion (GSH) :

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de (Elman, 1959). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bi-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- Prélever 0.8ml de l'homogénat.
- 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%).
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger a 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0.5ml du surnageant.
- Ajouter 1ml de tampon Tris, pH 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) a 0.01M.

Laisser pendant 5 min a une température ambiante et lire les densités optiques a 412 nm contre le blanc.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$GSH \text{ (nmol GSH/mg protéine)} = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

Do : Densité optique

1 : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique.

1.525 : volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).

13100 : coefficient d'absorbance du groupement –SH a 412 nm.

0.8 : volume de l'homogénat.

0.5 : volume du surnageant.

4.14. Dosage des protéines hépatiques :

La concentration de protéines hépatiques est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe bleu. L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines.

Pour cela nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par la comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions (Figure 11).

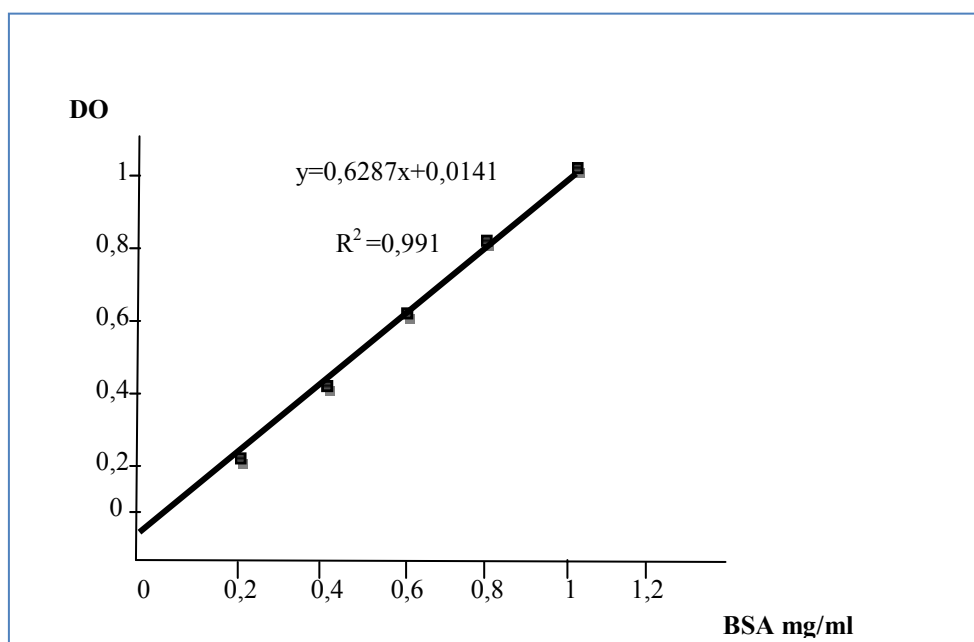
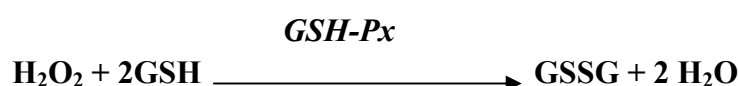


Figure 11 : La gamme d'étalonnage utilisée (BSA mg/ml) pour le dosage des protéines.

4.14. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de (Flohe and Gunzler ,1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), cette dernière est transformée en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :



Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1Mm).
- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 Mm pH 7.4).
- Incuber au bain marie a 25 °C, pendant 5min.
- Ajouter 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes a 3000 tours/minutes.
- Prélever 0.48 ml du surnageant.
- Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$GSH-Px (\mu mol \text{ GSH/mg protéine}) = \frac{(DO \text{ Echantillon} \times DO \text{ Etalon}) \times 0.04}{DO \text{ Etalon/mg protéine}}$$

DO échantillon : densité optique de l'échantillon.

DO étalon : densité optique de l'étalon.

0.04 : concentration de substrat (GSH).

4.15. Dosage du glutathion S-Transférase (GST) :

4.15.1. Principe :

L'activité du GST est estimée par son action sur le composé 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (1CDNB) en présence de glutathion comme un co-substrat (Habig et *al.*, 1974).

4.15.2. Méthode de dosage :

Cette méthode consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37° C et a pH de 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340nm.

Réactifs	Blanc (µl)	Essai (µl)
Tampon phosphate (0.1M) pH6.5	850	830
CDNB (0.02M)	50	50
GSH (0.1M)	100	100
Homogénat	--	20

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

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

$$\text{GST } (\mu\text{mol GST/min/mg/protéine}) = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9.6 \times \text{mg de protéine}}$$

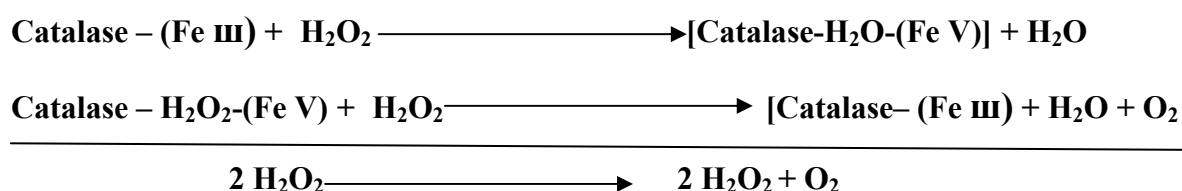
Do : Densité optique de l'échantillon/min.

Do/min blanc : Densité optique du blanc/min.

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM.Cm.

4.16. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) :

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissu. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Aebi, 1974). La réaction se fait en deux étapes :



L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde (H_2O_2).

($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en faisant réagir dans 100 Mm de tampon phosphate pendant 1 min a pH 7.4, 200 μl de H_2O_2 (500mM) sur 20 μl du S9, aune température d'incubation de 25°C. Les résultats on été exprimés en μmol d' H_2O_2 par mg de protéines.

Le tableau ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.

Les réactifs	Essai (μl)	Blanc (μl)
Tampon phosphate (100mM ; pH 7.4)	780	800
H_2O_2	200	200
S9 (1a 1.5 mg protéine/ml)	20	/

S9 : la quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 a 20 μl de S9.

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité catalase } (\mu\text{mol } \text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéine}) = \frac{\Delta DO}{E \times L \times X \times Fd}$$

ϵ : coefficient d'extinction (= $0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) .

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

X : la quantité des protéines mg/ml.

Fd : 0.02 (facteur de dilution pour le H_2O_2 dans le tampon).

λ : 240 nm.

5. Evaluation de la toxicité hématologique :

La toxicité hématologique a été mise en évidence à travers la détermination de la formule numérique sanguine (FNS) à l'aide d'un Coulter automatique (Figure 12). Les paramètres mesurés sont les globules rouges et blanc, l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), le volume globulaire moyenne (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH).



Figure 12 : Coulter hématologique (Coulter Conter Lympho Série « T » 540)

6. Technique histologique :

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de Dr. Niha, service d'anatomie pathologique d'Annaba suivant la technique classique de (Houlot, 1984). Le foie de chaque rat est retiré de Bouin alcoolique (26 ml Formol, 7 ml Acide acétique, 45 ml Acide

picrique de 95 %) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant afin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5mm. les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

❖ **Déshydratation :**

Les échantillons sont ensuite déshydratés pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90%, 100%). la déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux.

❖ **Inclusion :**

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils (dits à inclusion) refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

❖ **Coupes et coloration :**

Les blocs d'inclusion sont collés sur un porte-échantillon, la surface à coller est ramollie au moyen d'une lame métallique chauffée modérément à la flamme, puis posée sur le porte-objet sur lequel le bloc adhère très bien après une légère pression. Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

Pour la coloration, on utilise la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématéine-Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine (100 ml Eosine solution aqueuse à 3% , 125 ml d'alcool éthylique à 95 % 375 ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique) selon les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles.
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées), déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).
- Déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

❖ **Observation au microscope :**

Les coupes sont observées au microscope optique (Leitzdialux 22) et photographiées à l'aide d'un appareil photo (Leicawild MP 48).

7. Exploitation statistique des résultats :

Les résultats sont représentés sous forme de Moyenne $\pm$ SEM. Une analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) et une comparaison des moyennes par le test Fisher (PLSD Fisher) ont été effectuées. $P \leq 0.05$ est considéré comme significatif. L'analyse statistique des données a été effectuée grâce au logiciel MINITAB (Min, Ver 14.0).

Chapitre IV : Résultats

I. Effets sur les paramètres pondéraux :

D'après nos résultats, le poids corporel des rats a été affecté par le nickel. En effet, nous remarquons une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du poids corporel des rats contaminés au nickel comparativement aux témoins. Alors que chez les rats contaminés au nickel et traités par le zinc et la vitamine C nous remarquons une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du poids corporel comparé au groupe du nickel. Mais cette augmentation a restée comme inférieure à celle des témoins ($p < 0,001$).

Concernant le poids corporel des rats traités uniquement par le zinc ou la vitamine C n'aboutit aucun changement significatif par rapport au témoin (Tableau 06, Figure 13).

Les résultats du tableau 07 révèlent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du poids absolu et relatif du foie chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin (Tableau 07, Figures : 14, 15). Chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou la vitamine C on a enregistré une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Vit C), (Ni + Zn) et (Ni + Zn + Vit C) du poids absolu et relatif du foie par rapport au groupe du nickel. Chez les lots traités uniquement par le zinc ou / et la vitamine C le poids absolu et relatif du foie n'aboutit aucun changement significatif par rapport au témoin.

Les résultats obtenus dans notre travail (Tableau 07, Figures : 16, 17) ont montré une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) des taux de consommation journalière de nourriture et d'eau chez le lot contaminé au nickel par rapport au groupe témoin (10.40 ± 1.16 contre 18.80 ± 1.07 et 21.84 ± 1.16 contre 38.2 ± 1.42). Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C le traitement

provoque une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Zn), (Ni + Zn + Vit C) et hautement significative ($p < 0,01$) (Ni + Vit C) du taux de consommation journalière de nourriture et une augmentation significative ($p < 0,05$) (Ni + Zn) et hautement significative ($p < 0,01$) (Ni + Zn + Vit C) et non significative (Ni + Vit C) du taux de consommation journalière d'eau par rapport au lot contaminé au nickel .

En effet, ce taux reste comme même inférieur a celui du lot témoin, ($p < 0,01$) (Ni + Zn), (Ni + Zn + Vit C) et ($p < 0,001$) (Ni + Vit C) du taux de consommation journalière de nourriture et ($p < 0,001$) (Ni + Zn), (Ni + Vit C) et (Ni + Zn + Vit C) du taux de consommation journalière d'eau. Chez les lots traités uniquement par le zinc ou/et la vitamine C aucun changement significatif par rapport au témoin.

Tableau 06 : Variation du poids corporel en gramme chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés pendant un traitement de six semaines.

Poids	Témoin (n=8)		Zn (n=8)		VitC (n=8)		Ni (n= 8)		Ni+Zn (n=8)		Ni+VitC (n=8)		Ni+Zn +Vit C (n=8)	
	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM
Poids initial (g)	158.2±9.8		158.3±9.7		158.1±9.6		133.5±5.5		147.1±13.5		147.2±10.1		163,4±7,3	
Poids final (g)	202.2 ±2.5		200.1 ±2.1		200.2 ±2.4		109.2 ^{***} ±4.8		162.8 ^{***cβ} ±6.6		165.6 ^{***cμ} ±5.2		182.3 ^{***c} ±3.9	

^{***} p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin.

^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni).

^μ p < 0.05, ^β p < 0.01 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

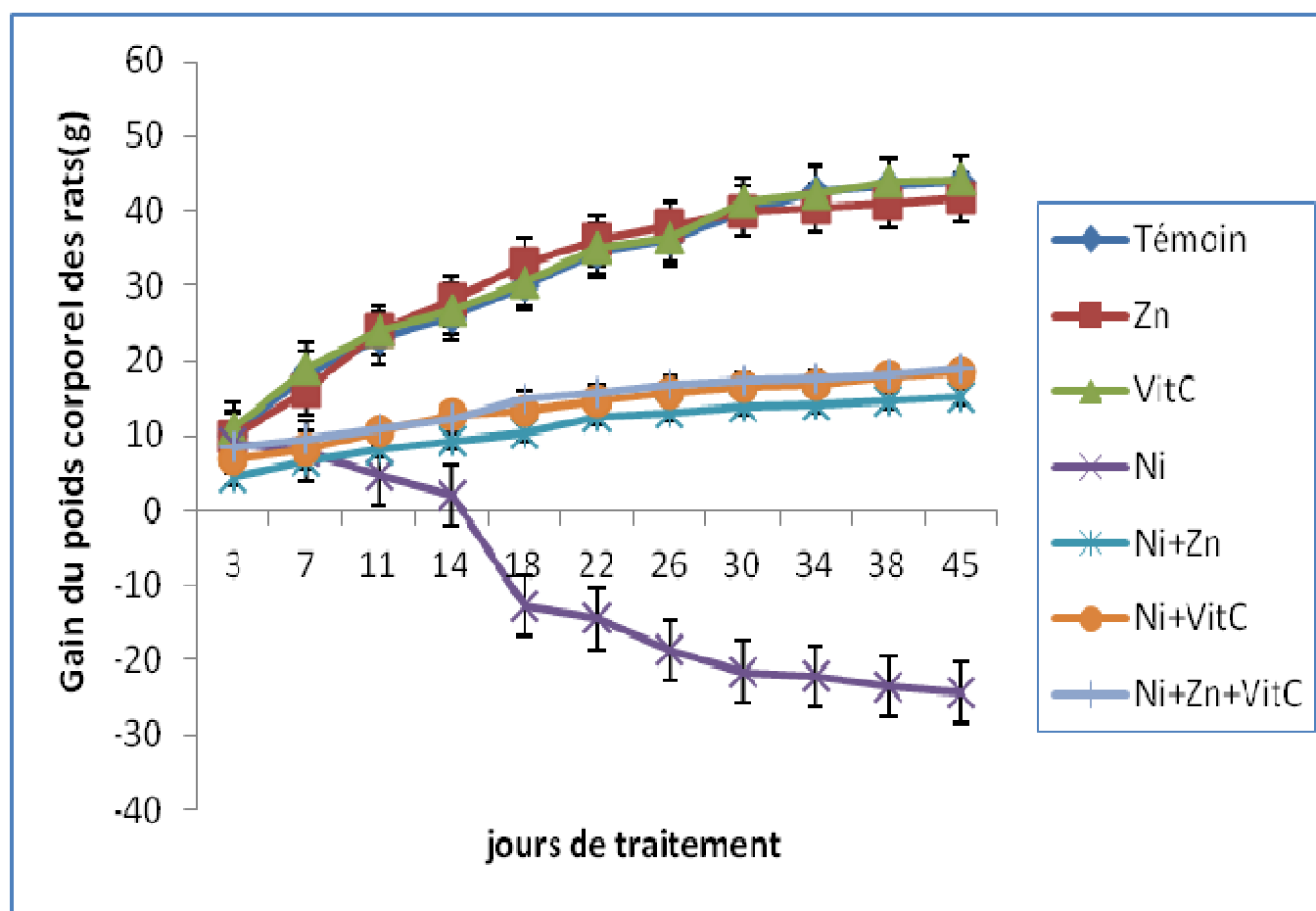


Figure 13 : Evaluation en fonction du temps (jours) du poids corporel chez les rats témoins, les traités par le zinc et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.

Tableau 07 : Variations des poids absolus et relatif du foie et la consommation journalière de nourriture et d'eau chez les rats témoins, les traités par le zinc et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après six semaines de traitement.

Paramètres	Témoin (n=8)		Zn (n=8)		Vit C (n=8)		Ni (n=8)		Ni+Zn (n=8)		Ni+Vit C (n=8)		Ni+Zn+Vit C (n=8)	
	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM	Moy	SEM
Poids absolu du foie (g)	9.1 ±0.36		9.22 ±0.43		9.11 ±0.3		12.1 ^{***} ±0.25		9.2 ^c ±0.43		8.9 ^c ±0.24		8.6 ^c ±0.29	
Poids relatif du foie (g)	2.66 ±0.06		2.64 ±0.06		2.65 ±0.06		3.61 ^{***} ±0.08		2.72 ^{cμ} ±0.03		2.74 ^c ±0.03		2.60 ^c ±0.06	
Taux de consommation journalière de nourriture (g/j/rat)	18.80 ±1.07		18.54 ±1.03		18.76 ±1.02		10.40 ^{***} ±1.16		15.98 ^{**c} ±0.75		14.07 ^{***b} ±0.74		16.02 ^{**c} ±0.80	
Taux de consommation journalière d'eau (ml/j/rat)	38.2 ±1.42		37.24 ±0.85		37.95 ±1.38		21.84 ^{***} ±1.16		24.88 ^{***a} ±1.49		22.09 ^{***} ±1.20		25.44 ^{***b} ±0.59	

^{**} p < 0, 01 ; ^{***} p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin.

^a p < 0,05 ; ^b p < 0,01 ; ^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni).

^μ p < 0.05 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

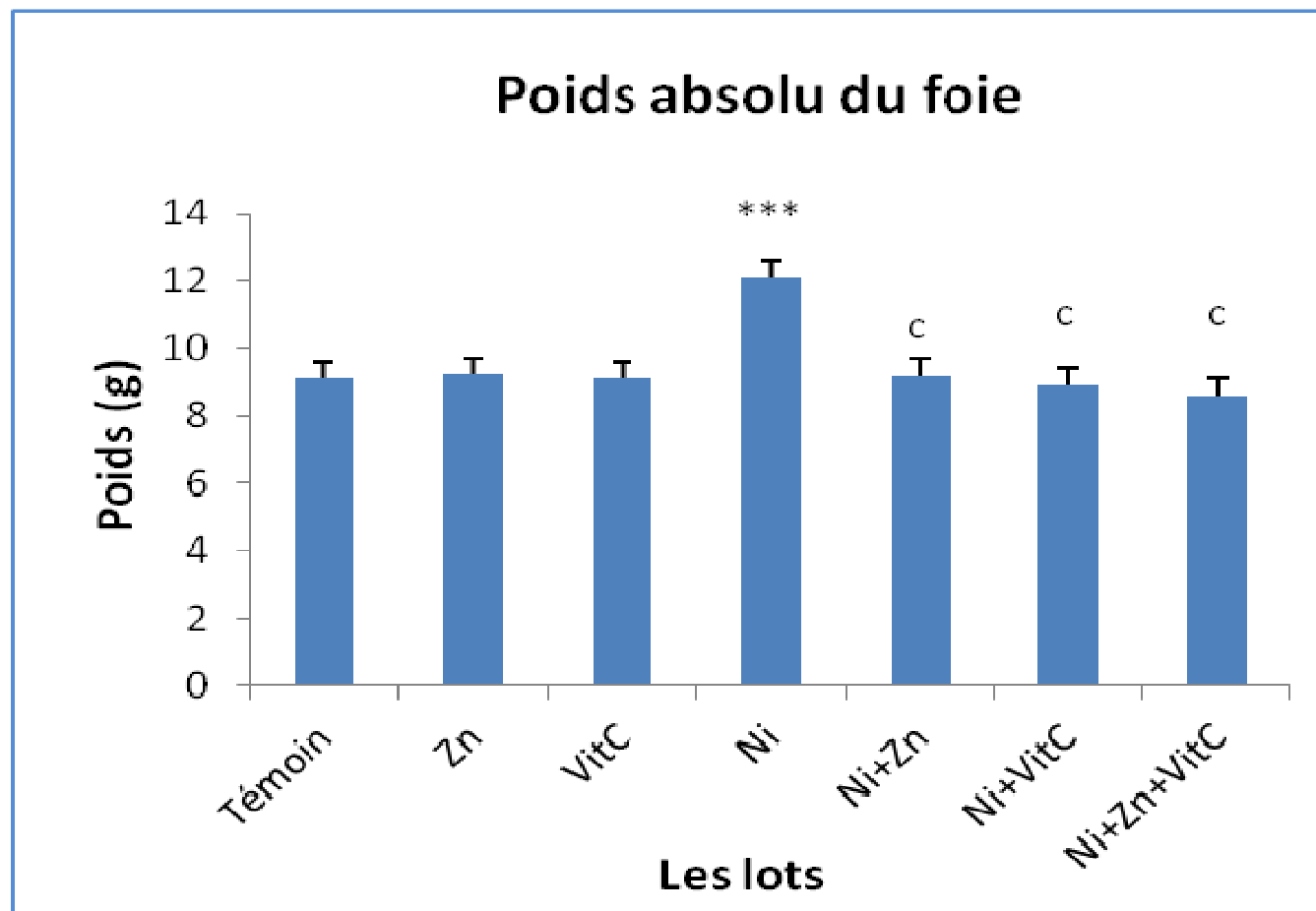


Figure 14 : Evaluation du poids absolu du foie chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés

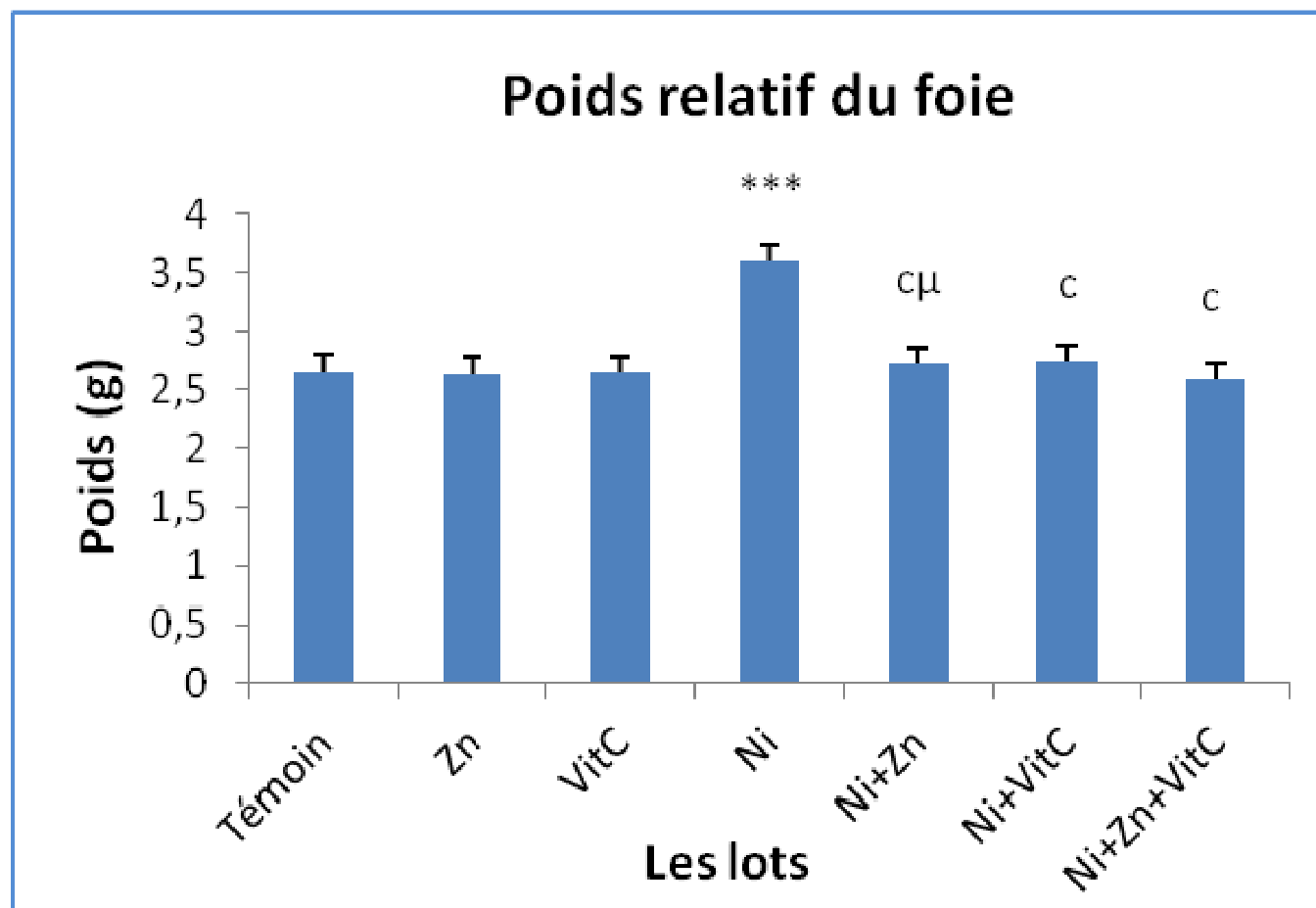


Figure 15 : Evaluation du poids relatif du foie chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

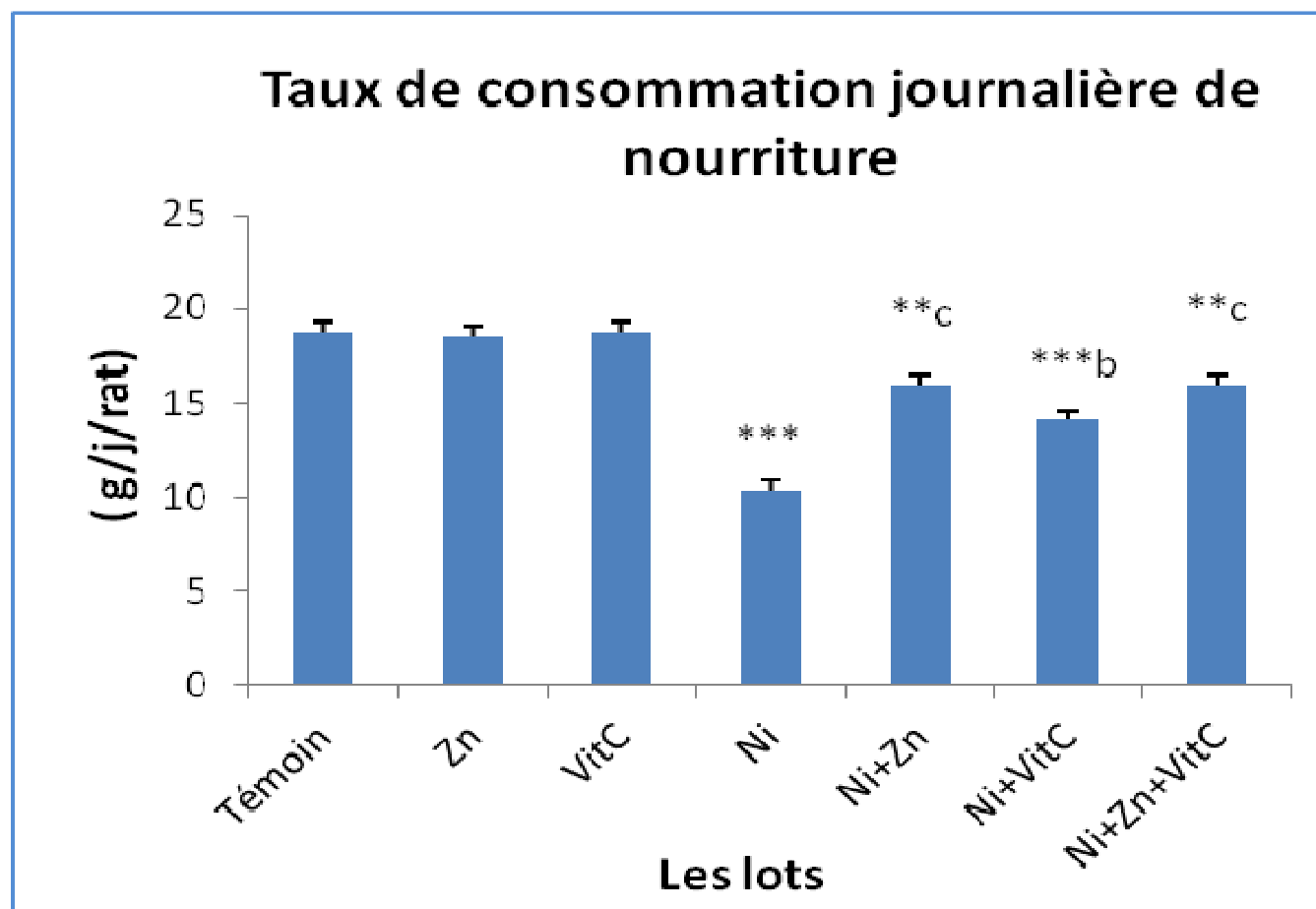


Figure 16 : Le taux de consommation journalière de nourriture chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

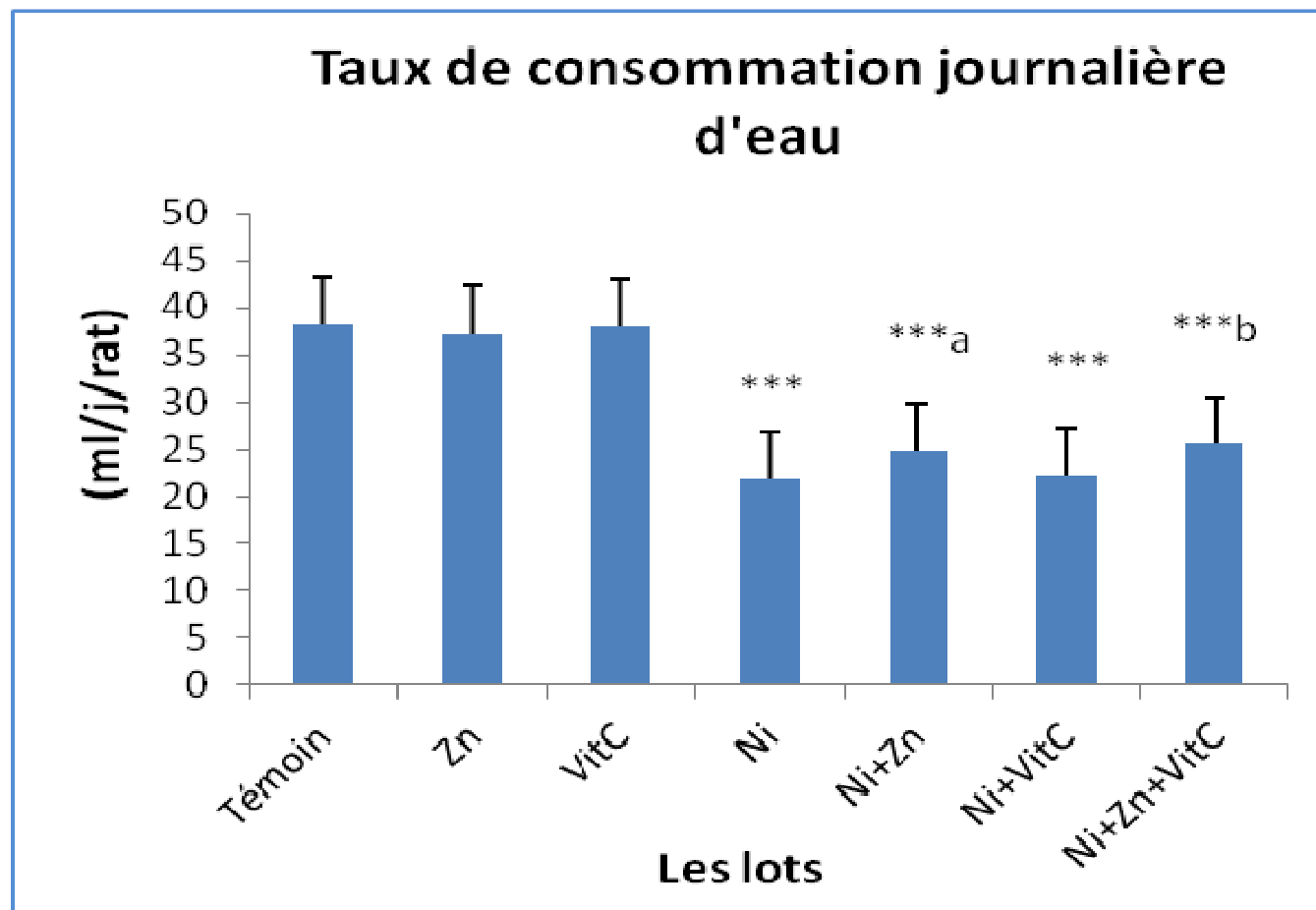


Figure 17 : Le taux de consommation journalière d'eau chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

II. Effets sur les paramètres biochimiques :

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative de la concentration sérique du glucose ($p < 0,001$) chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin. Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C on a enregistré une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) et (Ni + Zn + VitC) de la concentration sérique du glucose par rapport au groupe du nickel (Tableau 08, Figure 18) mais cette diminution a restée comme même supérieure ($p < 0,05$) chez le lot (Ni + Zn + VitC) a celle des témoins.

Le tableau 08 et la figure 19 mettent en évidence une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) de la concentration sérique de l'urée chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin. Chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc et la vitamine C, le traitement de six semaines a provoqué une réduction hautement significative ($P < 0,01$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) et (Ni + Zn + Vit C) par rapport au groupe du nickel. D'après le tableau 08 et la figure 20 on constate une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration de la créatinine chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin. Par contre chez les lots contaminés au nickel et traités au zinc ou / et la vitamine C on note une réduction significative ($P < 0,05$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) et très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Zn + VitC) par rapport au groupe du nickel.

Nos résultats montrent aussi une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) de la bilirubine totale et hautement significative de la biturbine directe ($P < 0,01$) (Tableau 08, Figures : 21, 22) chez le lot traité au nickel par rapport au témoin. Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C

on a enregistré une diminution hautement significative de la bilirubine totale ($p < 0,01$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) et très hautement significative ($P < 0,001$) (Ni + Zn + VitC) et aussi une diminution hautement significative ($P < 0,01$) de la bilirubine directe (Ni + Zn), non significative (Ni + VitC) et significative ($P < 0,05$) (Ni + Zn + VitC) par rapport au groupe du nickel.

D'après le tableau 08 et la figure 23 nous remarquons une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) de la concentration sérique des triglycérides chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin. Par contre chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc et la vitamine C nous enregistrons une diminution hautement significative ($p < 0,01$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) et très hautement significative ($P < 0,001$) (Ni + Zn + VitC) par rapport au groupe du nickel.

En revanche, on a remarqué une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration sérique des protéines totales (Tableau 08, Figure 24) chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin.

Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc et la vitamine C on note une augmentation significative ($p < 0,05$) chez les lots (Ni + Zn), (Ni + VitC) et une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) chez le lot (Ni + Zn + VitC) par rapport au lot nickel et une différence significative ($p < 0,05$) (Ni + Zn), (Ni + VitC) par rapport au lot (Ni + Zn + VitC).

On a remarqué aussi une diminution très hautement significative du taux d'albumine ($p < 0,001$) chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin (Tableau 08, Figure 25). Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc et la vitamine C on note une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) chez le lot

(Ni + Zn) et très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + VitC), (Ni + Zn + VitC) par rapport au groupe du nickel et une différence significative ($P < 0,05$) des lots (Ni + Zn) , (Ni + Vit C) par rapport au groupe (Ni + Zn + Vit C) pour la concentration sérique des protéines totales et aussi une différence hautement significative ($P < 0,01$) des lots (Ni + Zn) , (Ni + Vit C) par rapport au groupe (Ni + Zn + Vit C) pour le taux d'albumine.

Concernant, les lots traités uniquement par le zinc ou / et la vitamine tous ces paramètres biochimiques n'auront aucun changement significatif par rapport au témoin.

Tableau 08 : Variations de la concentration sérique du glucose, de la concentration sérique de l'urée, sérique de la créatinine, sérique de la bilirubine totale, sérique de la bilirubine directe, sérique des triglycérides, sérique des protéines totales et sérique d'albumine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines.

Paramètres	Témoin (n=8) Moy SEM	Zn (n=8) Moy SEM	VitC (n=8) Moy SEM	Ni (n=8) Moy SEM	Ni+Zn (n=8) Moy SEM	Ni+VitC (n=8) Moy SEM	Ni+Zn+VitC (n=8) Moy SEM
Glucose mg/100ml	107.5±2.43	106.12±2.35	107.4 ±2.44	192.8 ^{***} ±2.51	159.9 ^{***cμ} ±2.59	146.6 ^{***cβ} ±5.6	138.8 ^{*c} ±5.25
Urée mg/100ml	6.788±0.20	6.779 ±0.33	6.787 ±0.31	8.789 ^{**} ±0.16	8.35 ^{*bμ} ±0.29	8.40 ^{**bμ} ±0.21	7.789 ^{*b} ±0.32
Créatinine mg/100ml	0.486±0.05	0.483 ±0.05	0.484±0.04	2.641 ^{***} ±0.19	1.656 ^{***aμ} ±0.22	1.698 ^{***aβ} ±0.24	0.568 ^{*c} ±0.03
Bilirubine totale mg/100ml	0.425±0.06	0.420 ±0.04	0.424 ±0.06	2.116 ^{***} ±0.20	1.031 ^{***bβ} ±0.11	1.231 ^{***bk} ±0.16	0.432 ^c ±0.04
Bilirubine directe mg /100ml	0.125±0.02	0.121±0.03	0.123±0.01	0.28 ^{**} ±0.01	0.19 ^{*bμ} ±0.06	0.24 ^{**μ} ±0.04	0.130 ^a ±0.08
Triglycérides mg/100ml	7.853±0.31	7.850±0.30	7.852 ±0.31	10.288 ^{***} ±0.80	8.510 ^{*bμ} ±0.15	8.782 ^{*bβ} ±0.05	7.945 ^c ±0.32
Protéines totales g /100ml	8.56±0.21	8.53±0.30	8.552 ±0.21	6.01 ^{***} ±0.18	7.32 ^{***aμ} ±0.35	7.16 ^{***aμ} ±0.34	8.51 ^c ±0.13
Albumine g/100ml	4.75±0.04	4.70±0.09	4.73±0.03	3.08 ^{***} ±0.20	4.08 ^{***bβ} ±0.08	4.4 ^{**cβ} ±0.09	4.72 ^c ±0.09

* p < 0, 05 ; ** p < 0, 01 ; *** p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin. ^a p < 0,05 ; ^b p < 0,01 ; ^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni).

^μ p < 0.05 ; ^β p < 0.01 ; ^k p < 0.001 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

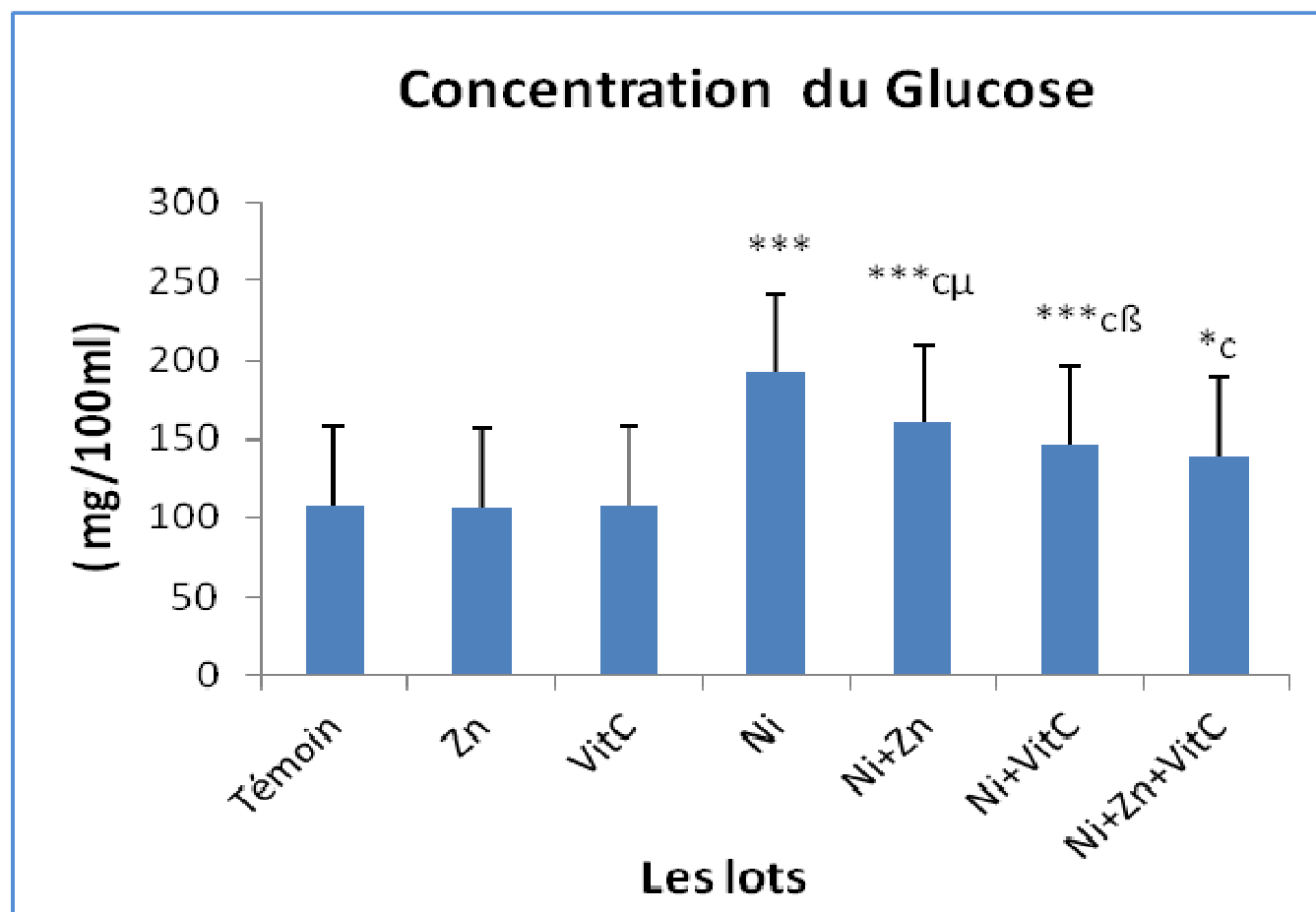


Figure 18 : La concentration sérique du glucose chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

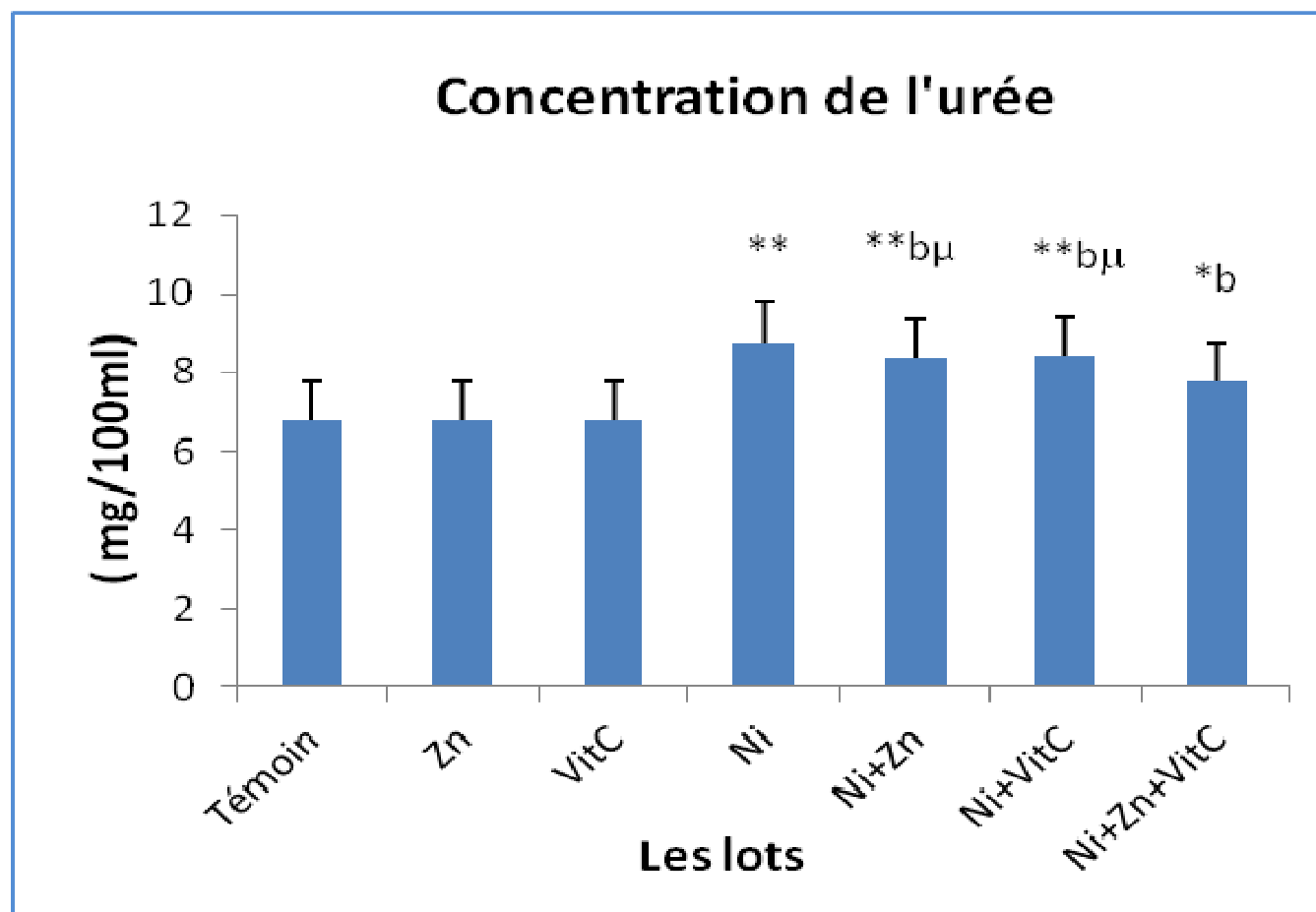


Figure 19 : La concentration sérique de l'urée chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

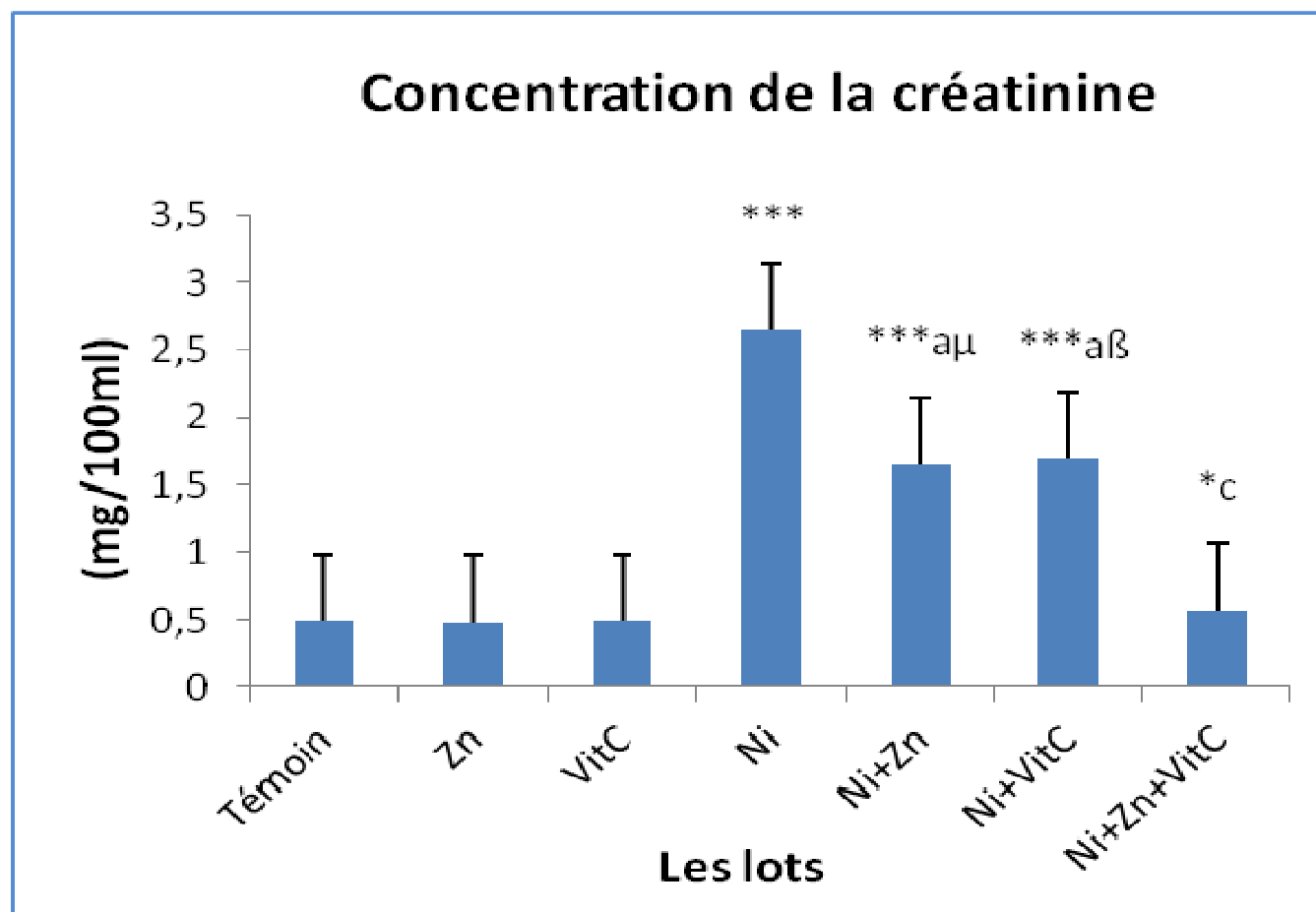


Figure 20 : La concentration sérique de la créatinine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

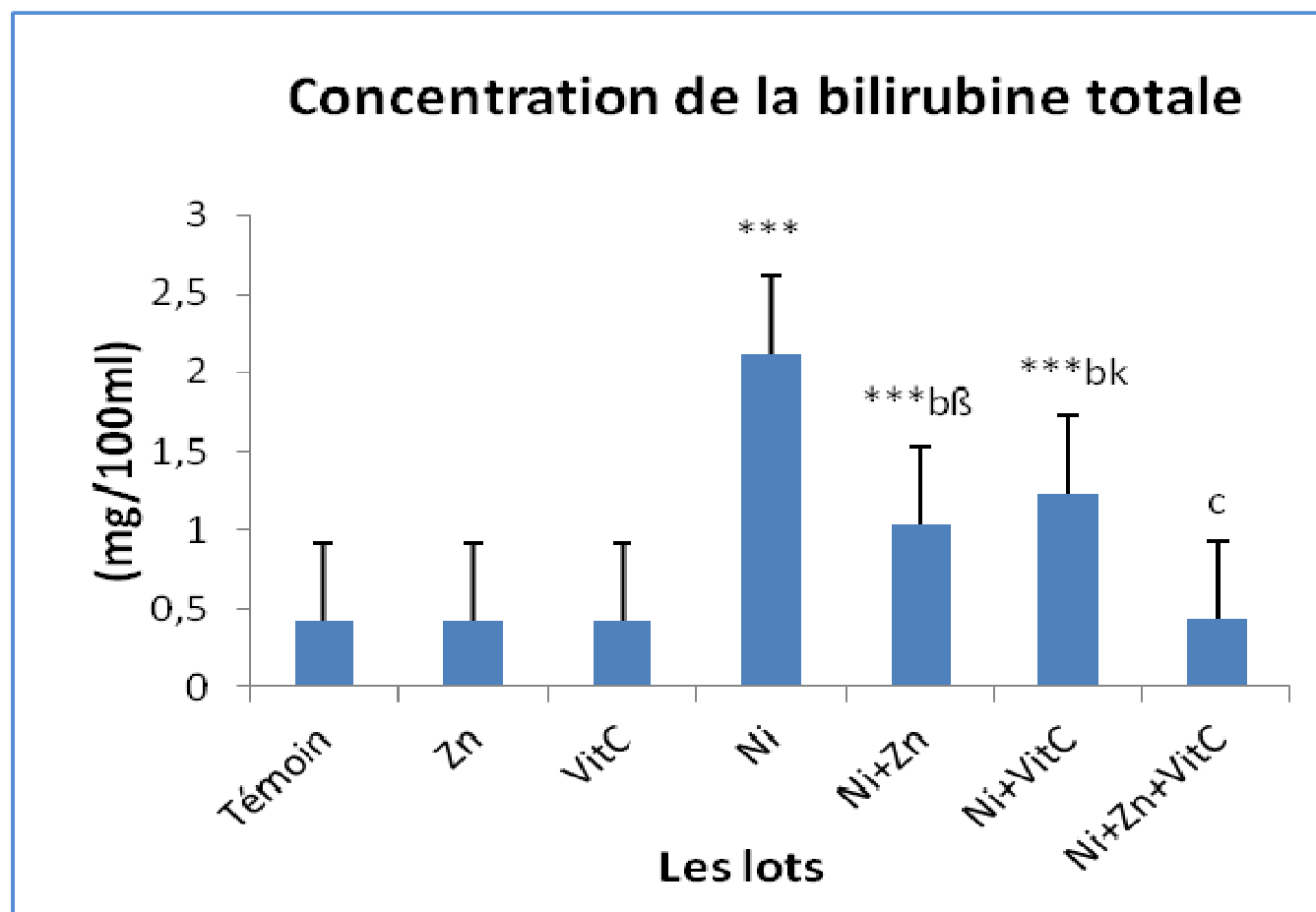


Figure 21 : La concentration sérique de la bilirubine totale chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

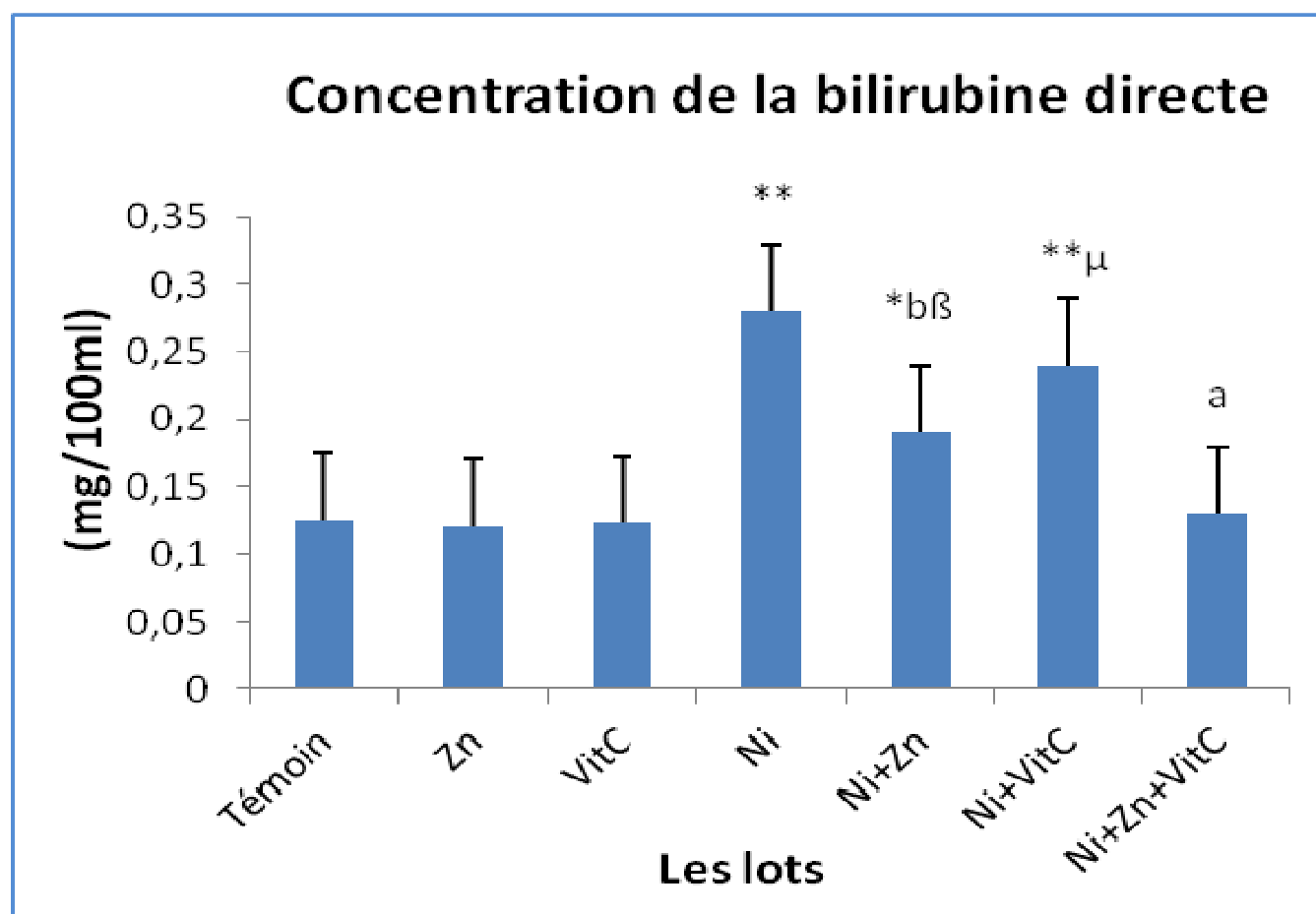


Figure 22 : La concentration sérique de la bilirubine directe chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

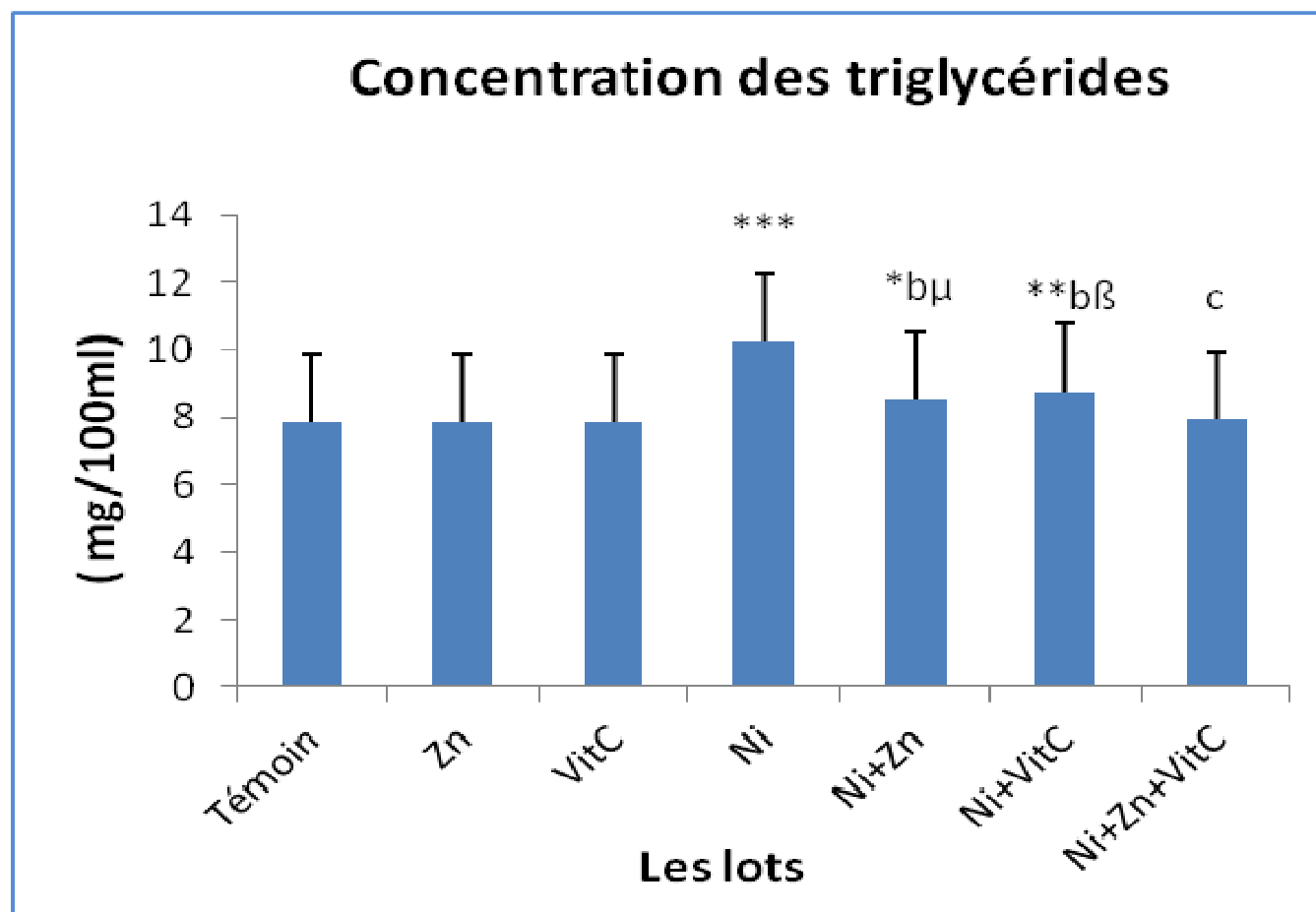


Figure 23 : La concentration sérique des triglycérides chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

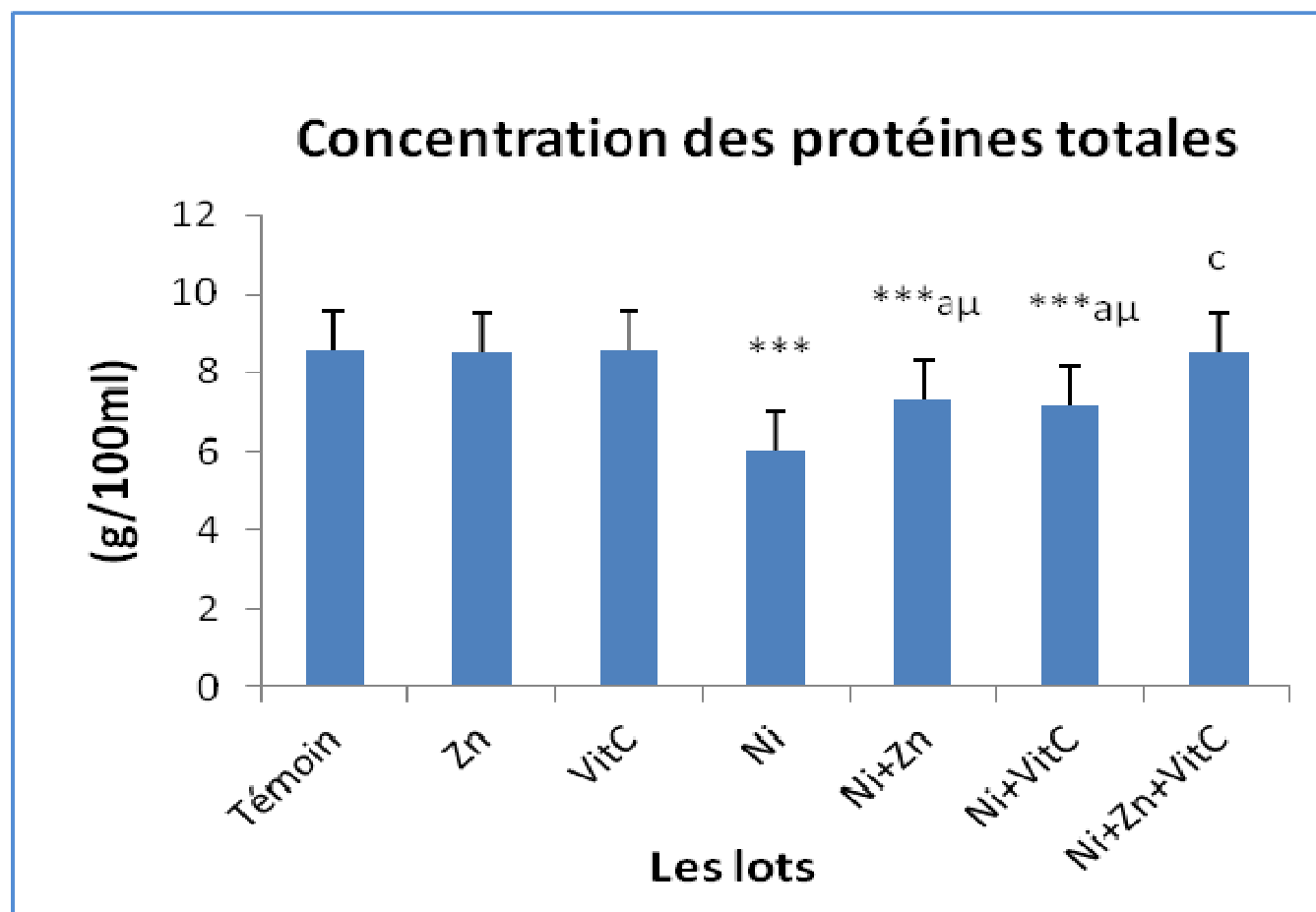


Figure 24 : La concentration sérique des protéines totales chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

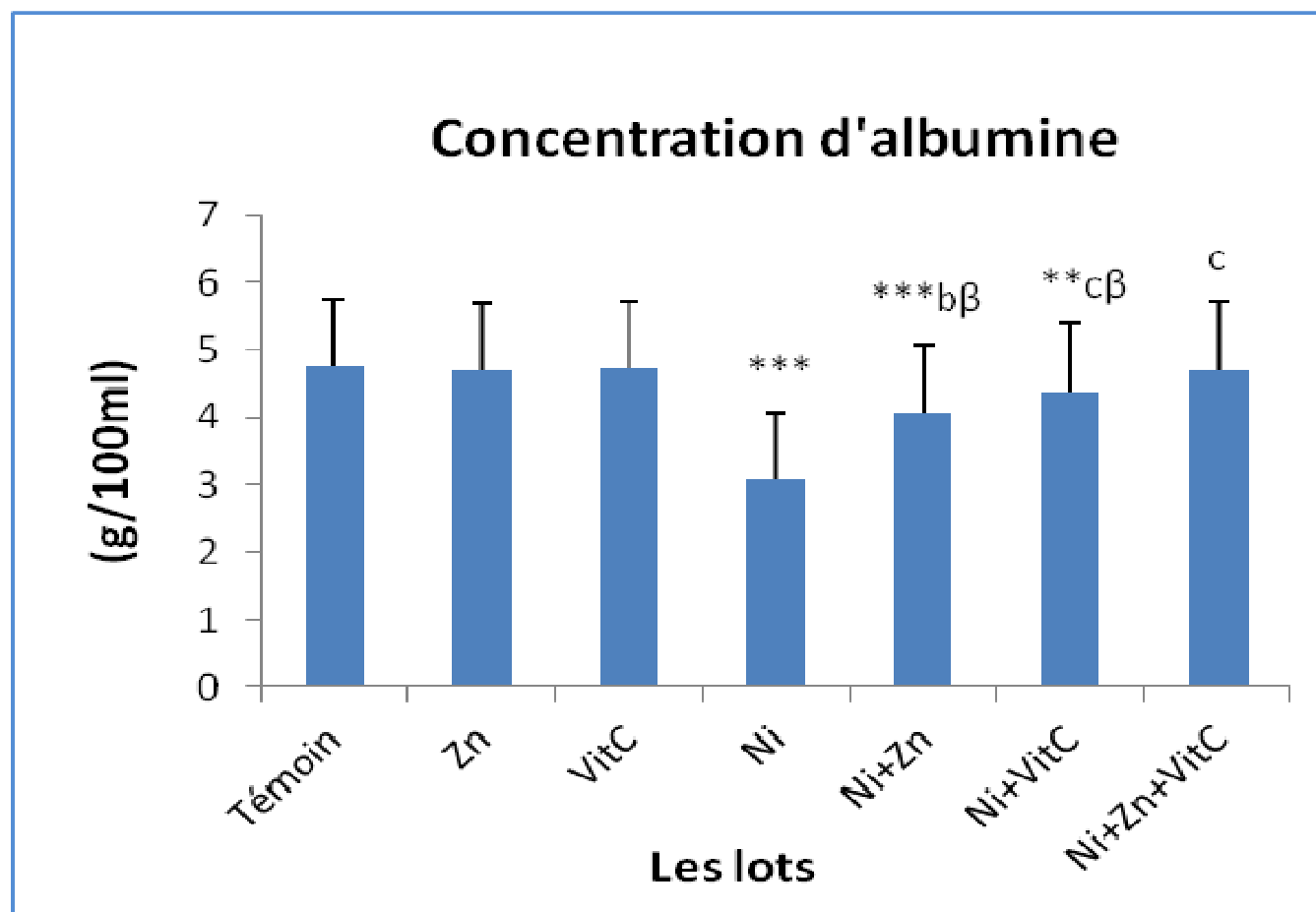


Figure 25 : La concentration sérique d'albumine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

Concernant l'activité enzymatique, les résultats obtenus révèlent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de l'alanine amino transférase (TGO), de l'aspartate amino transférase (TGP), du lactate déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline (PAL) chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin (Tableau 09, Figures : 26, 27, 28, 29).

Chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C on note une diminution des activités enzymatiques TGO, TGP, LDH et PAL très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Zn), (Ni + Vit C) et (Ni + Zn + VitC) par rapport au lot nickel.

Alors que l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats contaminés au nickel et traités au zinc et la vitamine C a restée supérieure très hautement significative ($p < 0,001$) a celle des rats témoins (109.7 ± 2.5) contre (213.6 ± 10.2) (Tableau 09, Figure 29).

Les lots traités par le zinc ou / et la vitamine C uniquement leurs paramètres enzymatiques de l'alanine amino transférase (TGO), de l'aspartate amino transférase (TGP), du lactate déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline (PAL) n'auront aucun changement significatif par rapport au témoin.

Tableau 09 : Variations de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (TGO), de l'alanine aminotransférase (TGP), du lactate déshydrogénase (LDH) et de l'alcaline phosphatase (PAL) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines

	Témoin	Zn	VitC	Ni	Ni+Zn	Ni+VitC	Ni+Zn+VitC
Paramètres	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM
TGO (U/L)	74.1±2.82	72 ±2.79	73.97 ±2.81	135.1 ^{***} ±2.21	102.6 ^{***cβ} ±2.85	95.6 ^{***cβ} ±2.19	76.6 ^c ±2.25
TGP (U/L)	37.3±2.27	37.15±2.7	37.2±2.24	72.25 ^{***} ±2.23	53.62 ^{***cμ} ±2.11	55.5 ^{***cβ} ±2.44	46.4 ^{*c} ±1.63
LDH (U/L)	368.06±2.5	360.24 ±1.89	367.98 ±2.33	465.43 ^{***} ±1.86	292.04 ^{***cμ} ±2.25	288.04 ^{***c} ±2.1	285.42 ^{*c} ±3.2
PAL (U/L)	109.7±2.5	107 ±1.9	109.4 ±2.3	292.2 ^{***} ±2.1	245.1 ^{***c} ±9.5	218.4 ^{***c} ±11.3	213.6 ^{***c} ±10.2

* p < 0, 05 ; *** p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin.

^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni).

^μ p < 0,05 ; ^β p < 0,01 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

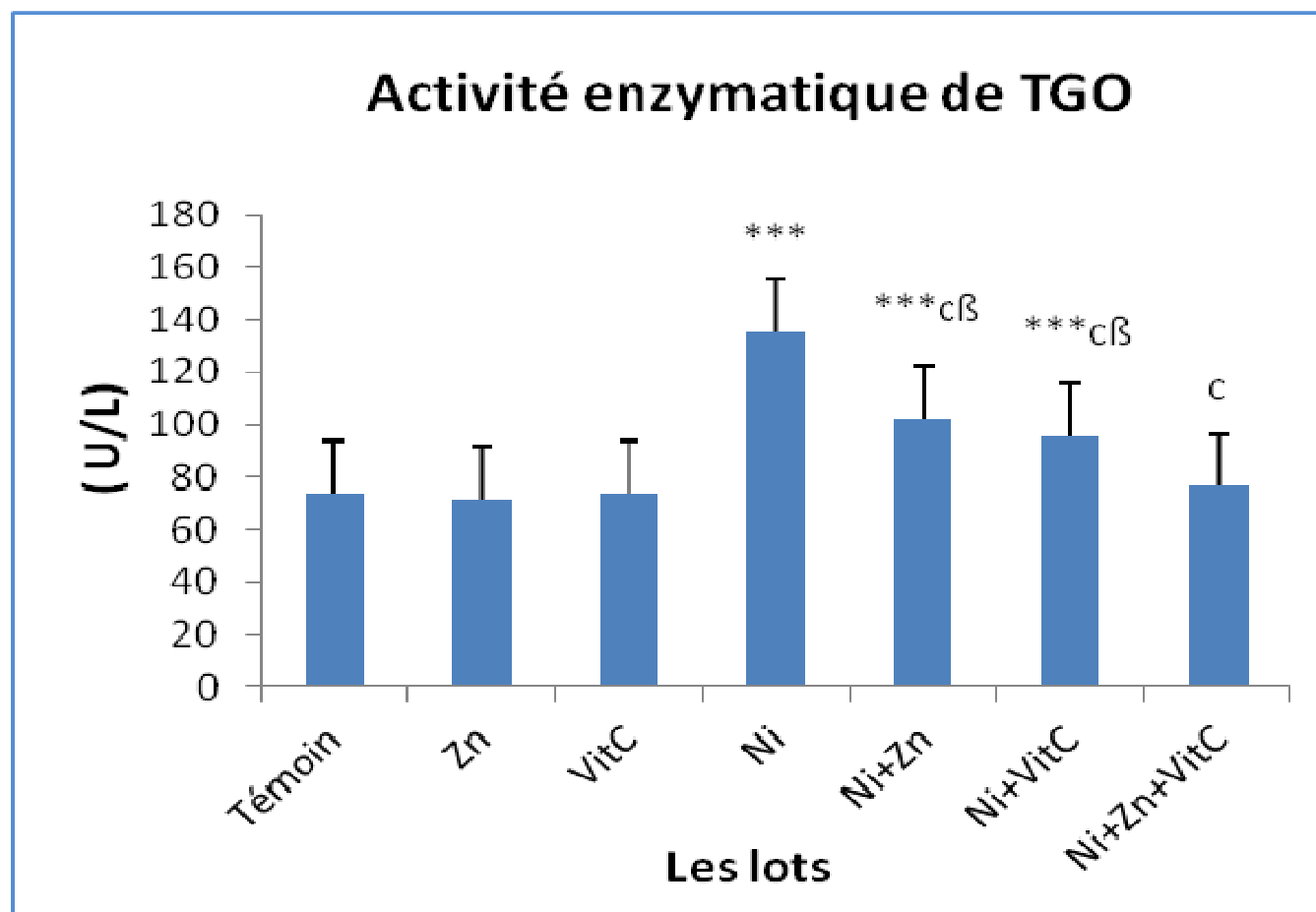


Figure 26 : L'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (TGO) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

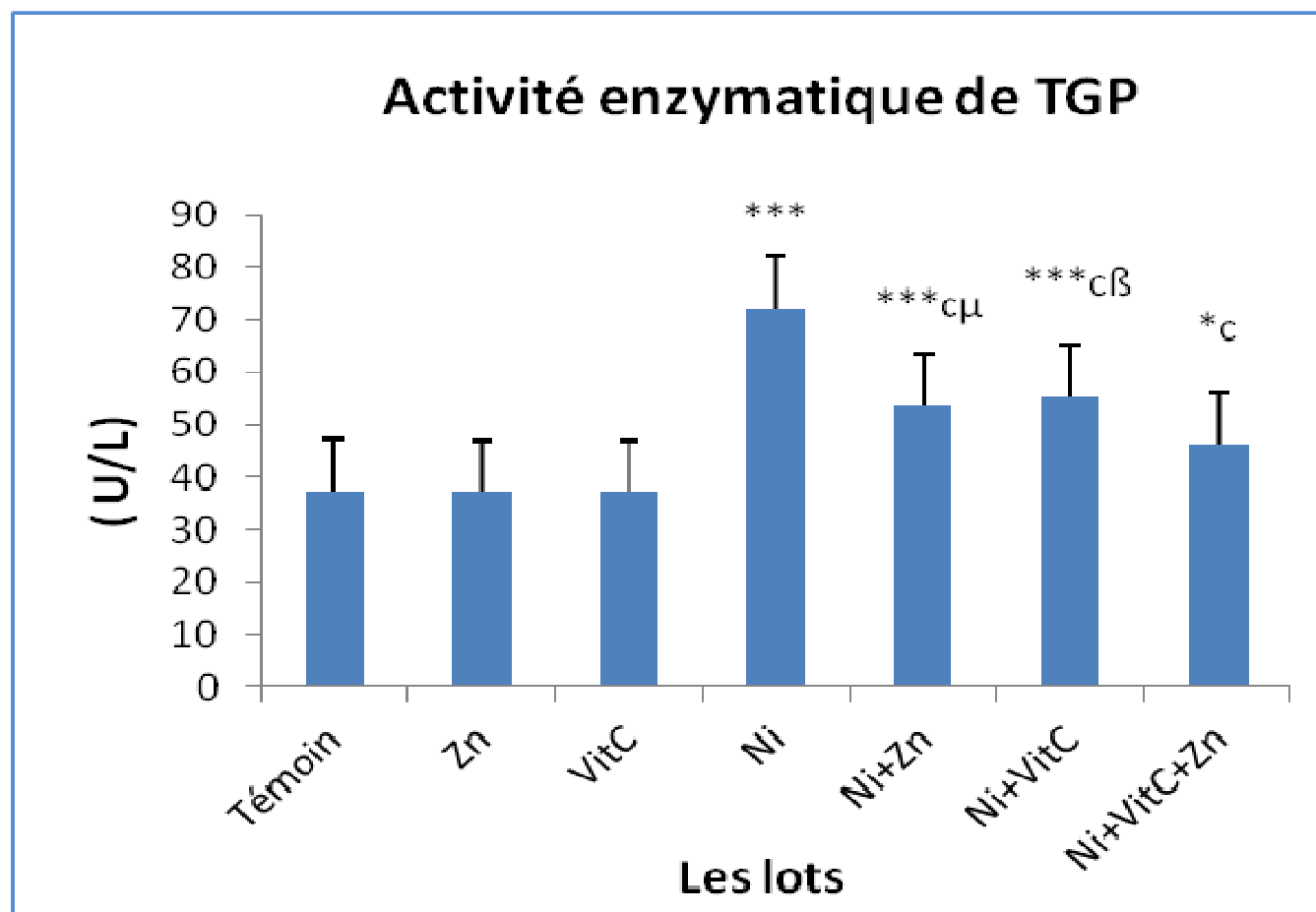


Figure 27 : L'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (TGP) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

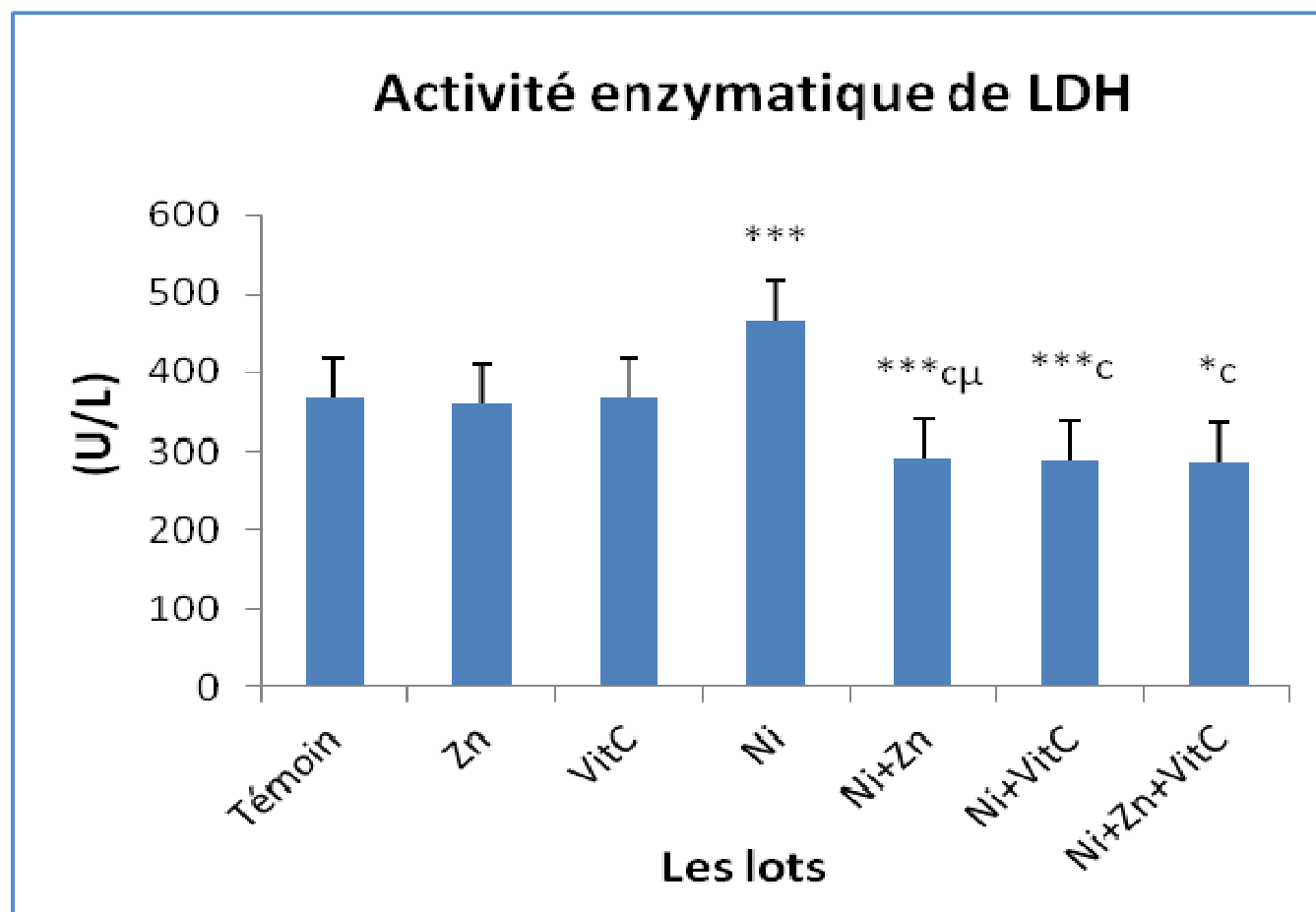


Figure 28 : L'activité enzymatique du lactate déshydrogénase (LDH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

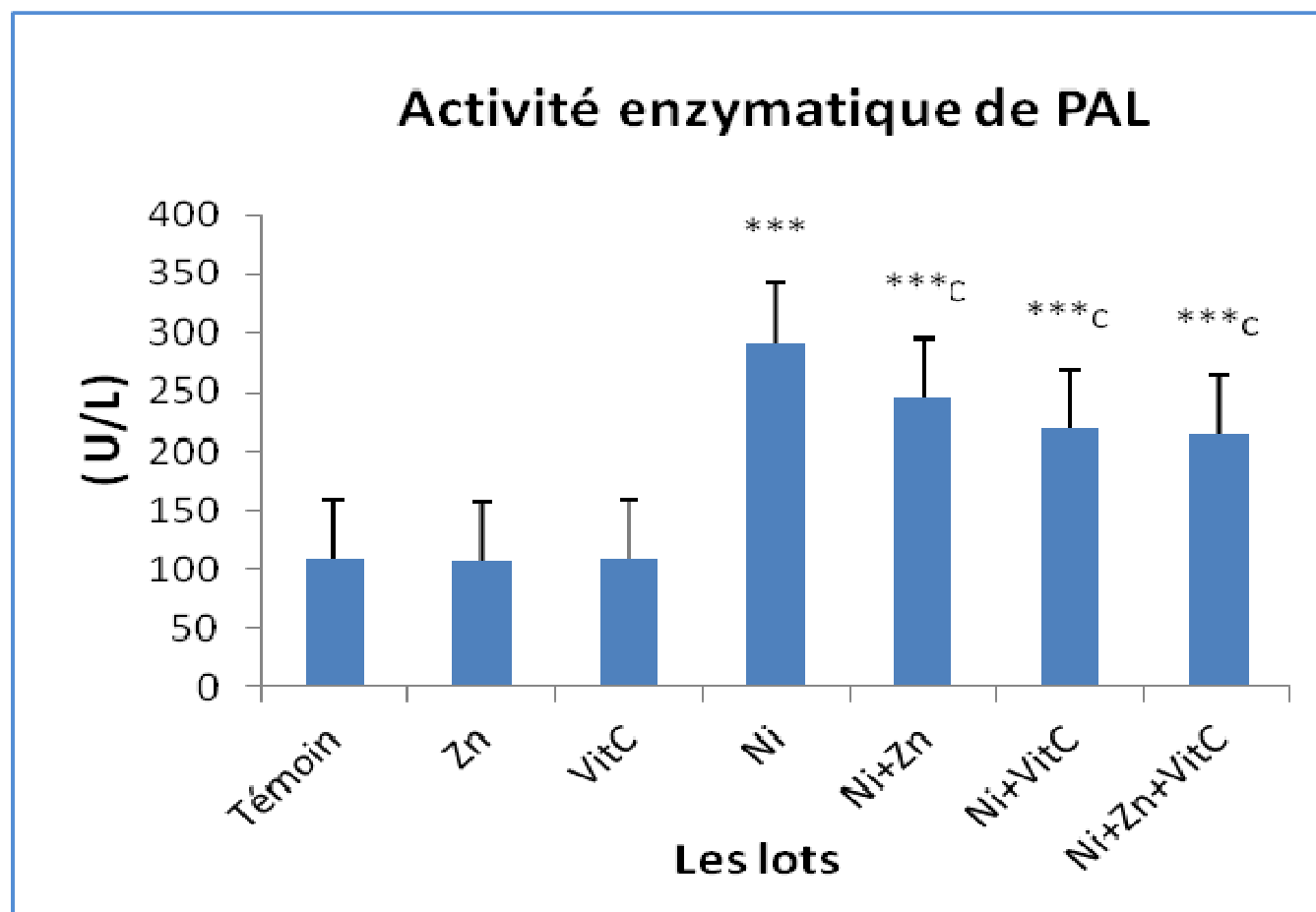


Figure 29 : L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

Le taux hépatique du glutathion (GSH), les activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GSH-Px), de la glutathion-S transférase (GST) et l'activité de la catalase (CAT) ont significativement ($p < 0,001$) diminuées chez les rats contaminés au nickel par rapport aux témoins (Tableau 10, Figures : 30, 31, 32, 33).

Par contre chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C nous avons remarqué une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) (Ni + Zn), (Ni + Vit C) et (Ni + Zn + Vit C) par rapport au groupe du nickel.

Concernant la combinaison (Ni + Zn) on note une diminution hautement significative ($p < 0,01$) des activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GSH-Px), de la glutathion-S transférase (GST) et une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du taux du glutathion (GSH) et une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité de la catalase (CAT) par rapport au lot Ni + Zn + Vit C.

Par contre le lot (Ni + Vit C) on note une diminution significative ($p < 0,05$) des activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GSH-Px), de la glutathion-S transférase (GST) et une diminution hautement significative ($p < 0,01$) du taux du glutathion (GSH), pas de différence significative de l'activité de la (CAT) par rapport au groupe (Ni + Zn + Vit C).

Les lots traités uniquement par le zinc ou / et la vitamine C leurs paramètres enzymatiques n'ont aucun changement significatif par rapport au témoin.

Tableau 10 : Variations de la teneur hépatique en glutathion (GSH), des activités enzymatiques du glutathion peroxydase (GSH-Px), du glutathion S-transférase (GST) et la catalase (CAT) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines

Paramètres	Témoin (n=8)	Zn (n=8)	VitC (n=8)	Ni (n=8)	Ni+Zn (n=8)	Ni+VitC (n=8)	Ni+Zn+VitC (n=8)
	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM
Glutathion (GSH) (nmol/mg/protéine)	51.25±2.09	51.18 ±1.98	51.23± 2.08	26.12 ^{***} ±1	34.87 ^{***ck} ±1.25	38.25 ^{***cβ} ±1.09	44.62 ^{**c} ±1.06
GSH-Px (μmol/min/mg/protéine)	0.50±0.02	0.44±0.01	0.49 ±0.02	0.22 ^{***} ±0.01	0.29 ^{***cβ} ±0.012	0.32 ^{***cμ} ±0.015	0.39 ^{**c} ±0.021
GST (μmol/min/mg/protéine)	0.53±0.02	0.525 ±0.01	0.532 ±0.02	0.27 ^{***} ±0.001	0.378 ^{***cβ} ±0.01	0.39 ^{***cμ} ±0.002	0.477 ^{**c} ±0.04
Catalase (μmol H₂O₂/min/mg/protéine)	33.55±1.30	33.48 ± 1.29	33.51±1.30	19.25 ^{***} ±0.88	24.25 ^{***cμ} ±0.83	25 ^{***c} ±1.59	28 ^{*c} ±0.84

* p < 0, 05 ; ** p < 0, 01 ; *** p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin.

^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni). ^μ p < 0,05 ; ^β p < 0,01 ; ^k p < 0.001 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

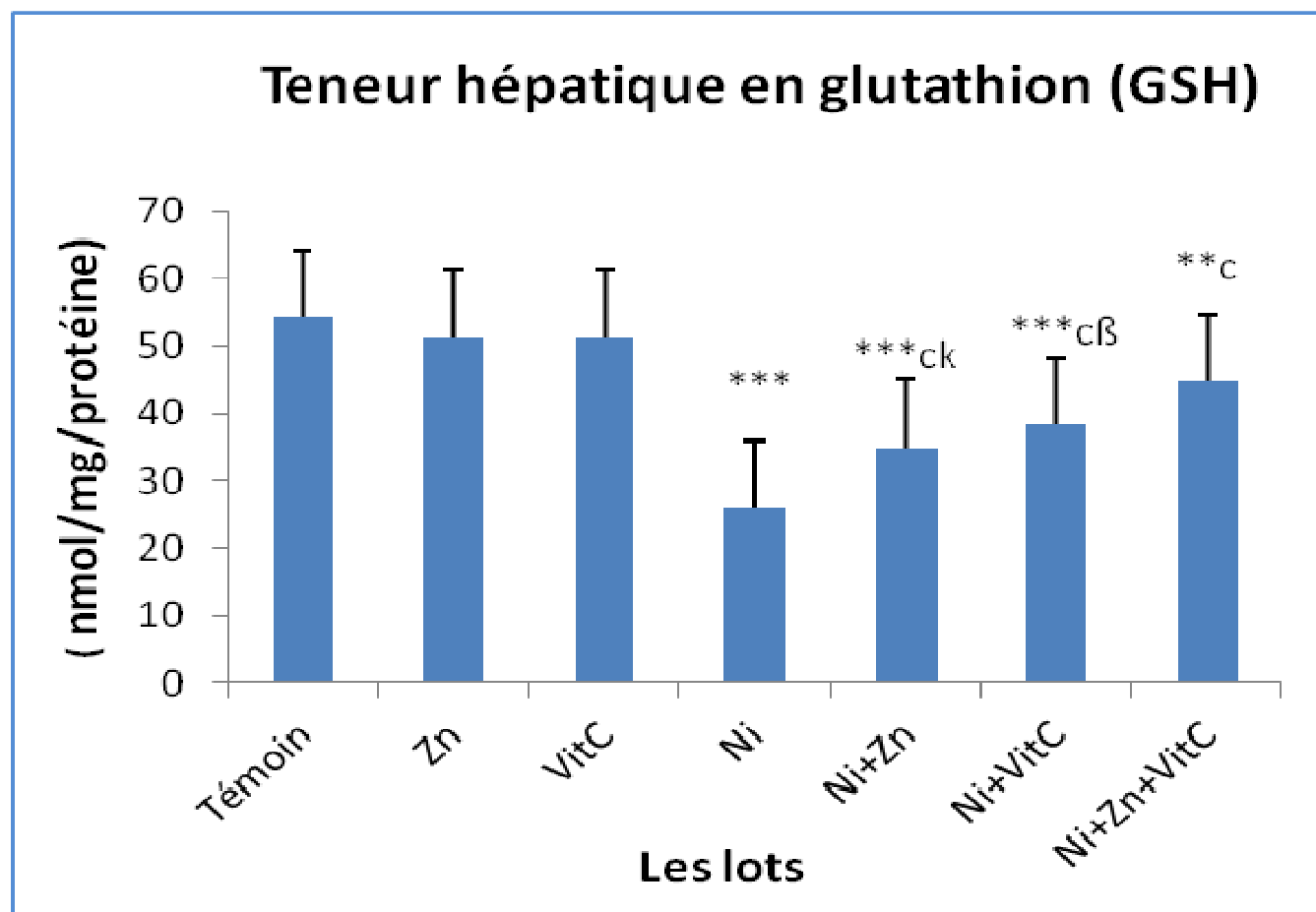


Figure 30 : La teneur hépatique en glutathion (GSH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

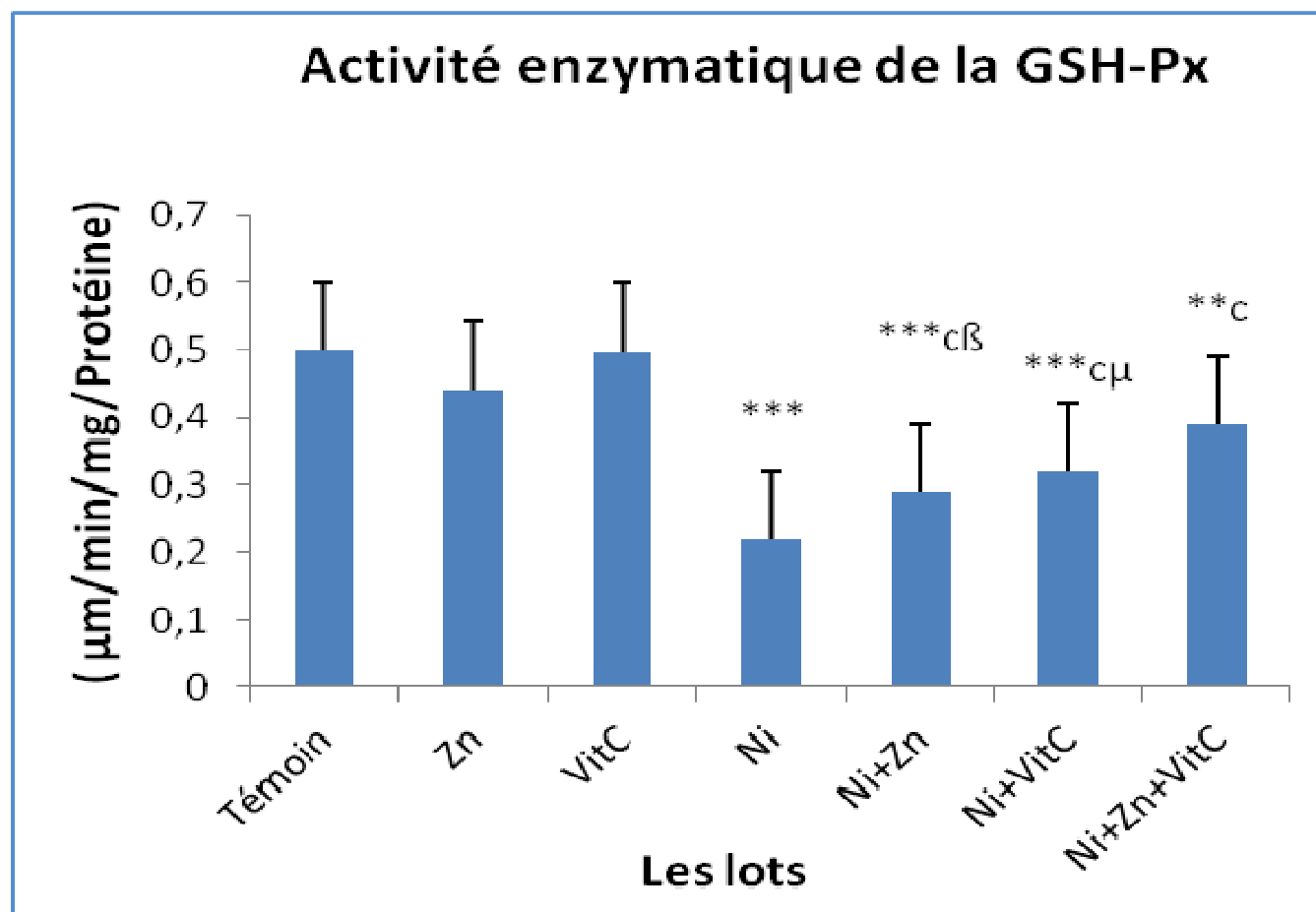


Figure 31 : L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

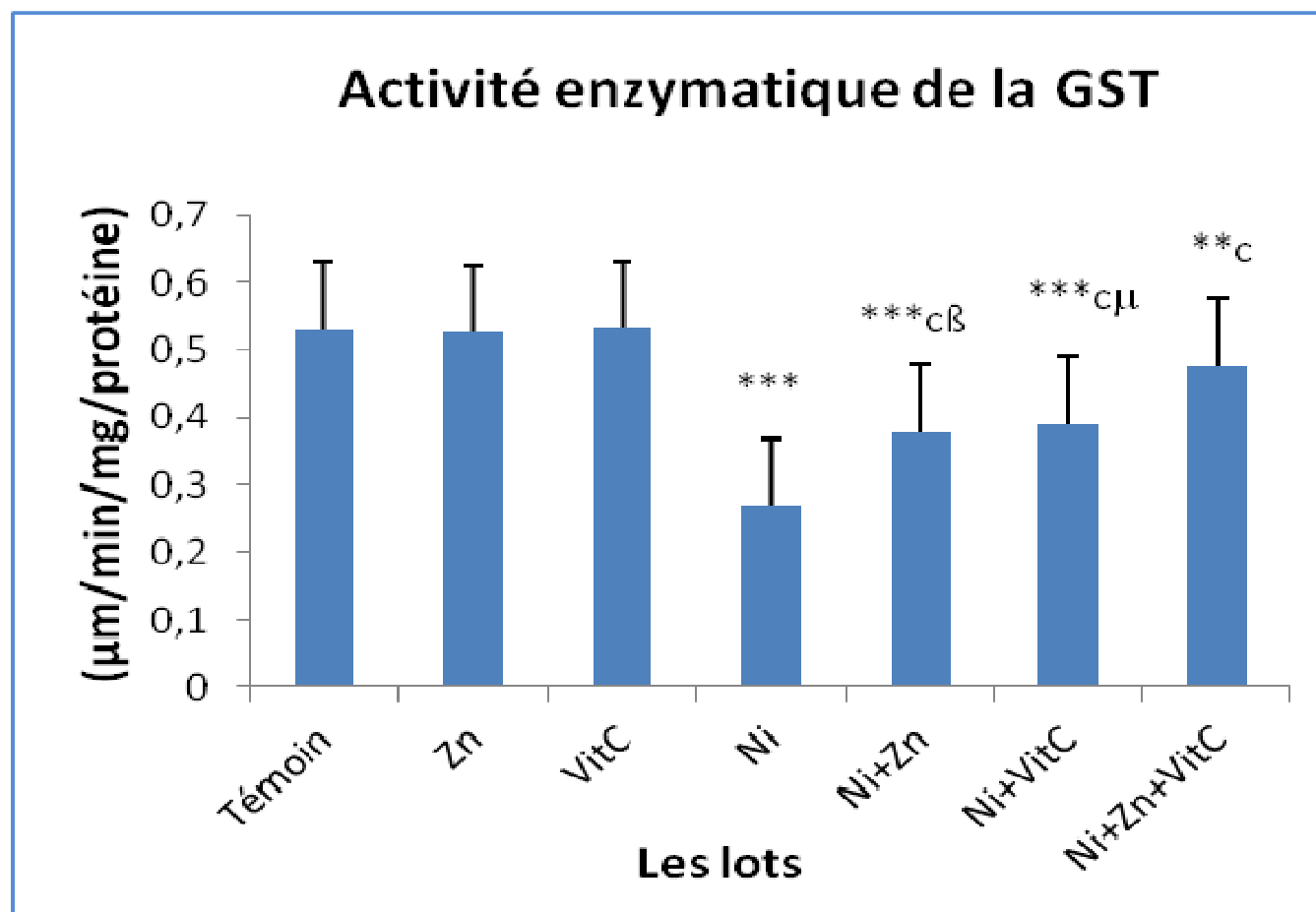


Figure 32 : L'activité enzymatique du glutathion S-transférase (GST) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

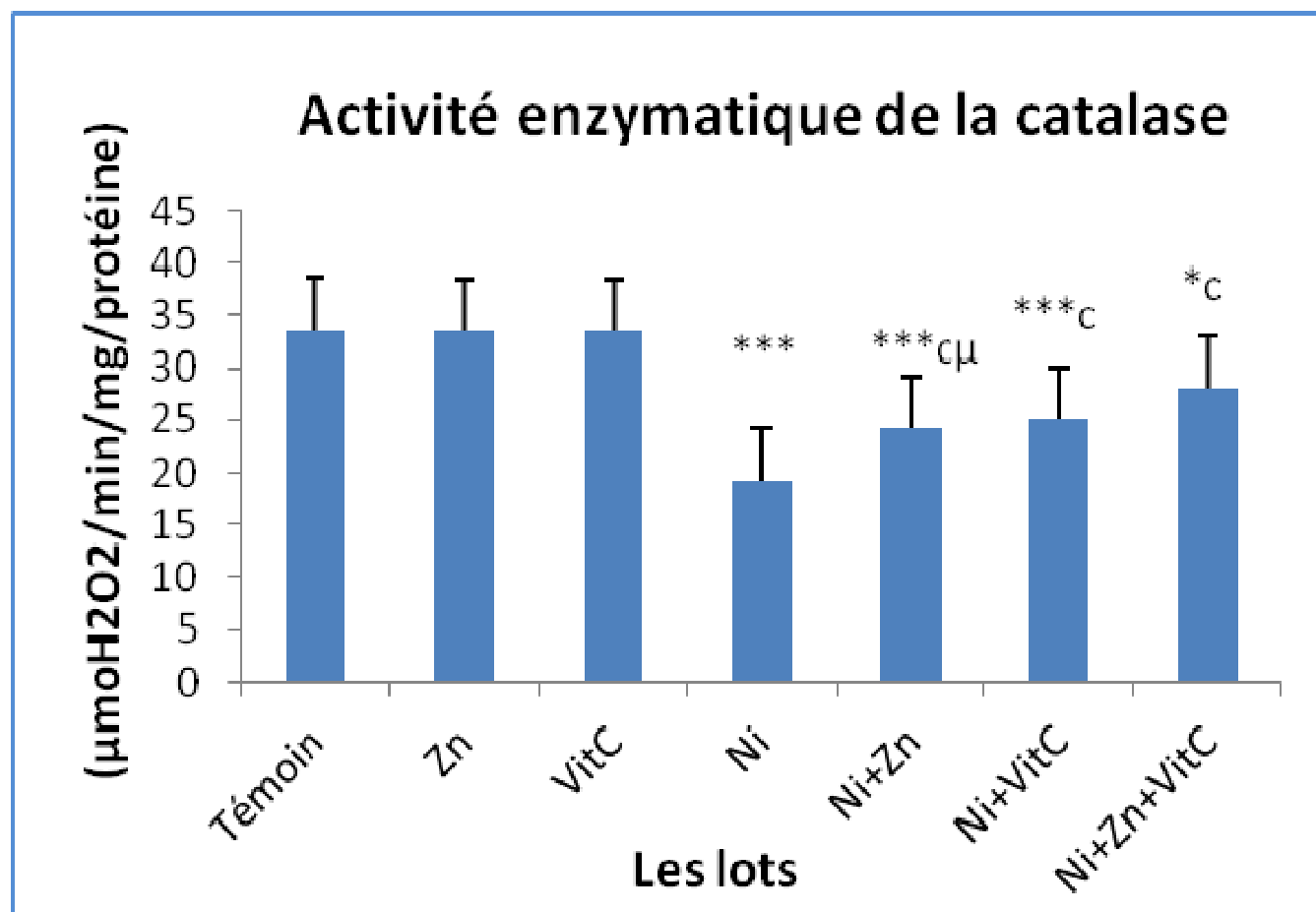


Figure 33 : L'activité enzymatique de la catalase (CAT) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

III. Effets sur les paramètres hématologiques :

Les résultats du (tableau 11, Figures : 34, 40) montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du nombre des globules blancs et significative ($p < 0,05$) de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin.

Par contre chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C nous remarquons une diminution hautement significative ($p < 0,01$) Ni + Zn, Ni + Vit C et Ni + Zn + Vit C du nombre des globules blancs et significative ($p < 0,05$) (Ni + Zn, Ni + Vit C et Ni + Zn + Vit C) de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) en comparaison avec le lot nickel.

En effet on note aussi une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) du taux des globules blancs chez les lots (Ni + Zn), (Ni + Vit C) et (Ni + Zn + Vit C) en comparaison aux rats témoins.

En revanche, on a remarqué une diminution hautement significative ($p < 0,01$) du nombre des globules rouges et la concentration d'hémoglobine (HGB), très hautement significative ($p < 0,001$) du taux d'hématocrite et elle est hautement significative ($p < 0,01$) du volume globulaire moyen (VGM) chez les rats contaminés au nickel par rapport aux témoins (Figures : 35, 36, 37, 38).

Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou / et la vitamine C on a enregistré une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) Ni + Zn, Ni + Vit C et Ni + Zn + Vit C du nombre des globules rouges et significative ($p < 0,05$) Ni + Zn, Ni + Vit C et Ni + Zn + Vit C de la concentration d'hémoglobine et du taux d'hématocrite et non significative de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) (Figure : 39)

et du volume globulaire moyen (VGM) et significative ($p < 0,05$) de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) par rapport au groupe du nickel (Figure : 40).

Les lots traités uniquement par le zinc et la vitamine C n'auront aucun changement significatif par rapport au témoin.

Tableau 11 : Variations du nombre des globules blancs , des globules rouges , du taux d'hémoglobine , d'hématocrite , du volume globulaire moyen (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés après un traitement de six semaines

Paramètres	Témoin (n=8)	Zn (n=8)	Vit C (n=8)	Ni (n=8)	Ni+Zn (n=8)	Ni+VitC (n=8)	Ni+Zn+VitC (n=8)
	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM	Moy SEM
Globules blancs ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6.788 $\pm$ 0.22	6.64 $\pm$ 0.29	6.751 $\pm$ 0.27	9.88 ^{***} $\pm$ 0.70	8.73 ^{**b} $\pm$ 0.74	8.66 ^{**b} $\pm$ 0.63	8.52 ^{**b} $\pm$ 0.67
Globules rouges ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7.71 $\pm$ 0.22	7.80 $\pm$ 0.25	7.75 $\pm$ 0.34	6.50 ^{**} $\pm$ 0.18	8.82 ^{**cβ} $\pm$ 0.17	8.56 ^{*cβ} $\pm$ 0.19	8.04 ^c $\pm$ 0.20
Taux d'hémoglobine (g/dl)	15.70 $\pm$ 0.18	15.63 $\pm$ 0.30	15.68 $\pm$ 0.20	14.36 ^{**} $\pm$ 0.84	15.32 ^{*aμ} $\pm$ 0.52	15.43 ^{*a} $\pm$ 0.44	15.59 ^{*a} $\pm$ 0.49
Taux d'hématocrite (%)	44.53 $\pm$ 0.52	44.58 $\pm$ 0.34	44.56 $\pm$ 1.20	38.27 ^{***} $\pm$ 0.45	41.65 ^{*a} $\pm$ 1.42	40.28 ^{**aμ} $\pm$ 0.71	41.68 ^{*a} $\pm$ 1.32
VGM (fl)	50.73 $\pm$ 0.92	50.80 $\pm$ 0.36	50.72 $\pm$ 0.89	47.13 ^{**} $\pm$ 1.1	48.67 [*] $\pm$ 1.48	48.28 [*] $\pm$ 1.73	48,92 [*] $\pm$ 1.51
TGMH (g/dl)	17.88 $\pm$ 0.67	17.90 $\pm$ 0.72	17.84 $\pm$ 0.42	17.17 [*] $\pm$ 0.34	17.76 $\pm$ 0.58	17.36 $\pm$ 0.35	17.79 $\pm$ 0.40
CCMH (pg)	35.40 $\pm$ 0.59	35.16 $\pm$ 0.42	35.30 $\pm$ 0.43	38.3 [*] $\pm$ 0.53	35.59 ^a $\pm$ 0.76	35.34 ^a $\pm$ 0.27	35.50 ^a $\pm$ 0.34

* p < 0, 05 ; ** p < 0, 01 ; *** p < 0,001 Comparaison avec le lot témoin.

^a p < 0,05 ; ^b p < 0,01 ; ^c p < 0,001 Comparaison avec le lot nickel (Ni).

^{μ} p < 0,05 ; ^{β} p < 0,01 Comparaison des lots Ni +Zn, Ni +Vit C avec le lot Ni + Zn + Vit C.

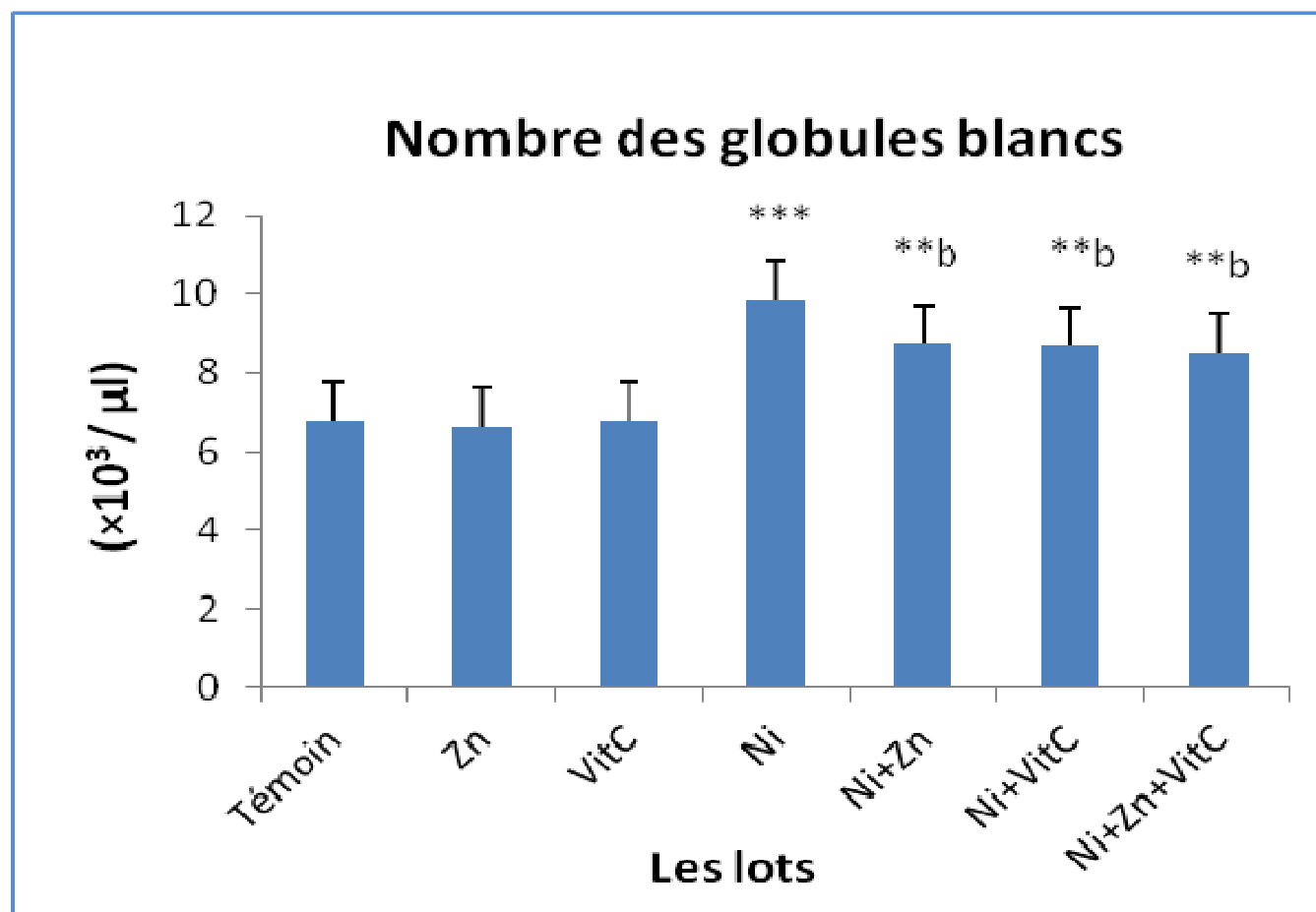


Figure 34 : Variations du nombre des globules blancs chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

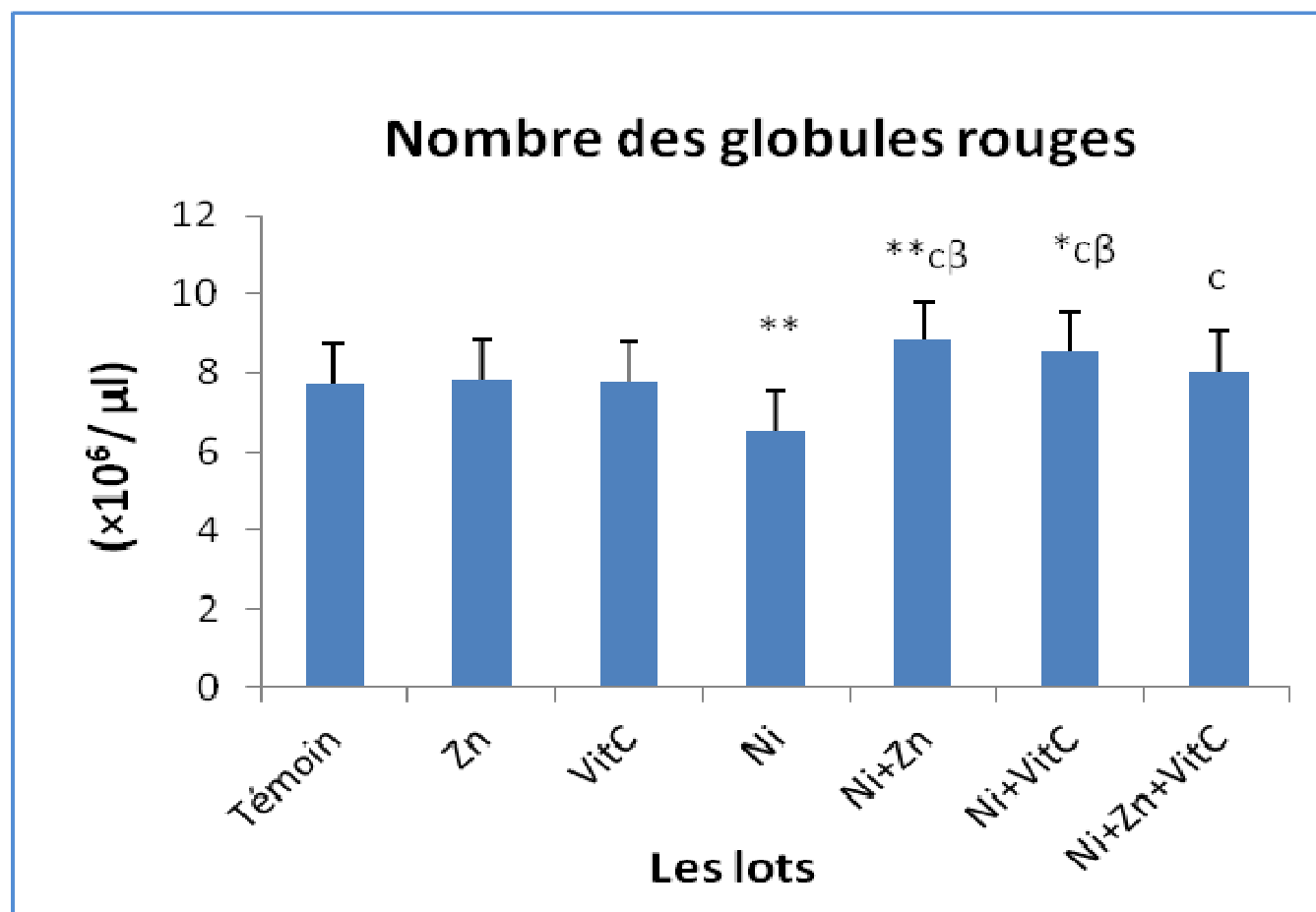


Figure 35 : Variations du nombre des globules rouges chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

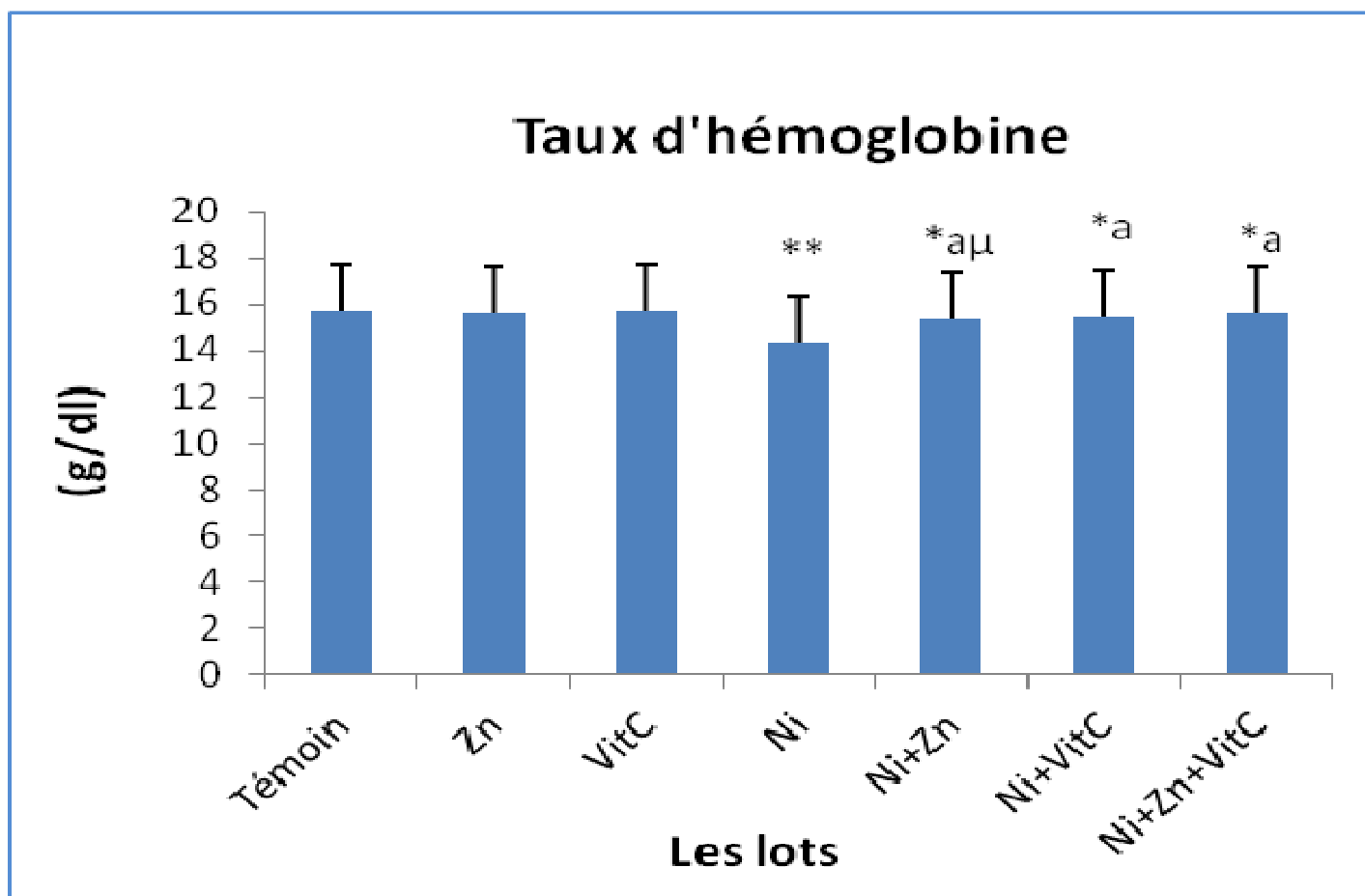


Figure 36 : Variations du taux d'hémoglobine chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

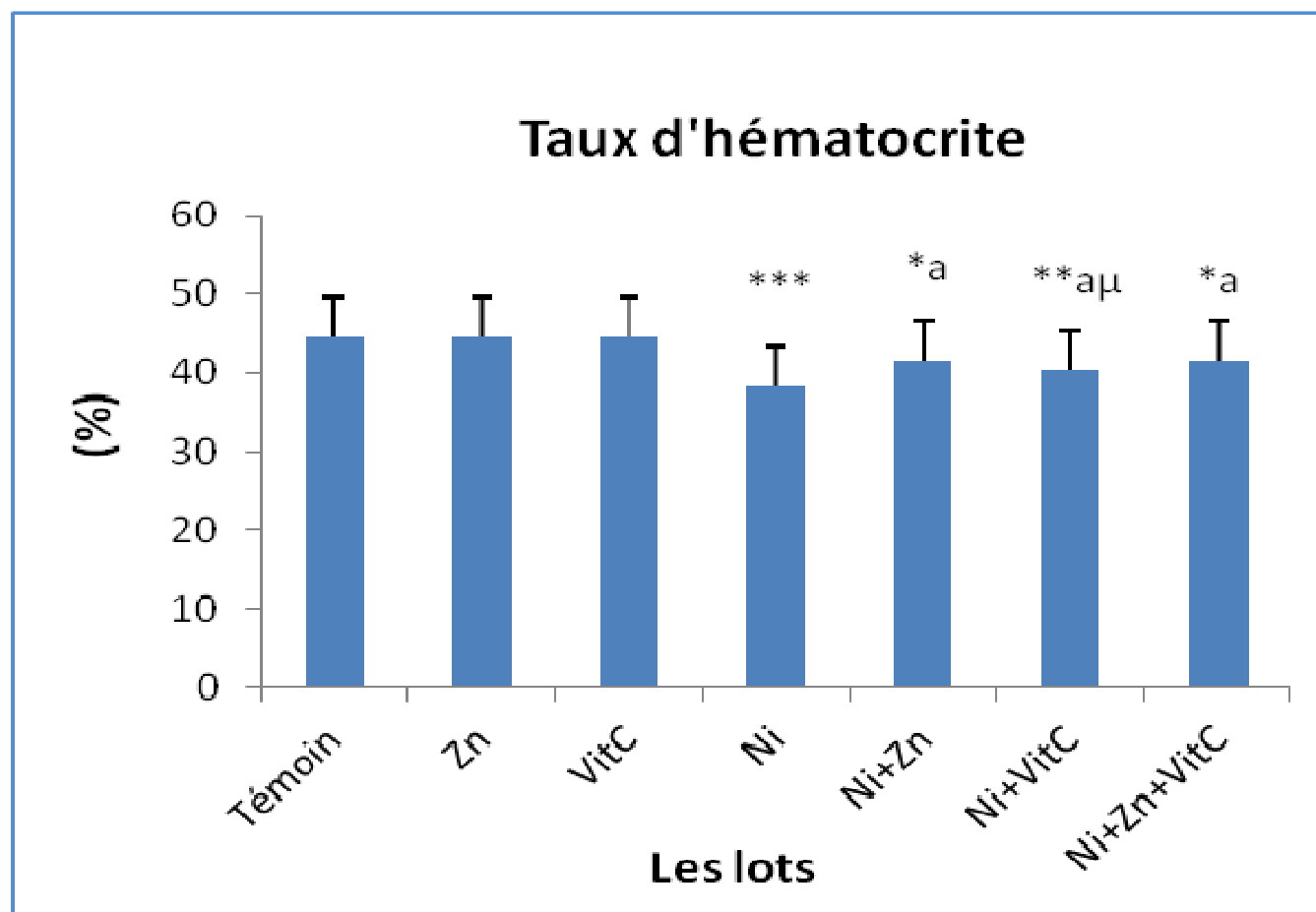


Figure 37 : Variations du taux d'hématocrite chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

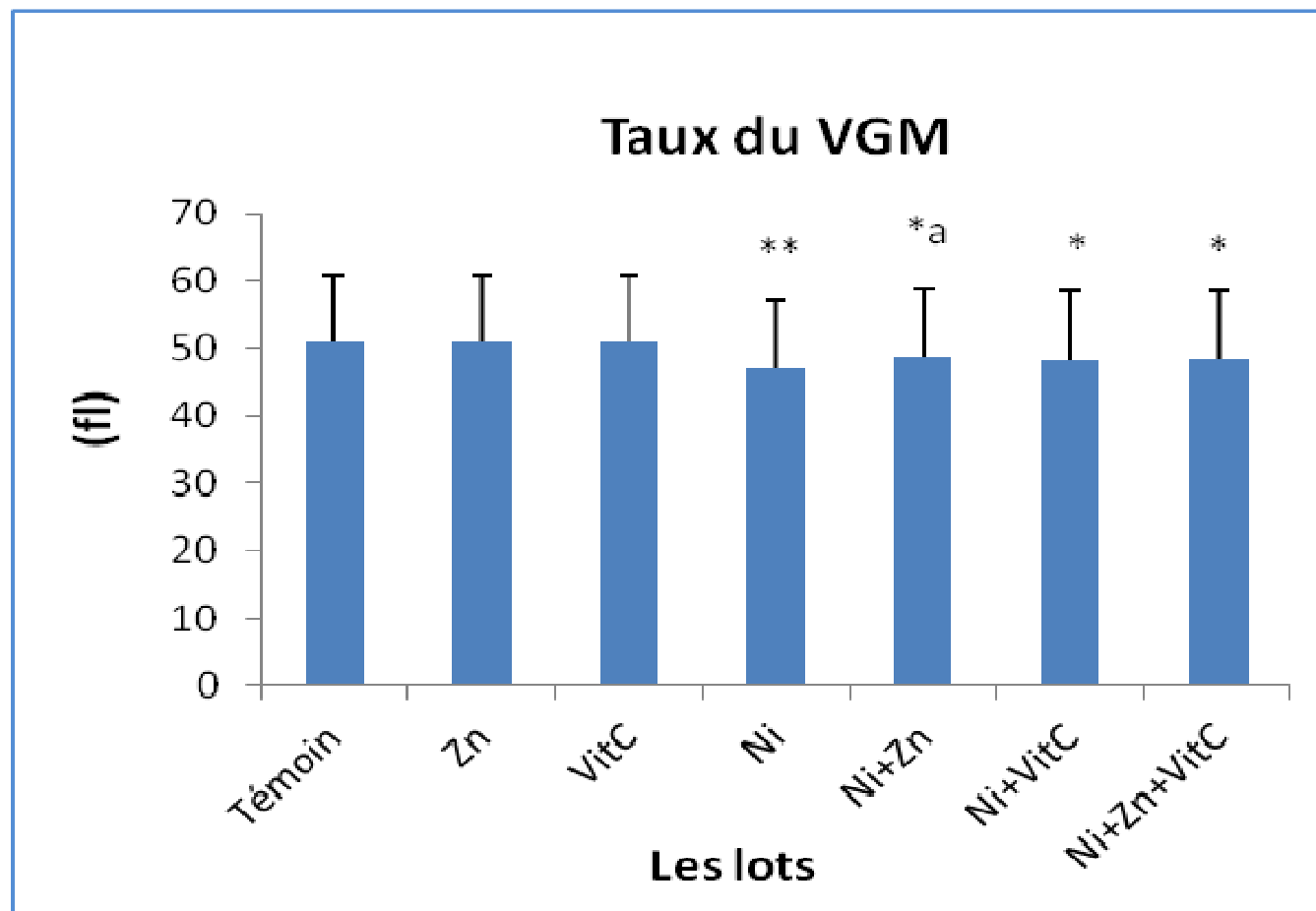


Figure 38 : Variations du taux du VGM chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

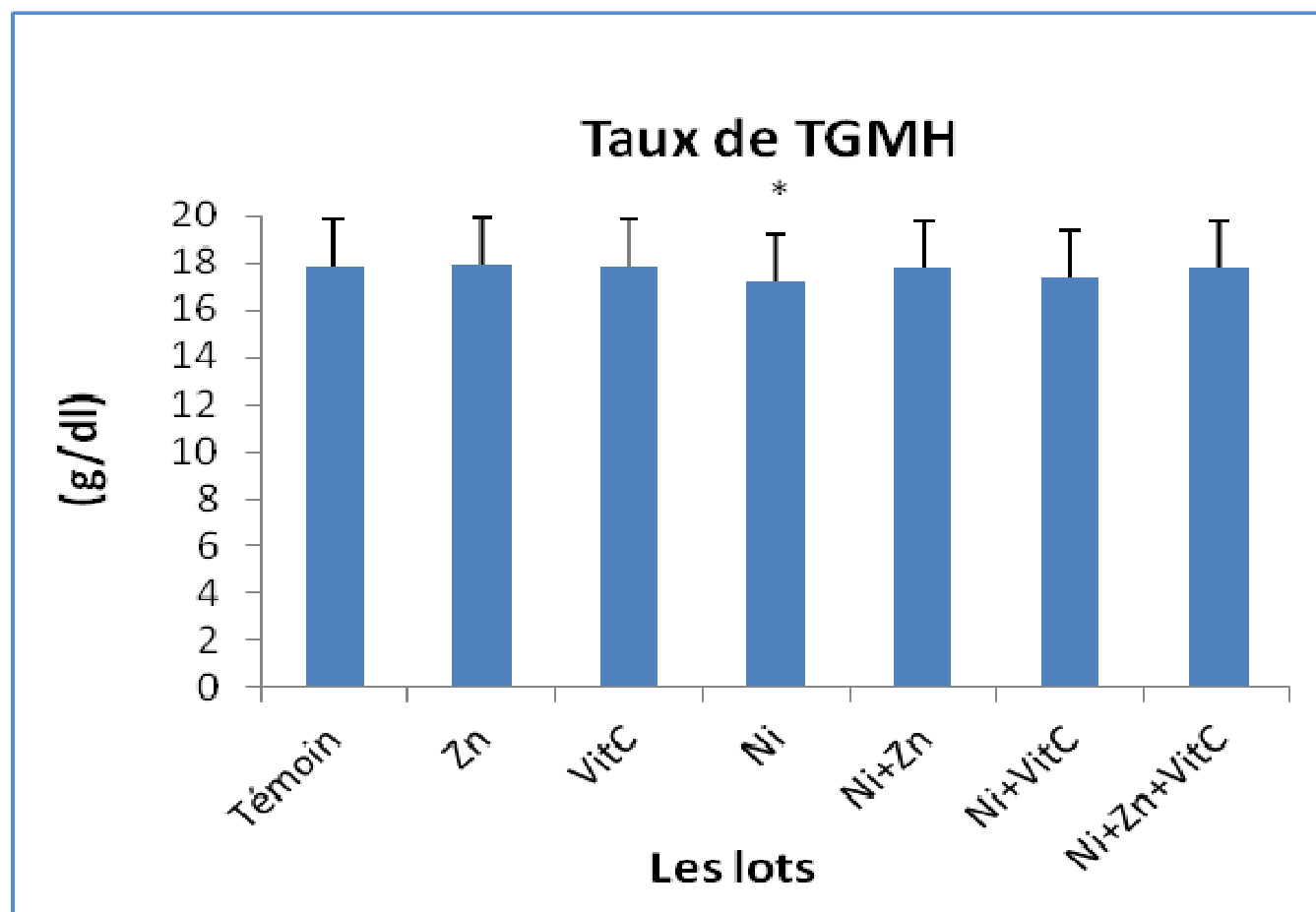


Figure 39 : Variations du taux de TGMH chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

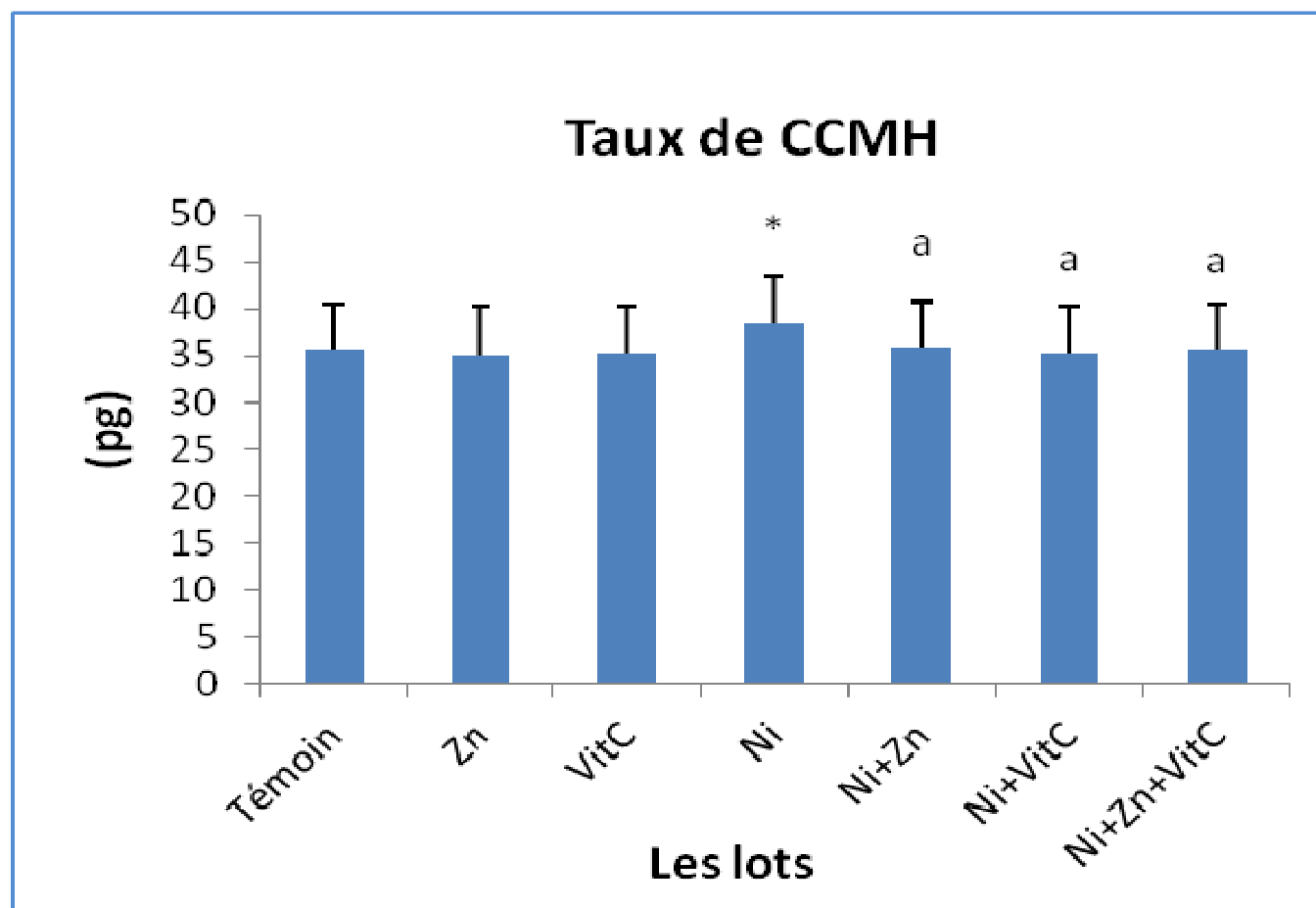


Figure 40 : Variations du taux de CCMH chez les rats témoins, les traités par le zinc ou/et la vitamine C, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés.

IV. L'étude histologique du foie :

L'histologie du foie d'un rat du lot témoin montre des cellules hépatiques normales, un cytoplasme granuleux et préservé avec une veine centrale clairement visible (Figure 41 A).

Les lots traités au zinc ou/et la vitamine C seul on note aucun changement sur l'architecture des cellules hépatiques semble intacte (Figure 42 B, 42 C).

Alors que pour le lot des rats contaminés par le nickel on note une altération sévère de l'architecture du foie avec une veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irréguliers ballonnés, inflammation et nécrose hépatique (Figure 43 D).

Enfin pour les lots contaminés au nickel et traités par le zinc ou/et la vitamine C combinés on remarque des congestions vasculaires avec une veine centrolobulaire dilatée mais en général l'architecture semble intacte (Figures 44 E, 44 F, 45 G)

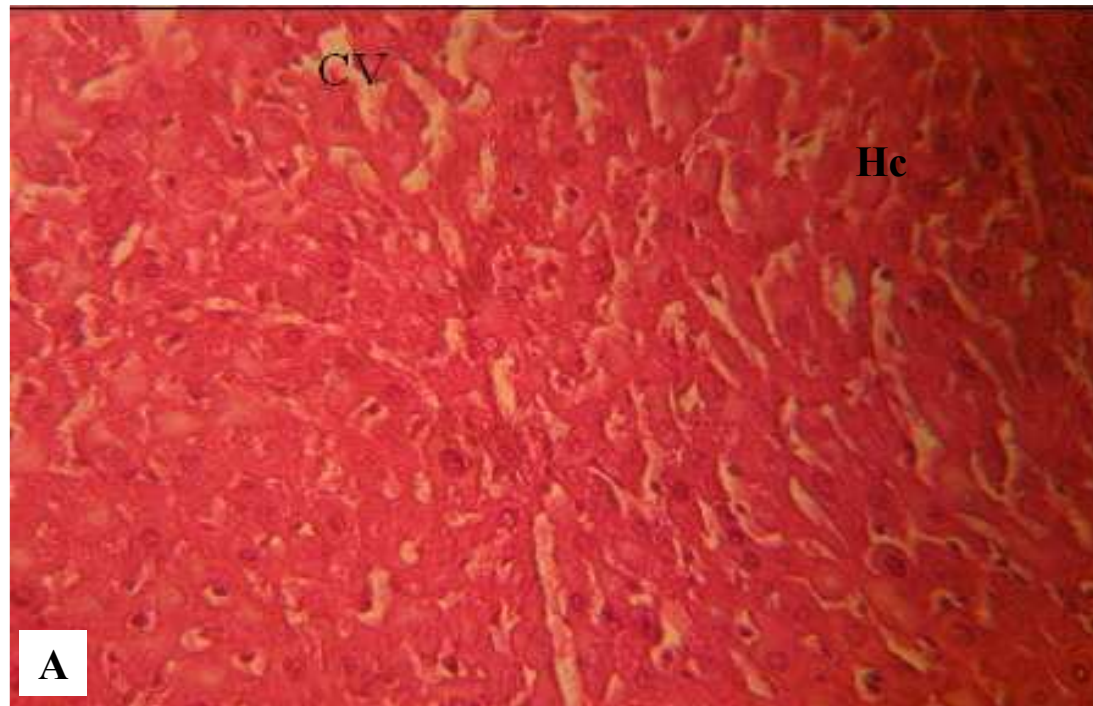


Figure 41 : Coupe histologique du foie des rats témoins (A). (*Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : $\times 400$*)

Hc : Hépatocyte (cellule hépatique)

CV : Veine centrolobulaire

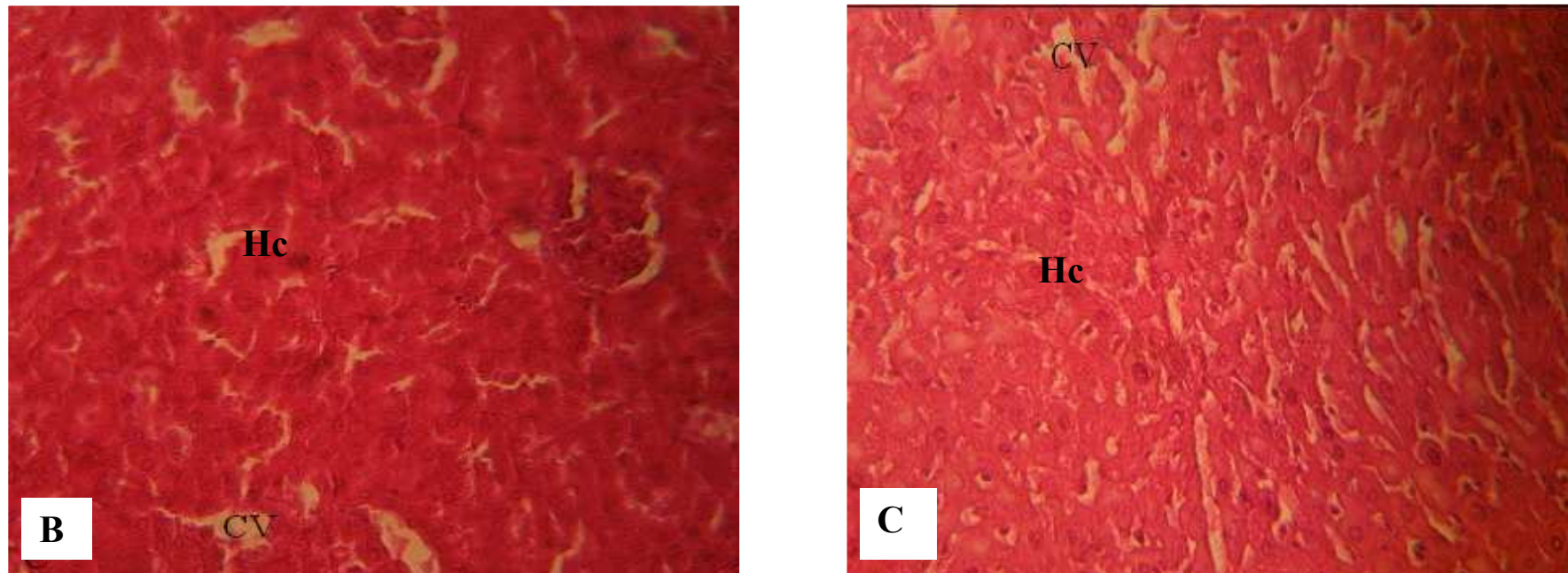


Figure 42 : Coupes histologiques du foie des rats traités au zinc (B) et des rats traités à la vitamine C (C).

Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : $\times 400$

Hc : Hépatocyte (cellule hépatique).

CV : Veine centrolobulaire

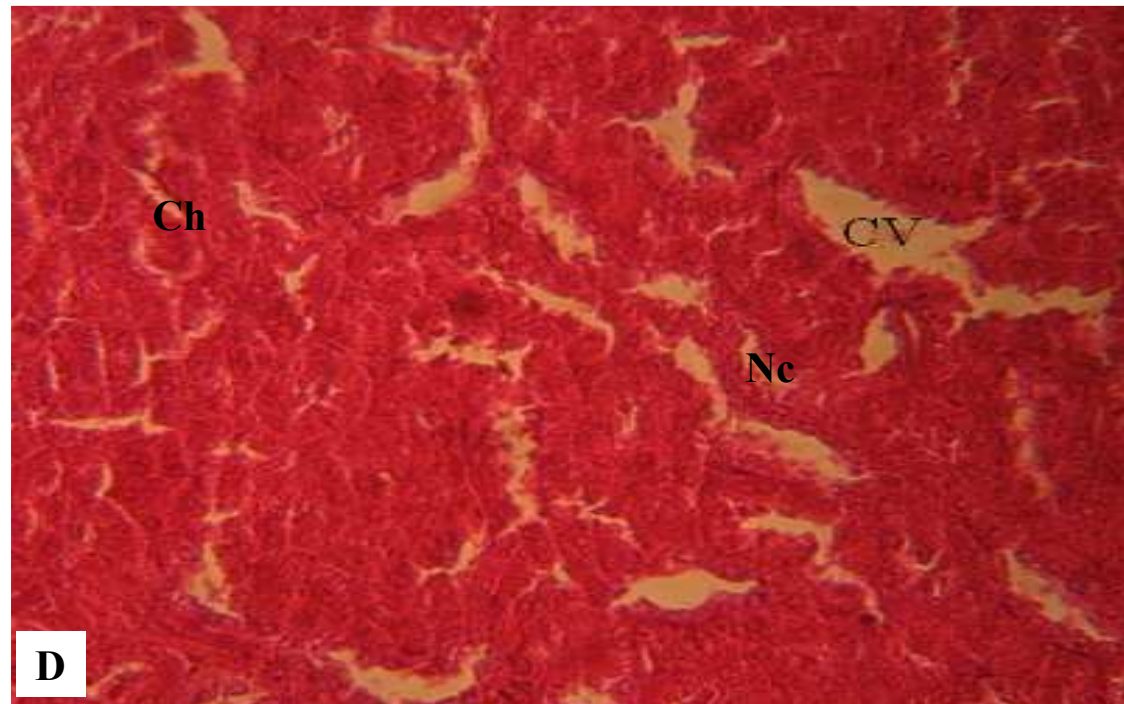


Figure 43 : Coupe histologique du foie des rats traités par le sulfate de nickel (D) montrant différents types d'altérations. (*Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : $\times 400$*)

Ch : Cytolyse hépatocyttaire

CV : Veine centrolobulaire

Nc : Nécrose

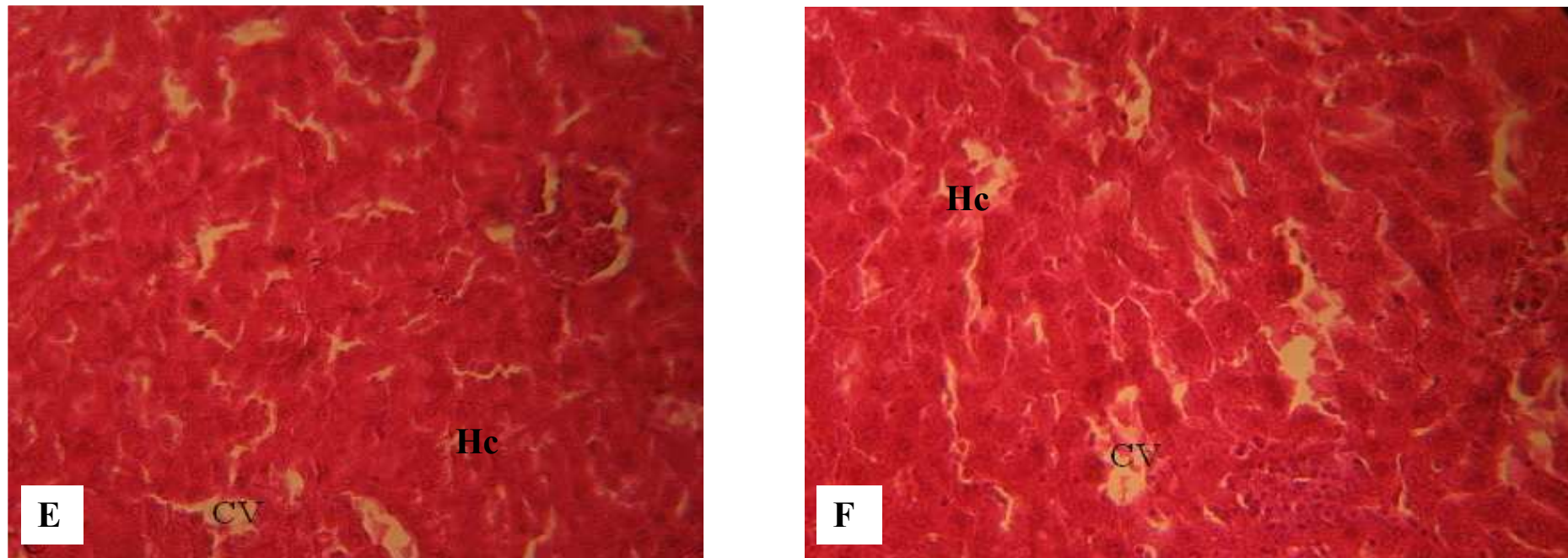


Figure 44 : Coupes histologiques du foie des rats traités a la combinaison Ni + Zn (E) et des rats traités a la combinaison Ni + Vit C (F).

Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400

Hc : Hépatocyte (cellule hépatique).

CV : Veine centrolobulaire

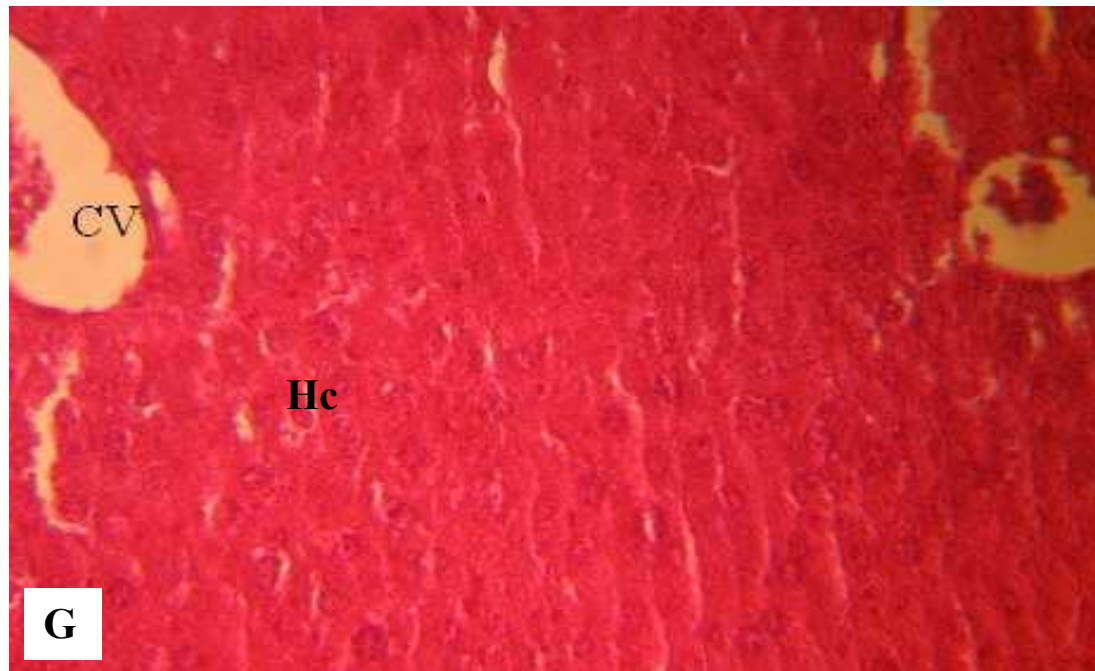


Figure 45 : Coupe histologique du foie des rats traités a la combinaison Ni + Zn+ Vit C (G).

Coloration : hématoxyline-éosine. Gr : × 400

Hc : Hépatocyte (cellule hépatique).

CV : Veine centrolobulaire

Chapitre V : Discussion

De nombreuses études ont montré que la plupart des métaux lourds tel que le nickel, le vanadium, le plomb, le cadmium, l'arsenic, le cobalt et autres sont considérés comme de véritables agents toxiques, perturbant certains systèmes enzymatiques et également les activités métaboliques chez l'homme et l'animal (Iskan et *al.*, 1994 ; Viala, 1998). Par ailleurs, la toxicité d'un métal pour un organisme peut être modifiée par l'exposition préalable, simultanée, ou consécutive à des oligoéléments (zinc, cuivre, sélénium...etc.) ou à des vitamines (vitamine C, vitamine E...etc.).

Nous avons tenté dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact d'un polluant toxique (nickel) sur des rats Wistar. Mais notre attention sera fixée sur l'action protectrice possible de la combinaison du zinc et de la vitamine C contre les effets toxiques du nickel. Pour une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques, hématologiques et histologiques en cause. Les résultats obtenus sont analysés et discutés en fonction de travaux relatés dans plusieurs bibliographies.

Notre étude montre que l'exposition au sulfate de nickel (800mg/l pendant six semaines) a affecté le poids corporel des rats, en effet, nous avons remarqué une diminution de la croissance des rats contaminés au nickel comparativement aux témoins. (Paternain et *al.*, 1988 ; Dostal et *al.*, 1989). Celle-ci peut être le résultat d'élévation de la dégénération des lipides et des protéines causée par la toxicité du nickel (Cempel and Janicka, 2002). D'autre par, le nickel réagit avec plusieurs éléments nutritifs (Solomons et *al.*, 1982). Les chélates Ni^{+2} affectent le métabolisme ou les concentrations tissulaires de plusieurs éléments importants dans le métabolisme de l'os chez les mammifères : le cuivre, le manganèse, le magnésium, le calcium et le zinc.

Concernant le poids des organes nous remarquons une augmentation du poids absolu et relatif du foie chez les rats contaminés au nickel. Ceci est expliqué, d'une part, par

l'hypertrophie tissulaire du foie causé par ce métal et d'autre part, par l'accumulation intense de ce métal dans cet organe cible aux métaux lourds.

Simons *et al.*, (1995) ont signalé que l'augmentation des poids absolus et relatifs du foie des animaux est indicatrice de la toxicité des substances utilisées. Nos résultats sont en accord avec les données bibliographiques de (Dieter *et al.*; 1988 ; Novelli *et al.*, 1998).

En revanche, le traitement des rats contaminés par le nickel et traités par le zinc et/ou la vitamine C a entraîné une amélioration du poids corporel, du poids absolu et relatif du foie qui est due à l'effet protecteur du zinc et/ou de la vitamine C contre la toxicité du nickel.

L'analyse des résultats a montré aussi une augmentation plus élevée de la concentration sérique du glucose chez les rats traités au nickel. Cette hyperglycémie est causée par la toxicité du nickel et elle est due probablement à l'action toxique de ce métal sur l'activité sécrétoire de la glande pituitaire. Il agit par inhibition directe de la production de l'insuline par les îlots de Langerhans (Dormer *et al.*, 1973 ; Kechrid *et al.*, 2006) ou il bloque l'utilisation du glucose par les cellules et mène à la présence d'une concentration élevée d'insuline (Sunderman *et al.*, 2001) ou en raison de perturbation dans la sécrétion du glucagon et mène à la dégradation élevée du glycogène, offre une nouvelle production de glucose à partir d'autres sources non glucidique comme les protéines (Cartana *et al.*, 1992).

Le traitement par le zinc et/ou la vitamine C va améliorer la concentration du glucose chez les rats contaminés au nickel et ceci suggère que la supplémentation du zinc va provoquer une diminution de l'effet du nickel en se liant à des biomolécules ainsi que l'amélioration de la sécrétion d'insuline en réduisant l'accumulation du glucose. Le zinc protège les enzymes et l'ATP impliqués dans le métabolisme du glucose. Tandis que la vitamine C pourrait modifier les récepteurs d'insuline des tissus musculaires et adipeux par

l'augmentation de la perméabilité de la membrane afin d'améliorer l'absorption du glucose (Ambali et *al.*, 2011).

D'après nos résultats, les paramètres biochimiques ont été perturbés par le nickel. En effet, nous avons enregistré l'augmentation de la concentration sérique des triglycérides chez les rats contaminés au nickel par rapport aux 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 du glucagon. Ces résultats ont été confirmés dans les travaux de (Cempel and Janicka, 2002).

Chez les rats contaminés au nickel et traités au zinc et/ou la vitamine C, la concentration sérique des triglycérides est réglée par l'addition du zinc /ou de la vitamine C ce qui va diminuer l'activité des enzymes lipogéniques du foie, améliorer l'action de l'insuline ou augmenter l'activité de la lipoprotéine lipase (Paolisso et *al.*, 1990 ; Rayssiger et *al.*, 1991).

L'analyse des résultats a montré aussi une diminution importante des protéines totales et d'albumine chez les rats contaminés au nickel. Cette réduction on peut l'expliquer par le fait que la plus part des protéines possèdent des groupements (SH, OH), ces dernières réagissent très facilement avec le nickel et les radicaux libres générés par ce métalloïde et par conséquence ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leur structures. De plus l'exposition des rats au stress environnemental (Ni) peut modifier le métabolisme des protéines et les acides aminés du foie (synthèse des protéines) (Kusal et *al.*, 2001).

Par ailleurs, l'administration de la combinaison zinc et/ou vitamine C au groupe contaminé au nickel aide à élever légèrement le contenu des protéines et d'albumine l'apport devient presque aux limites normales.

D'autres auteurs ont également prouvé d'une manière concluante que le zinc stimule la synthèse de protéines (Giugliano and Millward, 1987 ; Ehara and Yamaguchi, 1997) ce qui fait du zinc un facteur essentiel pour la synthèse protéique.

L'augmentation des taux sériques de l'urée et de la créatinine chez les rats contaminés au nickel est considérée comme biomarqueur de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqué par ce métal. L'urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Finco, 1997).

De plus, l'augmentation de l'urée dans le sérum est corrélée avec l'augmentation de catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine. Ceci est confirmé par la diminution des protéines totales dans le sérum donc l'augmentation de l'urée et de la créatinine chez les rats contaminés au nickel est due a l'effet néphrotoxique du nickel (Harper et *al.*, 1979 ; El-Demerdash et *al.*, 2009).

En plus de ça l'augmentation de la concentration de la bilirubine totale et directe est logique vue a la présence d'une lésion hépatique. Par ailleurs, le taux sanguin d'albumine, le principal transporteur de la bilirubine, baisse lors de certaines maladies du foie témoigne de la présence d'une grande quantité de la bilirubine libre dans le sang.

Rana et *al.*, (1996) ont montré que l'élévation sérique de la bilirubine est un indicateur important des maladies et induit une hyperbilirubinémie et cette élévation signale les maladies hépatiques. En revanche, les résultats obtenus montrent qu'il existe une amélioration des paramètres précédents chez les rats contaminés au nickel et traités à la combinaison du zinc et la vitamine C.

Nos résultats montrent une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (TGO, TGP), la phosphatase alcaline (PAL) et la lactate déshydrogénase (LDH) dans le sérum

des rats contaminés au nickel. L'augmentation de ces enzymes indique une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes du tissu vers le plasma due à l'altération de la perméabilité membranaire (Misra *et al.*; 1991 ; Navarro *et al.*, 1993). Ces résultats sont en accord avec les travaux de (Dhawan *et al.*, 1992 ; Sidhu *et al.*, 2006) chez les poulets et (Tandon *et al.*, 1999) chez les rats qui ont déclaré l'augmentation de ces enzymes.

Le traitement par le zinc et/ou la vitamine C a amélioré l'activité des enzymes transaminases TGO, TGP, PAL et LDH chez les rats contaminés au nickel. Ces antioxydants peuvent stabiliser la membrane cellulaire hépatique et de protéger les hépatocytes contre les effets toxiques du nickel qui peut diminuer la fuite des enzymes vers le plasma. (Bettger *et al.*; 1981 ; Waalkes *et al.*; 1985 ; Dhawan *et al.*; 1992).

La cellule dispose pour sa protection au GSH porteur d'une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques (Morin *et al.*, 2001). Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la glutathion S-transférase, la catalase et la superoxyde desmutase (Jollow *et al.*, 1984 ; Morin *et al.*, 2001).

D'après nos résultats lors d'une contamination des animaux par le nickel, les taux de GSH sont nettement diminués suite à leur action de neutralisation des radicaux libres générés par le nickel, ce phénomène aussi provoque sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements thiols des protéines (Hansen *et al.*, 2006), une autre explication est que cette déplétion est due à une diminution de la synthèse du GSH ou une augmentation de sa dégradation au cours du stress oxydant causé par le nickel.

Le traitement des rats par le zinc et/ou la vitamine C induit une augmentation significative dans la concentration du glutathion. L'augmentation du taux du glutathion ; l'antioxydant le

plus abondant dans les cellules et qui joue un rôle très important dans la maintenance du potentiel redox au niveau de la cellule ; et se traduit par la capacité du zinc et/ou de la vitamine C d'induire un effet scavenger, c'est adire au lieu que les radicaux libres produits par le nickel se neutralisent par le GSH ils vont plutôt être captés par la SOD et la vitamine C et en maintenant ainsi le taux normal du glutathion des cellules hépatiques.

Les cellules possèdent d'autres systèmes de défense antioxydants incluent des enzymes comme le glutathion peroxydase (GSH-Px), le glutathion S-transférase (GST) et la catalase.

Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de ces enzymes dans le foie chez les rats contaminés au nickel en comparaison avec le lot témoin.

La catalase est un composant majeur dans le système enzymatique d'antioxydant fondamental qui catalyse la décomposition de H_2O_2 à H_2O et O_2 et partager cette fonction avec le glutathion peroxydase (GSH-Px) (Valko et *al.*, 2006) qui a besoin du GSH et du sélénium pour fonctionner correctement, son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultants de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une indication claire sur l'ampleur de dégâts cytotoxiques qui se produisent dans plusieurs tissus (Sies, 1991 ; Smith et *al.*, 1993 ; Das et *al.*, 2000). En plus de ça, la diminution des activités des enzymes antioxydants peut être due à la direction de ce métal de se lier au site actif des enzymes ou cotisation à leur usage augmenté d'ébouer des radicaux libres induit par le métal donc causer l'inhibition irrévocable dans leurs activités (Misra et *al.*, 1991 ; Iscan et *al.*, 1994 ; Yao et *al.*, 2001).

L'augmentation observée de l'activité du glutathion (GSH), glutathion peroxydase (GSH-Px), de glutathion S-transférase et de la catalase dans le foie des rats contaminés au nickel et traités par le zinc et/ou la vitamine C par rapport aux rats contaminés au nickel pourrait être a

cause de son action indirecte a réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène (ERO) , par conséquent résulter en stress oxydant réduit.

Le nickel peut aussi engendrer des situations d'anémies plus au moins importantes. Ainsi, il semble que la présence de nickel dans les cellules provoque un déséquilibre global en métaux essentiels comme le fer (Horiguchi et *al.*, 1996) .

L'analyse de nos résultats a montré que la contamination des rats par le nickel a provoqué une diminution importante des globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite. De plus on note une diminution significative de VGM et aucune différence significative des : CCMH, TGMH. D'après ces résultats on peut dire que le nickel a provoqué une anémie (Kostic et *al.*, 1993).

Cette anémie est due d'une part ; aux effets des radicaux libres générés par le nickel sur les globules rouges, ou certains radicaux libres comme : O_2^- et OH^- sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires, de plus en présence de fortes concentrations de ces radicaux, l'hémoglobine peut facilement s'oxyder (Merchant and Mod ,2004). Ces résultats sont en accord avec les études (Tkeshelashvili et *al.*, 1989 ; Vest et *al.*, 2004).

En revanche, on a enregistré une augmentation bien claire des globules blancs chez les rats contaminés au nickel par rapport aux témoins. Cette augmentation explique que l'animal mobilise toutes ces capacités de défense (notamment les leucocytes) pour lutter contre les infectieux causés par la présence des xénobiotiques dans son organisme (Dogra et *al.*, 1999). Ce qui confirme l'importance des globules blancs dans la défense immunitaire contre les toxiques.

Cependant cette anémie est corrigée chez les lots traités aux combinaisons Ni +Zn, Ni + VitC, Ni +Zn + VitC après six semaines de traitement ; ce qui montre davantage l'effet cytotoxique du nickel (Dogra et *al.*, 1999).

Ainsi l'observation des coupes histologiques que nous avons réalisées révèle que la toxicité du nickel s'est manifestée par des atteintes tissulaires au niveau du foie. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques. (Sirover and Loeb, 1976 ; Dhawan and Goel, 1996 ; Milton et *al.*, 2011)

L'administration du zinc et/ou de la vitamine C au nickel, a eu comme conséquence la normalisation de l'histologie du foie tout à fait sensiblement. Tels les effets bénéfiques du zinc dans le foie en réglant les niveaux de différentes enzymes également ont été observés par nous plus tôt tout en évaluant son potentiel dans la toxicité par le nickel (Dhawan and Goel, 1994 ; Dhawan and Goel, 1996).

De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (Thevenod et *al.*, 2000). En effet, ces radicaux peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller attaquer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (Scandalios, 2005).

L'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) permet la transmission du caractère radicalaire et déclenche ainsi des pathologies sévères allant jusqu'à la mort des animaux (Halliwell, 1996).

Il a été signalé que l'exposition subchronique par voie orale du nickel entraîne de multiples nécroses au niveau du foie associé à des changements de l'ultrastructure et des altérations hépatiques (Purvi et *al.*, 2003 ; Milton et *al.*, 2011) .

Bien que le modèle lamellaire d'hépatocytes été restauré a presque normal chez les lots traité au zinc et/ou la vitamine C , ce peut être attribué a la capacité du zinc et/ou de la vitamine C a réduire la menace des radicaux oxygénés ce qui mène a la réduction de changement pathologiques(Sidhu et *al.*,2006).

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale

En conclusion, nos résultats montrent que l'administration du nickel et l'utilisation du zinc et/ou la vitamine C comme détoxifiants pendant six semaines (subchronique) par voie orale chez les rats Wistar provoque :

- Un déficit pondéral avec une augmentation du poids absolu et relatif du foie par rapport aux rats témoins, sachant que l'administration du zinc et/ou la vitamine C a amélioré la croissance des rats.
- Une perturbation du métabolisme biochimique, le nickel a induit une augmentation de la concentration du glucose, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine et de la bilirubine et ceci va s'accompagner par une augmentation de l'activité enzymatique des marqueurs hépatiques TGO, TGP, PAL et LDH. Une diminution des protéines totales et d'albumine a été signalée aussi, ces changements sont corrigés par l'addition du zinc et/ou de la vitamine C.
- L'étude hématologique, montre une diminution du nombre des globules rouges, d'hémoglobine et hématocrite avec une augmentation des globules blancs chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin. notons que ces taux sont changés après l'addition du zinc et/ou de la vitamine C.
- Une meilleure caractérisation de l'hépatotoxicité vis-à-vis a la toxicité du nickel a travers le dosage du GSH , GSH-Px , GST et de la catalase au niveau du foie qui est expliquée par une déplétion du système de détoxification a glutathion et a catalases en comparaison avec les rats témoins. Au contraire, l'addition du zinc et/ou de la vitamine C a induit une amélioration de cette concentration et activités en comparaison avec le lot nickel.

Conclusion générale

- L'étude histologique, montre que la toxicité du nickel s'est manifestée par des atteintes tissulaires. En effet les résultats illustrent l'apparition des nécroses hépatiques, veine centrolobulaire dilatée, hépatocytes irrégulières ballonnées, inflammation. Il semble donc que le nickel est cytotoxique au niveau du foie. Notons que ces signes histopathologiques sont moins importants chez le lot contaminé au nickel et traité avec du zinc et/ou de la vitamine C que celui contaminé au nickel.

Enfin, nous pouvons confirmer que le nickel a des effets hépatotoxiques, hématotoxiques, a raison de ses effets sur la fonction métabolique du foie, sur les paramètres sanguins. Notons que le traitement par le zinc et/ou la vitamine C présente un moindre effet que ceux observés après la contamination au nickel seul. Ainsi, on peut juger que l'addition du zinc et/ou de la vitamine C a réduit la toxicité du nickel.

Ceci est expliqué par le pouvoir antioxydant du zinc et/ou de la vitamine C à réduire le stress oxydant ce qui a permis de cette façon la protection contre les effets toxiques du nickel.

Perspectives :

En perspective, à l'avenir il serait intéressant de développer ces recherches d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de la détoxification de l'organisme, à travers l'analyse de tous les éléments de la cascade enzymatique du système de détoxification notamment G6PD.

- Détermination de la concentration du xénobiotique dans le sang et quelques organes cible en particulier le foie.

Conclusion générale

- Les tests de toxicité in vitro sur les cellules hépatiques en présence de différentes doses du xénobiotique.
- Développer les dosages des biomarqueurs (le rapport GSH/GSSG, les radicaux libres, SOD, zinc et vitamine C.....)
- Apprécier les effets du nickel sur les systèmes immunitaires et l'effet protecteur possible de la combinaison du zinc et la vitamine C.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Adkins, B. Jr., Richards, J.H., Gardner, D.E. (1979). «Enhancement of Experimental Respiratory Infection Following Nickel Inhalation». *Environ. Research* **20**: 33-42.
- Aebi, H. (1974). *Catalase. Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press NY. **2**, pp 673-684.
- Al Hassan, A. W., Adenkola, A. Y., Yusuf, Z. M., Bauchi, M. I., Saleh Ochigbo, V. I. (2010). Erythrocyte osmotic fragility of Wistar rats administered ascorbic acid during the hot-dry season . *Journal of Cell and Animal Biology* **4(2)**: 029-033.
- Ambali, S.F., Shuaib, K., Edeh. R., Orijei, B.C., Shittu, M., Akande, M. (2011). Hyperglycemia induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and lead in Wistar rats: Role of pancreatic lipoperoxidation and alleviating effect of vitamin C. *Biology and Medicine* **3(1)**: 6-14.
- Angelos, M.G., Kutala, V.K., Torres, C.A., Stoner, G., Mohammed, J.D., Oera Nnan, K. (2005). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am . Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**: 341-347.
- Ankley, G.T., Phipps, G.P., Leonard, E.N., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Kosian, P.A., Cotter, A.M., Dierkes, J.R., Hansen, D.J., Mahony, J.D. (1991). «Acid-volatile Sulphide as a Factor Mediating Cadmium and Nickel Bioavailability in Contaminated Sediments». *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 1299-1307.
- Ashraf, M., Abdel, M., Kamar, M. (2007). Acute effect of cadmium treatment on the kidney of rats: Biochemicals and ultrastructural studies. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **20**: 3497-3506.
- Association canadienne de l'électricité. (1985). «Environmental Implications of Trace Element Releases from Canadian Coal-fired Generating Stations», Research Report, Volume II. pp 88-96.
- ATSDR. (1991). «Draft Toxicological Profile for Nickel: Update», U.S. Public Health Service. pp 19-20.

Références bibliographiques

-**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. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.html>.

Avias, J. (1972). «Nickel: Element Geochemistry». The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences, R.W. Fairbridge (éd.), Van Nostrand Reinhold Co. New York, NY, pp 790-793.

-**Ayo, J. O., Oladele, S.B., Ngam, S., Fayomi, A., Afolayan, S.B.** (1998a). Diurnal fluctuations in rectal temperature of the Red Sokoto goat during the harmattan season. *Res. Vet. Sci.* **66**: 7-9.

B

-**Babich, H and Stotzky, G.** (1983^a). «Further Studies on Environmental Factors that Modify the Toxicity of Nickel to Microbes». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **3**: 82-89.

-**Babich, H and Stotzky, G.** (1983^b). «Nickel Toxicity to Estuarine/marine Fungi and its amelioration by Magnesium in Seawater». *Water Air Soil Pollut.* **19**: 193-202.

-**Barouki, R and Morel, Y.** (2001). Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* **61** : 511-516.

-**Bartling, H., Radzio, D.R., Steiner, U. E.** (1993). A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur.J.Biochem.* **216**: 579-586.

-**Bayoumi, Y., Perez-Pertejo, C., Ordonez.** (2000). Changes in the glutathione redox balance induced by the pesticides heptachlor, chlordane, and toxaphene in CHO-K1 cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **65**: 748-55.

-**Beckman, K. B and Ames, B. N.** (1997). Oxidative decay of DNA. *Biol. Chem.* **272** : 19633-19636.

Références bibliographiques

- Beijer, K and Jernelov, A.** (1986). «Sources, Transport and Transformation of Metals in the environment, Volume 1», Handbook on the Toxicology of Metals, L. Friberg, G.F. Nordberg et V.B. Vouk (éd.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford. pp 68-84.
- Benson, J.M., Burt, D.G., Cheng, Y.S., Eidson, A.F., Gulati, D.K., Hahn, F.F., Hobbs, C.H., Pickrell, J.A.** (1990). «Subchronic Inhalation Toxicity of Nickel Subsulfide to Rats and Mice». *Inhal. Toxicol.* **2**: 1-19.
- Berger, M.** (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances nutrition clinique et métabolisme. *Nutr. Clin. Métab.* **20**: 48-53.
- Berlett, B. S and Stadtman, E. R.** (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Biol. Chem.* **272** : 20313-20316.
- Bettger, J.W and Dell, B.L.** (1981). Critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life. Sci.* **28**: 1425–1438.
- Bisessar, S.** (1989). «Effects of Lime on Nickel Uptake and Toxicity in Celery Grown on muck Soil Contaminated by a Nickel Refinery». *Sci. Total Environ.* **84**: 83-90 .
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* **72** : 248-254.
- Buckman, H.O and Brady, N.C.** (1960). The Nature and Properties of Soils, 6^e édition, The MacMillan Co., New York, NY. p567.
- Burrows, C. J and Muller, J. G.** (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* **98** : 1109-1152.
- Burtis, A.** (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. pp 28-36.

C

- Callahan, M.A., Slimak, M.W., Gabel, N.W., May, I.P., Fowler, C.F., Freed, J.R., Jennings, R.L., Durfee, R.L., Whitmore, B., Maestri, B., Mabey, W.R.,**

Références bibliographiques

- Holt, B.R., Gould, C.** (1979). Water-related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants, Vol. I: Introduction and Technical Background, Metals and Inorganics, Pesticides and PCBs, Report EPA-440/4-79-029a, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water and Waste Management, Washington, DC. pp 65-88.
- Cantin, P.A.** (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation. *Moss. New York: Dekker.* pp 519 - 531.
- Cartana, J and Arola, L.** (1992). Nickel-induced hyperglycemia: The role of insulin and glucagons. *Toxicology* **71**: 181-192.
- Cempel, M and Janicka, K.** (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol. Trace. Elem. Res.* **90 (1-3)**: 215–226.
- Chantal, B.** (2000). Toxicologie Clinique .5^{ème} édition. Medecine-sciences Flammarion. Paris .pp 625-627.
- Chen, C.Y., Wang, Y.F., Lin, Y.H., Yen, S.F.** (2003). Nickel-induced oxidative stress and effect of lymphocytes. *Arch. Toxicol.* **77(3)**: 123–130.
- CIRC.** (1990). (Centre international de recherche sur le cancer), «Chromium, Nickel and Welding», IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, CIRC, Lyon (France). Vol **49** pp 45-48.
- Comhair, S.A and Erzurum, S.C.** (2000). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. Physio.* **283**:246-255.
- Comhair, S.A and Erzurum, S.C.** (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**: 246 - 255.
- Condevaux, F., Guichard, J., Forichon, A., Aujoulat, M., Descotes, J.** (2001). Compared effects of morphine and nickel chloride on NK cell activity in vitro in rats and monkeys. *Appl. Toxicol.* **21(5)**: 431- 434.

Références bibliographiques

- Cotton, F.A and Wilkinson, G. (1988).Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text, Wiley-Interscience, (5^{ème} édition) New York, NY.pp 56-62.
- Cox, R.M and Hutchinson. T.C. (1981). «Environmental Factors Influencing the Rate of Spread of the Grass *Deschampsia Cespitosa* Invading Areas Around the Sudbury Nickel-copper Smelters». *Water Air Soil Pollut.* **16**: 83-106.
- Cowgill, U.M. (1976). «The Chemical Composition of Two Species of *Daphnia*, Their Algal Food and Their Environment». *Sci. Total Environ.* **6**: 79-102 .

D

- Darmono, D. (1990). «Uptake of Cadmium and Nickel in Banana Prawn (*Penaeus merguensis* de Man)». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **45**: 320-328 .
- Das, K.K and Dasgupta, S. (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol. Trace Elem. Res.* **73(2)**: 175–180.
- Das, K.K and Dasgupta, S. (2002). Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. *Environ. Health Perspect.* **110(9)** : 923-6.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. pp 281 - 351.
- Delaunay, A., Isnard, A. D., Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo.* **19** : 5157-5166.
- Denkhaus, E and Salnikow, K. (2002).Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit. Rev.Oncol. Hematol.* **42(1)**: 35–56.
- Deneke, S.M and Fanburg, B.L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am.Physiol.Lung Cell Mol. Physiol.* **257**: 163 - 173.
- Dhawan, D., Goel, A., Gautam, C.S. (1992).Effects of zinc intake on liver enzymes in carbontetrachloride induced liver injury. *Med. Sci. Res.* **20**: 55–56.

Références bibliographiques

- Dhawan, D and Goel, A.** (1996). Further evidence for zinc as a hepatoprotective agent in rat liver toxicity. *Exp. Mol. Pathol.* **63**: 110–117.
- Dieter, M.P., Jameson, C.W., Tucker, A.N., Luster, M.I., French, J.E., Hong, H.L., Boorman, G.A.** (1988). Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *Toxicol. Environ. Health* **24(3)**: 357–372.
- Dietz, F.** (1973). «The Enrichment of Heavy Metals in Submerged Plants», *Advances in Water Pollution Research: Proceedings of the Sixth International Conference Held in Jerusalem Pergamon Press, Oxford (Angleterre).* pp 53-62.
- Ditoro, D.M., Mahony, J.D., Krichgraber, P.R., O’Byrne, A.L., Pasquale, L.R.** (1986). «Effect of Nonreversibility, Particle Concentration and Ionic Strength on Heavy Metal Sorption». *Environ. Sci. Technol.* **20**: 55-61.
- Dogra, S., Khanna, A.K., Kaw, J.L.** (1999). Antibody forming cell response to nickel and nickel-coated fly ash in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **18(5)** : 333-337.
- Doll, R., Andersen, A., Cooper, W.C., Cosmatos, I., Cragle, D.L., Easton, D., Enterline, P., Goldberg, M. Metcalfe, L., Norseth., T. J., Peto, J.P., Rigaut, R., Roberts, S.K., Seilkop, H., Shannon, F., Speizer, F.W., Sunderman Jr., Thornhill, P., Warner, J.S., Wright, M.** (1990). «Report of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man». *Scand. Work Environ. Health* **16**:1-82.
- Dormer, R. L., Kerbey, A. L., McPherson, M., Manley, S., Ashcroft, S. J. H., Schofield, J. G., Randle, P. J.** (1973). The effect of nickel on secretory systems; Studies on the release of amylase, insulin and growth hormone. *Biochem.* **140**:135-140.
- Dostal, L.A., Hopfer, S.M., Lin S.M., Sunderman, FW. Jr.** (1989). Effects of nickel chloride on lactating rats and their suckling pups, and the transfer of nickel throughratmilk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101(2)** : 220-31.
- Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S.b., Chelvanayagam, G., Board, P.** (2001). The glutathione structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine

Références bibliographiques

receptor calcium release channel modulator. *Biol. Chem.***276**: 3319-3323.

E

-Ehara, Y and Yamaguchi, M. (1997). Zinc stimulates protein synthesis in the femoral-metaphyseal tissues of normal and skeletally unloaded rats. *Res. Exp. Med.* **196**: 363–372.

-EL-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Redwan, F.M.E. (2009). Ameliorating effect of curcumin of sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology* **47** : 249-254.

- Elman, GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Bioph.* **82**: 70-77.

-Eriksen, K.D.H., Petersen, T., Gray, J.S., Stenersen, J., Andersen, R.A. (1989). «Metal-binding in Polychaetes: Quantitative and Qualitative Studies of Five Species». *Mar. Environ. Res.* **28**: 167-171.

-Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* **13**: 341-390.

-Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B., Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction ? *Diabetes* **52**: 1-8.

F

-Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* **5** : 108-115.

-Fernandez-Canon, J.M and Penalva, M.A. (1998). Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *Biol. Chem.* **273**: 329-337.

Références bibliographiques

-Fernandez, E., Gustafson, A., Anderson, M., Hellman, B., Dencker, L. (2003). Cadmium induced changes in apoptic gene expression blocked by zinc supplementation. *Toxicol. Sci.* **10**: 85-99.

-Finco, D.R. (1997). Kidney function. In: Kamekeo, J.J., Harvey, J.W., Bruce, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic press, San Diego, California. pp 462-478.

-Flohe, L and Gunzler, W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase, methods Enzymol. **105** : 114-121.

-Forester, A.J. (1980). «Monitoring the Bioavailability of Toxic Metals in Acid-stressed Shield Lakes Using Pelecypod Molluscs (Clams, Mussels)», *Trace Substances in Environmental Health - XIV*, D.D. Hemphill (éd.), University of Missouri, Columbia, MI. pp 142-147.

-Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *Biol. Chem.* **272** : 18515-18517.

- Fukino, H., Hirai, M., Hsueh, Y.M., Moriyasu, S., Yamane, Y. (1986). Mechanism of protection by zinc against mercuric chloride toxicity in rats: effects of zinc and mercury on glutathione metabolism. *Toxicol. Environ. Health* **19**: 75-89.

G

-Gerard-Monnier, D and Chaudiere, J. (1996). Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol. Biol.* **44**: 77-85.

-Gerald, E., Berra, Y. M., Frapart. (2004). JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress. *Cell* **118**: 781-94.

-Gerald, M., Yaniv, G., Mehta-Grigoriou, F. (2005). Oxidative stress and angiogenesis: major role of AP-1. *Med. Sci.* **21**: 233-235.

-Gilbert, H. F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63** : 69-172.

Références bibliographiques

-**Gilman, J.P and Ruckerbauer, G.M.** (1962). «Metal Carcinogenesis: I. Observations on the Carcinogenicity of a Refinery Dust, Cobalt Oxide and Colloidal Thorium Dioxide», *Cancer Research* **22**: 152-157.

-**Giugliano, R and Millward, DJ.** (1987). The effects of severe zinc deficiency on protein turnover in muscle and thymus. *Br. Nutr.* **57**: 139-155.

-**Goutet, M., Ban, M., Binet, S.** (2000). Effects of nickel sulfate on pulmonary natural immunity in Wistar rats. *Toxicology* **145 (1)**: 15-26.

-**Grimsrud, P.A., Picklo, M.J., Griffin, SR., Bernlhor, T.J.** (2007). Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance; identification of adipocyte fatty acid binding protein as acellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell Proteomics* **6**: 624-637.

H

-**Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, WB.** (1974). Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol. Chem.* **249**: 7310-39.

-**Halliwell, B and Gutteridge, J.M.** (1990). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem.* **219**: 1-14.

-**Halliwell, B.** (1996). Free radicals in biochemistry and medicine. In *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, R. A. Meyers, ed. (Wiley-VCH, Weinheim, Germany). pp 330-337.

-**Halliwell, B.** (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie* **44**: 6-13.

-**Halliwell, B.** (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* **55**: 44-49.

-**Halstead, R.L., Finn, B.J., MacLean, A.J.** (1969). «Extractability of Nickel Added to Soils and its Concentration in Plants». *Can. Soil Sci.* **49**: 335-342.

Références bibliographiques

- Hansen, J.M., Zhang, H., Jones, D.P. (2006). Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2 and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* **40** : 138-145.
- Harber, L.T., Diamond, G.L., Zhao, Q., Erdreich, L., Dourson, M.L. (2000). Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **31**(2 Pt 1) : 231-41.
- Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A., Cochrum, K.C., Grodsky, G.M., Martin, D.W., Jr., Tyler, D.D. and Wallin, J.D. (1979). Review of physiological chemistry, 17th ed. Lange Medical Publications, Los Angeles, California, USA. Illustration XV. p702.
- Hartman, J. F., Dorgan, K., Woodson. (2001). Effects of long-term alpha-tocopherol supplementation on serum hormones in older men prostate. *Toxicol. Pharm.* **46**: 33-8.
- Haq, A.U., Bates, T.E., Soon, Y.K. (1980). «Comparison of Extractants for Plant-available Zinc, Cadmium, Nickel and Copper in Contaminated Soils». *Soil Sci. Soc. Am.* **44**: 772-777 .
- Herak-Kramberger, C.M., Brown, D., Sabolic, I. (1998). Cadmium inhibits vacuolar H⁺-ATPase and endocytosis in rat kidney cortex. *Kidney Int.* **53**:1713-1726.
- Ho, W. and Furst, A. (1973). Nickel excretion by rats following a single treatment. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **16** : 245-248.
- Hirano, S., Shimada, T., Osugi, J., Kodama, N., Suzuki, K.T. (1994). Pulmonary clearance and inflammatory potency of intratracheally instilled or acutely inhaled nickel sulfate in rats. *Arch. Toxicol.* **68**(9) : 548-54.
- Hogiruchi, H., Oguma, E., Nomato, S., Ageo, Y., Ikeda, K. and Kayama, F. (2004). Acute exposure to cobalt induces transient methemoglobinemia in rats. *Toxicology letters* **151**:459-466.
- Houlot, R. (1984). Techniques d'histologie et de cytopathologie. Ed Maloine. pp 225-227.

Références bibliographiques

- Horiguchi, H., Sato, M., Konno, N., Fukushima, M.** (1996). Long term cadmium exposure induces anaemia in rats through hypoinduction of erythroprotein in the kidney. *Arch.Toxicol.***71** :11-19.
- Hutchinson, T.C., Fedorenko, A., Fitchko, F., Kuja, A., VanLoon, J., Lichwa, J.** (1976). «Movement and Compartmentation of Nickel and Copper in Aquatic Ecosystems», *Environmental Biogeochemistry: Metals Transfer and Ecological Mass Balances, Volume 2*, J.O. Nriagu (éd.), Ann Arbor Science Publishers mc. Ann Arbor, MI. pp 565-585.
- Hutchinson, T.C., Freedman, B., Whitby, L.** (1982). «Le nickel dans les sols et la végétation du Canada», Effets du nickel sur l'environnement canadien, rapport CNRC n°18569, Conseil national de recherches du Canada, Comité associé du CNRC sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement. pp 119-157.
- Hutchinson, T.C and Havas, M.** (1986). «Recovery of Previously Acidified Lakes Near Coniston, Canada Following Reduction in Atmospheric Sulphur and Metal Emissions». *Water Air Soil Pollut.* **28**: 319-333.
- I
- Iavicoli, S.** (2003). Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol. In. Vitro***17 (5-6)** : 603-607.
- Imlay, J. A., Chin, S.M., Linn, S.** (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240** : 640-642.
- Imlay, J. A and Linn, S.** (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240** : 1302-1309.
- Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS).** (2006). Fiche des données toxicologique et environnementales des substances chimiques.**22** : 7-8.
- Iskan, M., Coban, T., Eke, B. C.** (1994). Differential combined effect of cadmium and nickel on hepatic and renal glutathione S-transferases of the guinea pig. *Environ. Health perspect.* **102**: 69-72.

Références bibliographiques

-Iskan, M., Ada, A.O., Coban, T., Kapucuoglu, N., Aydin, A., Isimer, A. (2002). Combined effects of cadmium and nickel on testicular xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Biol.Trace Elem. Research* **89 (2)** : 177-90.

J

-Jollow, D.J. Mitchell, J.R., Zampaglione, N., Gillette, J.R. (1984). Bromobenzene induced liver necrosis: Protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* **11**: 151-154.

K

-Kabata-Pendias, A and Pendias, H. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, FL. (2^{ème} édition, 1992). pp 315-322.

-Kaplan, A. (1984). Bilirubin. Clin.Chem.Toronto.Princeton. pp 1238-1241.

-Kaplan, A. (1984). Glucose. Clin.Chem.Toronto.Princeton. pp 1032-1036.

-Kaplan, A. (1984). Triglycerides. Clin.Chem.Toronto.Princeton. p 437.

-Kaplan, A. (1984). Triglycerides. Clin.Chem.Toronto.Princeton. p 437.

-Kaplan, A. (1984). Urea. Clin.Chem.Toronto.Princeton. pp 1257-1260.

-Kasprzak, K.S., Quander, R.V., Poirier, L.A. (1985). Effects of calcium and magnesium salts on nickel subsulfide carcinogenicity in Fischer rats. *Carcinogenesis* **6(8)** : 1161-66.

-Kasprzak, K.S and Waalkes, M.P. (1986). The role of calcium, magnesium, and zinc in carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **206** : 497-515.

-Kasprzak, K.S., Waalkes, M.P., Poirier, L.A. (1987). Effects of essential divalent metals on carcinogenicity and metabolism of nickel and cadmium. *Bio.Tr. Elem.* **13** : 253-273.

-Kasprzak, K.S. Ward, J.M., Poirier, L.A., Reichardt, D.A., Denn, A.C., Reynolds, C.W. (1987). Nickel--magnesium interactions in carcinogenesis: dose effects and involvement of natural killer cells. *Carcinogenesis* **8(7)** : 1005-1011.

Références bibliographiques

- Kasprzak, K.S.** (1997). Effects of calcium, magnesium, zinc and iron on nickel carcinogenesis versus enhancement. In: Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic potential of heavy metals related to human environment. *Bio.Tr.Elem.***26** : 73-92.
- Kasprzak, K.S., Sunderman, FW.Jr., Salnikow, K.** (2003). Nickel carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533(1-2)** : 67-97.
- Kechrid, Z., Dahdouh, F., Djabar, M.R., Bouzerna, N.** (2006). Combined effect of water contamination with cobalt albino(Wistar) rats. *Environ.Health Sci.Eng.***3(1)** :65-69.
- Kirsh, R.B., Hayes, S.T., Mayne.** (2006). Supplemental and dietary vitamin E, beta-carotene, and vitamin C intakes and prostate cancer risk. *Natl. Cancer Inst.* **98**: 245-254.
- Knight, T.R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A., Jaeschke, H.** (2001). Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury:role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol. Sci.* **62**:212-220.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A.** (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters* **416**: 15-18.
- Kostic,M.M.,Ognjanovic,B.,Dimitrijevic,S.,Zikic,R.V.,Stajnosic,G.L., Zivkovic,R.V.**(1993). Cadmium –induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats : *in vivo* effects. *Eur.J.Haematol.***51** : 86-92.
- Krantzberg, G and Stokes, P.M.** (1990). «Metal Concentrations and Tissue Distribution in the Larvae of *Chironomus* with Reference to X-ray Microprobe Analysis», *Arch.Environ. Contam. Toxicol.* **19**: 84-93 .
- Kusal, K. D., Swastika, N. D., Shakuptala, D.** (2001). The influence of ascorbic acid on nickel induced hepatic lipid peroxidation in rats. *Basic Clin. Physiol. Pharmac.* **12**: 187-195.

L

- Laight, D.W., Carrier, M.J., Anggards, E.E.** (2000). Antioxidants, diabetes and endothelial function. *Cardiovasc. Research* **47**: 457-464.
- Lander, H. M.** (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb.* **11** : 118-124.
- Lauwerys, R.** (2003). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. 4^{ème} édition. pp 155 – 158.
- Lee, J., Son, H., Kim, M.** (2006). Attenuation of ischaemia-reperfusion injury by ascorbic acid in the canine renal transplantation. *Journal of Veterinary Science* **7(4)**: 375 - 379.
- Lide, D.R.** (1992). (éd.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 73^e édition, CRC Press, Boca Raton, FL. pp 74-78.
- Loewen, P. C., Carpena, X., Rovira, C., Ivancich, A., Perez-Luque, R., Haas, R., Odenbreit, S., Nicholls, P., Fita, I.** (2004). Structure of *Helicobacter pylori* catalase, with and without formic acid bound, at 1.6 Å resolution. *Biochemistry* **43** : 3089-3103.
- Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D., Niviere, V.** (2000). Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *Biol. Chem.* **275** : 115-121.

M

- Madhu, C.G and Devi, DB.** (2000). Protective antioxidant effect of vitamins C and E in streptozotocin induced diabetic rats. *Ind.Exp. Biol.* **38** : 101 - 104.
- Mann, H., Fyfe, W.S., Kerrick, R.** (1988). «The Chemical Content of Algae and Waters: Bioconcentration». *Toxic. Assess* **3**: 1-16 .

Références bibliographiques

- Mathis, B.J and Cummings, T.F.** (1973). «Selected Metals in Sediments, Water, and Biota in the Illinois River». *Water Pollut. Control Fed.* **45**: 1573-1583 .
- Mathur, A.K., Datta, K.K., Tandon, S.K., Dikshith, TS.** (1977). Effect of nickel sulphate on male rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **17 (2)**: 241-248.
- Meister, A and Anderson, M.E.** (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52** : 711 - 760.
- Merchant, M.A and Mod, D.N.** (2004). Acute and chronic effects of aspirin on hematological parameters and hepatic ferritin expression in mice. *Indian Pharmacol.* **36 (4)** : 226-230.
- Milton, Prabua, S., Shagirthab, K., Renugadevia, J.** (2011). Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition* **1** : 1-7.
- Misra, M., Athar, M., Hasan, S.K., Srivastava, R.C.** (1988). Alleviation of nickel-induced biochemical alterations by chelating agents. *Fundamental and Applied Toxicology* **11**: 285-292.
- Misra, M., North, S.L., Rodriguez, R.Z., Kasprzak, K.S.** (1991). Nickel – induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxydant defense systems. *Toxicol. Letters* **58** : 121- 133.
- Mohandas, J.** (2010). Differential distribution of glutathione and glutathione related enzymes in rabbit kidneys: possible implications in analgesic neuropathy. *Cancer Research* **44**: 5086-5091.
- Mudroch, A.** (1980). «Cycling of Nickel in Freshwater Marshes», Nickel in the Environment, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY. pp 275-282.
- Mumtaz, I., Ahmet, O., Ada Tulay C., Nilgun, K., Ahmet Aydin and Askin, I.** (2002). Combined effects of cadmium and nickel on testicular xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Biol.Trace Elem. Research* **89**: 177-190.

Références bibliographiques

-Murry, R. (1984). Aspartate aminotransferase. Clin.Chem.Toronto.Princeton.pp 1112-1116.

-Murry, R.L. (1984). Creatinine. Clin.Chem.Toronto.Princeton.pp 1261-1266.

N

-Navarro, C.M., Montilla, P.M., Martin, A., Jinenez, J., Utrilla, P.M. (1993). Free radicals scavenger and antitherapato toxic activity of rosmarius. *Plant. Med.* **59** : 312-314.

-Nemmiche, D., Chabane, S., Guiraud, P. (2007). Role of alpha-tocopherol in cadmium induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chem. Biol. Interact.* **170**: 221-30.

-Neuzil, J and Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* **331 (3)** : 281 - 284.

-Nieboer, E., Tom, R.T., Sanford, W.E. (1988). «Nickel Metabolism in Man and Animals», *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel et A. Sigel (éd.), Marcel Dekker Inc., New York, NY. **23** : 91-121.

-Nieboer, E. (1992). Communication personnelle, McMaster University, Hamilton (Ont.).

-Nielsen, F.H., Shuler, T.R., Mcleod, T.G., Zimmerman, T.J. (1984). Nickel influences iron metabolism through physiologic, pharmacologic and toxicologic mechanism in the rat. *Nutr.* **114**: 1280-88.

-Niviere, V and Fontecave, M. (2004). Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *Biol. Inorg. Chem.* **9**:119-123.

Novelli, J and Barbosa, L. L., (1998). Differential Combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissues of rats. *Environ. Pollution* **103**: 295-300.

-Novey, H.S., Habib, M., Wells, I.D. (1983). «Asthma and IgE Antibodies Induced by Chromium and Nickel Salts». *Allergy Clin. Immunol.* **72**: 407-412.

O

- **Omonkhua, A. A and Obi, F. O.** (2008). Biochemical Evaluation of The Effects of Vitamin C in Rats Exposed to Sub-Chronic Low Doses of Cadmium. *The Internet Journal of Toxicology* **5(1)** : 1-2.

-**Ottolenghi, A.D., Haseman, J.K., Payne, W.W., Falk, H.L., MacFarland, H.N.** (1974). «Inhalation Studies of Nickel Sulfide in Pulmonary Carcinogenesis of Rats». *Natl. Cancer Inst.* **54**: 1165-1172.

P

-**Paolisso, G., Sgambato, S., Pezza, G., Passariello, N., Varricchio, M.D., Onof, F.** (1990). Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged. NIDDM subjects. *Diabetes Care* **12** : 265-269.

-**Paternain, J.L., Domingo, J.L., Corbella, J.** (1988). Developmental toxicity of cobalt in the rat. *Toxicol. Environ. Health* **24(2)** : 193-200.

-**Pesce, A.** (1984). LDH. Clin. Chem. Toronto. Princeton. pp 1124-1127.

-**Pham, D and Plakogiannis, R.** (2005). Vitamin E supplementation in cardiovascular disease and cancer prevention: Part 1. *Ann. Pharmacother.* **39**: 1870-8.

-**Pouyssegur, S and Mechta-Grigoriou, F.** (2006). Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* **387**: 1337-46.

-**Puchelet, H.** (1992). Environmental inorganic geochemistry of the continental crust. In: Hutzinger, Part F.O. (Ed.). The Handbook of Environmental Chemistry, vol. 1. Springer-Verlag Berlin. pp 88-94

-**Purvi, S., Singh, N., Shahi, V.S., Garg, M.L., Dhawan, D.K.** (2003). Hepatotoxic effects of differential doses of nickel – a biochemical and elemental profile study. *Vinbull.* **8**: 589–593.

R

- Rana, S.V., Rekha, S., Seema, V.** (1996). Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. *Indian Journal of Experimental Biology* **34** : 177-179.
- Ravi, K., Ramachandran, B., Subramanian, S.** (2004). Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences* **75** : 2717- 2731.
- Rayssiger, Y., Noe, L., Etienne, J.** (1991). Effect of magnesium deficiency on post-heparin lipase activity and tissue lipoprotein lipase in the rat. *Lipids* **26** :182-186.
- Rencz, A.N and Shilts, W.W.** (1980). «Nickel in Soils and Vegetation of Glaciated Terrains», *Nickel in the Environment*, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY. pp 151-188.
- Renuka, B., Rajurkar, Z.H., Govind, T.G.** (2003). Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science* **85**: 1355-1360.
- Richter, R.O and Theis, T.L.** (1980). «Nickel Speciation in a Soil/water System», *Nickel in the Environment*, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY. pp189- 202.
- Richter, C and Schweizer, M.** (1997). Oxidative stress in mitochondria. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J. G. Scandalios, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 169-200.
- Rosalki, S.** (1993). *ALP.Clin.Chem.***39 (4):** 648-652.

S

- Salnikow, K and Kasprzak, K.S.** (2005). Ascorbate depletion: a critical step in nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **113 (5):** 577-584.

Références bibliographiques

- Sameeh, A., Mansour Abdel-Tawab., Mossa, H. (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and physiology* **93**: 34-39.
- Scandalios, G. (1978^a). (Cold Spring Harbor Laboratory Press) Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201** : 875-880.
- Scandalios, J. G. (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radic. Biol. Med.* **23** : 471-472.
- Scandalios, J. G. (2004). Genomic responses to oxidative stress. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, R. A. Meyers, ed. (Wiley-VCH, Weinheim, Germany). pp 489-512.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. Med. Biol. Research* **38** : 995-1014.
- Scansetti, G., Botta, G. C., Spinelli, P., Rviglione, L., Pouzetti, C. (1994). Absorption and excretion of cobalt in the hard metal industry. *Sci. Total Environ.* **150 (1-3)**: 141-144.
- Schmidt, J.A and Andren, A.W. (1980). «The Atmospheric Chemistry of Nickel», *Nickel in the Environment*, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY. pp 93-136.
- Serafini, M., Laranjinha, J.A., Almeida, L.M., Maiani, G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Nutr. Biochem.* **11**: 585-590.
- Sevra, J., Vyscocol, A., Fiala, Z.,Cizkova, M. (1995). Distribution of nickel in body fluids and organs of rats chronically exposed to nickel sulfate. *Human and Experimental Toxicology* **14** : 955-958.
- Shi, Z.C. (1986). Acute nickel carbonyl poisoning : a report of 179 cases.*Br.Ind.Med.***43 (6)** :422-424.

Références bibliographiques

- **Sidhu, P., Singh, N., Shahi, J. S., Garg, M.L., Dhawan, D. K.** (2003). Hepatotoxic effects of differential doses of nickel—a biochemical and elemental profile study. *Vinbull.* **8**: 589–593.
- **Sidhu, P., Singh, N., Shahi, J. S., Garg, M. L., Dhawan, D. K.** (2006). Zinc protects rat liver histo-architecture from determined effects of nickel. *Bio.Metals* **19**: 301-313.
- Simons, J.E., Yang, R.S.H., Berman, E.** (1995). Evaluation of the mixtures containing organic metals advantages and deasvantages of the use of red world complex mixtures. *Environ. Health.Perspect.***103** : 67-71.
- Sirover, MA and Loeb, L.A.** (1976). Infidelitly of DNA synthesis in vitro; screening for potential metal mutagens carcinogens. *Science* **194**: 1434–1436.
- Sies, H.** (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application . *The American Journal of Medecine* **91**: 31S 38S.
- Smith, M.K., George, E.L., Stober, J.A., Feng, H.A., Kimmel, G.L.** (1993). «Perinatal Toxicity Associated with Nickel Chloride Exposure». *Environ. Research* **61**: 200-211.
- Solomons, N.W., Viteri, F., Shuler, T.R., Nielsen.** (1982). Bioavaibility of nickel in man effects of foods and chemically defined dieatry constituents on the absorption of inorganic nickel. *Nutr.* **112 (1)** : 39-50.
- Spiegelberg, Th., Kordel, W., Hochrainer, D.** (1984). «Effects of NiO Inhalation on Alveolar Macrophages and the Humoral Immune Systems of Rats». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **8**: 516-525.
- Stamler, J.S and Slivka, A.** (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr. Rev.* **54** : 1 - 30.
- Stedman, D.H.J and Hikade, D.A.** (1980). «The Rate of Decay of Traces of Nickel Carbonyl in Air», Nickel Toxicology, Proceedings of the Second International Conference on Nickel Toxicology, Swansea, September 1980, S.S. Brown and F.W. Sunderman Jr. (éd.), Academic Press, Londres, New York. pp 183-186.

Références bibliographiques

- Steinsberger, S.C., DeWees, W.G., Bostian, H.E., Knoll, J.E., Crumpler, E.P., Midgett, M.R., Zatka, V.J., Warner, J.S. (1994). «Development of Stationary Source Emission Measurement Methods of Hexavalent Chromium and Nickel Speciation for Sewage Sludge Incinerators», Air Waste Management Association, 85th Annual Meeting Exhibit, June 21 to 26, 1992, Kansas City, MI, Paper 92-99.04. p p 1-13.
- Stokes, P.M. (1975). «Uptake and Accumulation of Copper and Nickel by Metal-tolerant Strains of *Scenedesmus*». *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **19**: 2128-2137.
- Stokes, P.M. (1981). «Multiple Metal Tolerance in Copper-tolerant Green Algae». *Plant. Nutrit.* **3**: 667-678.
- Stokes, P.M. (1988). «Nickel in Aquatic Systems», Metal Ions in Biological Systems, H. Sigel et A. Sigel (éd.), Marcel Dekker mc. New York, NY. pp 31-46.
- Sunderman, FW and Oskarsson, A. (1988). Nickel, Metals and their Compounds in the Environment, E. Merian (éd.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (R.F.A.). pp 1-19.
- Sunderman, F.W., Hopfer, S.M., Sweeney, K.R., Marcus, A.H., Most, B.M., Creason, J. (1989). «Nickel Absorption and Kinetics in Human Volunteers». *Proc. Soc.Exp. Biol. Med.* **191**: 5-11.
- Sunderman, FW., Hopfer, S.M., Sweeney, K.R., Marcus, A.H., Most, B.M., Creason, J. (2001). Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Biol. Chem.* **276(25)** : 222-230.

T

- Tandon, A., Nagpaul, J.P., Bandhu, H., Singh, N., Dhawan, D. (1999). Effect of lithium on hepatic and serum elemental status under different dietary protein regimens. *Biol. Trace. Elem. Res.* **68**: 51-62.
- Thevenod, F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron. Physiol.* **93** :87-93.

Références bibliographiques

-Tkeshelashvili, L.K., Tsakadze, K.Z., Khulissairio, V. (1989). Effect of some nickel compounds on red blood cell characteristics. *Biol.Trace.Elem.Research* **21**:337-342.

V

-Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izalovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico –biological interactions* **160** :1-40.

-Vest, R.S., Gonzales, L.L., Permann, S.A., Spencer, E., Hamsen, L.D., Judd, A.M., Bell, J.D. (2004). Divalent cations increase lipid order in erythrocytes and susceptibility to secretory phospholipids A2. *Biophys.* **86** : 2251-2260.

-Viala, A. (1998). *Eléments de Toxicologie*. Editions, Tec & Doc. pp 513- 453.

-Virtamo, P., Pietinen, J., Huttunen, K. (2003). Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up. *Jama*. **290**: 476-85.

W

-Waalkes, M.P., Kasprzak, K.S., Oshima, M., Poirier, L.A. (1985). Protective effects of zinc acetate towards the toxicity of nickelous acetate in rats. *Toxicology* **39**: 29-41.

-Waksvik, H and Boysen, M. (1982). «Cytogenetic Analyses of Lymphocytes from Workers in a Nickel Refinery». *Mutat. Research* **103**: 185-190.

-Waksvik, H., Boysen, M., Hogelveit, A.C. (1984) «Increased Incidence of Chromosomal Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Retired Nickel Workers». *Carcinogenesis* **5**: 1525-1527.

-Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten.* **44**: 381-386.

Références bibliographiques

- Weischer, C.H., Kordel, W., Hochrainer, D. (1980). Effects of NiCl₂ and NiO in Wistar after oral uptake and inhalation exposure respectively. *Zentralbl. Bacteriol.Microbiol.Hyg.* **171(4)**: 336-331.
- Wolin, M.S. (1996).Reactive oxygen species and vacular signal transduction mechanisms.*Microcirculation* **3** :1-17.
- Wolin, M.S., Ahmed, M., Gupte, S.A. (2005).Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms : basic concepts, current conteroversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *Am. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **289** : 159-173.
- Wozniak, K and Blasiak, J. (2002). Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride.*Mutat .Research* **514(1-2)** : 233-243.
- Wren, C.D. (1984). «Distribution of Metals in Tissues of Beaver, Raccoon and Otter from Ontario, Canada». *Sci. Total Environ.* **34**:177-184.
- Wren, C.D., Fisher, K.L., Stokes, P.M. (1988). «Levels of Lead, Cadmium and Other Elements in Mink and Otter from Ontario, Canada». *Environ. Pollut.* **52**: 193-202.
- Wu, H.M., Willett, W.C., Chan, J. M. (2002). A prospective study on supplemental vitamin E intake and risk of colon cancer in women and men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**: 1298-304.

Y

- Yao, J.Z., Liu, J.F., Zhang, W.N., Zhou, Y.J., Zhu, J., Lu, J.G., Wang, X.Y. (2001). Synthesis, preliminary antigastrelcosis activity and the protective effect on acute liver injury of zinc chloride E4. *Yao Xue Xue Bao.* **36(3)**:188–191.
- Yamamoto, M., Matsuda, M., Okuoka. (2007). Antioxidation property of vitamin E coated polysulfone dialysis membrane and recovery of oxidized vitamin E by vitamin C treatment. *Membrane Sci.* **302**: 115-8.

Z

-Zheng, M and Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* **59** :1-6.

-Zhihua, J., Elias, S.J.A., Ying, M., Linda, J., Jinming, S., Siqi, Z., Shujun, L., Ruiying, W., Tianzhu, Z., Ganglin, Y., Junqiu, L., Jiacong, S., Guimin, L. (2004). Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. *Biochem. Bioph. Research Commun.* **321**: 94-101

PUBLICATION



Combined protective effect of zinc and vitamin C on nickel-induced oxidative liver injury in rats

¹Djemli Samir, ²Zine Kechrid and ¹Mohamed Reda Djabar

¹Laboratory of Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University University, Annaba. Algeria

²Laboratory of Biochemistry and Microbiology Application, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba. Algeria

ABSTRACT

Nickel is a very harmful environmental pollutant that transfers between various levels of the food chain. Therefore, this study was designed to determine the protective effect of zinc and vitamin C on nickel induced oxidative liver injury in albino rats. Forty male rats were divided into five groups of eight animals each. The first group used as controls and four experimental groups received either Ni (800 mg/l Ni as NiSO₄ 6H₂O, Ni + Zn (800 mg/l Ni + 227 mg/l Zn as ZnSO₄ 7H₂O), Ni + vit C (800 mg/l Ni + 1 g/l vit C) or Ni + Zn + vit C (800mg/l Ni + 227 mg/l Zn + 1 g/l vit C) in their drinking water. The treatment of all groups was lasted for six consecutive weeks. Changes in liver dysfunction parameters represented by glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase and alkaline phosphatase, serum glucose, serum total protein and serum albumin were estimated. Liver glutathione level, catalase, and glutathione peroxidase activities were also determined in liver as indicators of oxidative damage. Exposure of rats to nickel caused a significant decrease in body weight and an increase in liver weight compared to the controls. Nickel treatment was also led to high glucose concentration and produced oxidative liver injury characterized by increasing GPT, GOT and ALP activities. Meanwhile nickel administration decreased serum total protein and albumin in animals. In addition liver glutathione level, catalase and GSH-Px activities were diminished. With zinc or vitamin C administration during intoxication of nickel, corrective effects on Ni-induced oxidative stress in the liver have been observed, while zinc and vitamin C together assured a more efficient protection of the organ against the noticed oxidative stress.

Keywords: nickel, zinc; vitamin C, GOT, GPT, ALP, oxidative stress.

INTRODUCTION

Heavy metal hazards on human and animal health are increasing and represent global environmental problems [1, 2]. Nickel is rare earth metal identified in the 18th century. Due to its unique physical and chemical proprieties, metallic nickel and its compounds are widely used in modern industry [3]. Nickel is a ubiquitous element that occurs in rocks, soil, plants and water [4]. Nickel breaks down the immunity by affecting the T-cell system and suppresses the activity of natural killer cells in rats and mice [5, 6]. Nickel was also found to be responsible on many sexual disorders [7]. After entering the body, nickel penetrates all organs and accumulates primarily in bone, liver and kidney [8] and excreted through bile and urine [9]. Liver is the primary target for environmental and occupational toxicity and the major site for detoxification. Nickel induced severe liver and kidney damage by altering several marker enzymes and ascorbate-cholesterol metabolism. One of the harmful effects of nickel action in the body is to induce formation of ROS and increase lipid peroxidation in the cells [10]. Free radicals and intermediate products of lipid peroxidation are capable of damaging the integrity and altering the function of biomembrane, which can lead to the development of many pathological processes [11]. Zinc is a fundamental element of more 200 metalloenzymes, and affected the

conformity, stability and activity of many of them [12]. Moreover, zinc is ubiquitous in sub-cellular metabolism and is an essential component of catalytic sites of at least one enzyme in every enzyme classification [13]. It is an essential nutriment, it can protect against oxidative damage caused by some xenobiotics [14]. Zinc also plays an important role in regulation of cellular glutathione that is vital to cellular antioxidant defence [15]. Although many studies have evaluated the role of oxidative stress and ameliorative effect of antioxidant vitamins like vitamin C that may be involved, via antioxidant mechanisms, in reducing stress induced damages to body cells and tissues. Vitamin C has been known to protect against lipid peroxidation of cytomemenbranes [16]. It is a major component of the body antioxidant system [17] and it has been shown to poses an excellent biological chain-breaking antioxidants characteristics that protects cell and tissues from lipoperoxidation damage induced by free radicals [18]. The protective effect of Zn or vitamin C on hepatic oxidative stress induced by nickel; they found that Zn or vitamin C can reduce induced hepatotoxicity. However, as it appears through the available published literature, the joint effect of the two compounds on nickel caused oxidative stress in the liver is not yet studied. Therefore, this study was undertaken to investigate whether the association of zinc and vitamin C increases the proactive effect of zinc or vitamin C alone against nickel-induced oxidative liver injury in rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Zinc sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), nickel sulphate ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), vitamin C, 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid (DTNB) and reduced glutathione were purchased from sigma Chemical Co (St Louis, France) and all other chemicals used in the experiment were of analytical grade.

Animals

Male albino (Wistar) rats with a body weight of 150-180 g were obtained from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria). Animals were acclimated for two weeks under the same laboratory conditions of photoperiod (12h light/12 h dark) with a relative humidity 70% and room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Food (Standard diet, supplemented by the ONAB, EL-Harouch, Algeria) and water available *ad-libitum*.

Experimental design

Animals were randomly divided into five groups of eight animals each. A control group of animals received tap water and four experimental groups received either Ni (800mg/l Ni as $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Ni + Zn (800 mg/l Ni + 227 mg/l Zn as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Ni + vit C (800 mg/l Ni + 1g/l Vit C) or Ni + Zn + vit C (800 mg/l Ni + 227 mg/l Zn + 1 g/l vit C) in their drinking water. We chose to administer the tree elements by oral rout because it is the main mode of exposure to nickel in human and animals. The doses of nickel, zinc and the period of treatment were selected on the basis of previous studies [19], whereas vitamin C dose was also chosen on the clinical application and on results from previous studies [20]. The experimental procedures were carried out according to the National Institute of Health Guide-lines for Animal Care and approved by the Ethics Committee of our Institution. The treatments of rats continued for a period of six weeks. At the end of the experiment, total body weights were recorded and animals were sacrificed by decapitation without anesthesia to avoid animals stress. At the time of sacrifice, blood was transferred into ice cold centrifuged tubes. Tubes were then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and serum was used for glucose, total protein, albumin, GOT, GPT and alkaline phosphatase assays. Livers were removed immediately and one part was processed immediately for assaying glutathione and antioxidant enzymes activities. The other part was used for light microscopic studies.

Analytical methods

Determination of biochemical parameters

Glucose was measured in 10 μl samples of serum by the glucose oxidase method, using spectrophotometer (Jenway 6505, Jenway LTD, UK) and the kit constitute of phosphate buffer containing the enzymes (GOD, POD) and D-glucose (Spinreact, Spain, ref; 41011). However, GOT, GPT, alkaline phosphatase activities were determined with commercial kits from Spinreact, Spain, refs: GOT-1001161, GPT-1001171 and ALP-1001131 respectively. Total protein and albumin concentrations were also measured utilizing commercial kits (Spinreact, Spain, refs: total proteins-1001291 and albumin-1001020).

Tissue preparation

About 1 gram of liver was homogenized in 2 ml of buffer solution of phosphate buffer saline 1:2 (w/v; 1 g tissue with 2 ml TBS, pH 7.4), Homogenates were centrifuged at $10000 \times g$ for 15 minutes at 4°C , and the resultant supernatant was used for the determination of reduced glutathione and protein levels in one hand and the estimation of catalase and GSH-Px activities in the other hand.

Estimation of reduced glutathione level (GSH)

Liver GSH content was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman [21] modified by Jollow et al [22], based on the development of yellow colour when DTNB (5, 5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) is added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 08 ml of liver supernatant was added to 0.3 ml of 0.25 % sulfosalicylic acid, and then tubes were centrifuged at 2500 x g for 15 minutes. Supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01 M DTNB and 1 ml phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. Finally, total GSH content was expressed as n mol GSH/mg protein.

Determination of Glutathione peroxidase (GSH-Px)

Glutathione peroxidase (GSH-Px) (E.C. 1.1.1.1.9) activity was measured by the procedure of Floche and Gunzler [23]. Supernatant obtained after centrifuging 5% liver homogenate at 15000 x g for 10 min followed by 10.000 x g for 30 min at 4 C° was used for GSH-Px assay. 1 ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of GSH (2mM), 0.1 ml of sodium azide (10mM), 0.1 H₂O₂ (1mM) and 0.3 ml of liver supernatant. After incubation at 37 C° for 15 min, the reaction was terminated by addition of 0.5 ml 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500 x g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2 ml of phosphate buffer (0.1 M pH 7.4) and 0.7 ml of DTNB (0.4 mg/ml) were added to 0.1 ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Assay of catalase activity

The activity of catalase was determined according to the method of Aebi [24]. The reaction mixture (1 ml) that contained 0.78 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), 0.2 ml of liver supernatant, and 0.02 ml of H₂O₂ (0.5 M) was prepared. The reaction was started by adding H₂O₂ and decomposition was monitored by following the decrease in Absorbance at 240 nm for 1 min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹.

Protein determination

The protein content of tissues samples were measured by the method of Bradford [25] using bovine serum albumin as a standard.

Histological studies

For histological examination, livers was dissected and immediately fixed in bouin solution for 24 h, processed by using a graded ethanol series, and then embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5µm thick slices and stained with hematoxylin and eosin [26] for light microscopic examination. The sections were then viewed and photographed.

Statistical analysis

Data are given as means ± SEM. Statistical significance of the results obtained for various comparisons was estimated by applying one way analysis of variance (ANOVA) followed by Protected Least Significant Difference Fisher's test (PLSD Fisher) and the level of significance was set at p < 0.05.

RESULTS

Effect of treatment on body, absolute and relative liver weights

In this experiment, the body, absolute and relative liver weights of rats subjected to different treatments were shown in table I. In Ni-treated animals, the results showed obviously significant decrease (p < 0.001) in body weight gain as compared to the control group (- 46%). In addition, a significant increase of Ni-treated group in absolute and relative weights was noticed (p < 0.001). However, zinc, vitamin C and vitamin C + Zn supplies, the body weight gain became significantly greater (p < 0.001) than in rats exposed to nickel and the absolute and relative liver weight were decreased (p < 0.001).

Effects of treatment on serum biochemical parameters

Treatment with Ni caused significant increase of serum glucose, GOT, GPT and ALP compared to the control group (p < 0.001). Meanwhile the concentration of serum total protein and serum albumin were diminished (p < 0.001). Whereas, the administration of zinc or vitamin C either alone or together with nickel (Zn + Ni, vit C + Ni and vit C + Zn + Ni) produced a recovery in the above mentioned biochemical parameters p < 0.05 (Ni-Zn), p < 0.05 (Ni-vit C) and p < 0.001 (Ni-Zn-vit C) for total protein and p < 0.01 (Ni-Zn), p < 0.01 (Ni-vit C) and p < 0.001 (Ni-Zn-vit C) for albumin (table II).

Effects of treatment on hepatic oxidative stress parameters

The exposure to Ni produced significant adverse effect on the liver redox status, which indicated by a significant reduction ($p < 0.001$) in reduced glutathione level (- 49%), catalase (- 42%) and GSH-Px (- 55%) activities (figure 1). The simultaneous treatment with zinc or vitamin C separately or in association with nickel ameliorated these changes.

Table 1. Body weight gain, absolute and relative liver weights of control male rats, treated with Ni, Ni-Zn, Ni-vit C and Ni-Zn-vit C after 6 weeks of treatment.

Parameters	Experimental groups									
	Control		Ni		Ni -Zn		Ni-Vit C		Ni-Zn-Vit C	
	(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)	
	Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM	
Initial body weight (g)	158.2	9.8	133.5	5.5	147.1	13.5	147.2	10.1	163.4	7.3
Body weight gain (g)	202.2	2.5	109.2***	4.8	162.8*** ^c	6.6	165.6*** ^c	5.2	182.3*** ^c	3.9
Absolute liver weight (g)	9.1	0.36	12.1***	0.25	9.2 ^c	0.43	8.9 ^c	0.24	86 ^c	0.29
Relative liver weight (g)	2.66	0.06	3.61***	0.08	2.72 ^c	0.03	2.74 ^c	0.03	2.60 ^c	0.06

Statistically significant differences from control: *** $p < 0.001$; from Ni: ^c $p < 0.001$; from Ni-Zn-vit C: ^{μ} $p < 0.05$, ^{β} $p < 0.01$. Values are given as mean $\pm$ SEM, n = number of animals.

Table 2. Changes of biochemical parameters of control male rats, treated with Ni, Ni-Zn, Ni-vit C and Ni-Zn-vit C after 6 weeks of treatment.

Parameters	Experimental groups									
	Control		Ni		Ni -Zn		Ni -Vit C		Ni- Zn-Vit C	
	(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)		(n = 8)	
	Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM		Mean $\pm$ SEM	
Glucose (mg/100ml)	107.5	2.43	192.8***	2.51	159.9*** ^c	2.59	146.6*** ^c	5.6	138.8* ^c	5.27
Total protein (g/100ml)	8.56	0.21	6.01***	0.18	7.32*** ^a	0.35	7.16*** ^a	0.34	8.51 ^c	0.13
Albumin (g/100ml)	4.75	0.04	3.08***	0.20	4.08*** ^b	0.08	4.4*** ^c	0.09	4.72 ^c	0.09
GOT (U/L)	74.1	2.82	135.1***	2.21	102.6*** ^c	2.85	95.6*** ^c	2.19	76.6 ^c	2.25
GPT (U/L)	37.3	2.27	72.2***	2.23	53.62*** ^c	2.11	55.5*** ^c	2.44	46.4* ^c	1.63
ALP (U/L)	109.7	2.5	292.2***	2.1	245.1*** ^c	9.5	218.4*** ^c	11.3	213.6*** ^c	10.2

Statistically significant differences from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; from Ni: ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$; from Ni-Zn-vit C: ^{μ} $p < 0.05$, ^{β} $p < 0.01$. Values are given as mean $\pm$ SEM, n = number of animals.

Histopathological results

The mentioned biochemical alteration could be referred to the liver histological changes. In fact, liver of the control group had a regular histological structure with a characteristic pattern of hexagonal lobules separated by interlobular septa, traversed by portal veins (figure 2A). In contrast, liver of nickel treated group had weak pathological alteration such as the presence of cellular debris within a central vein and cytological vacuolization. In general some degree of hepatic hypertrophy was evident, with the cytoplasmic structures becoming more and more opaque. More numbers of binucleated cells were also seen (figure 2B). However, the combination groups of Ni-Zn, Ni-vit C and Ni-Zn-vit C showed prominent recovery in the form of the liver histo-architecture such as the reduced cytoplasmic vacuolization and the normal sinusoidal spaces, but still binucleated cells were seen, though, the lamellar pattern of hepatocytes was restored to almost normal (figure 3C, D and E).

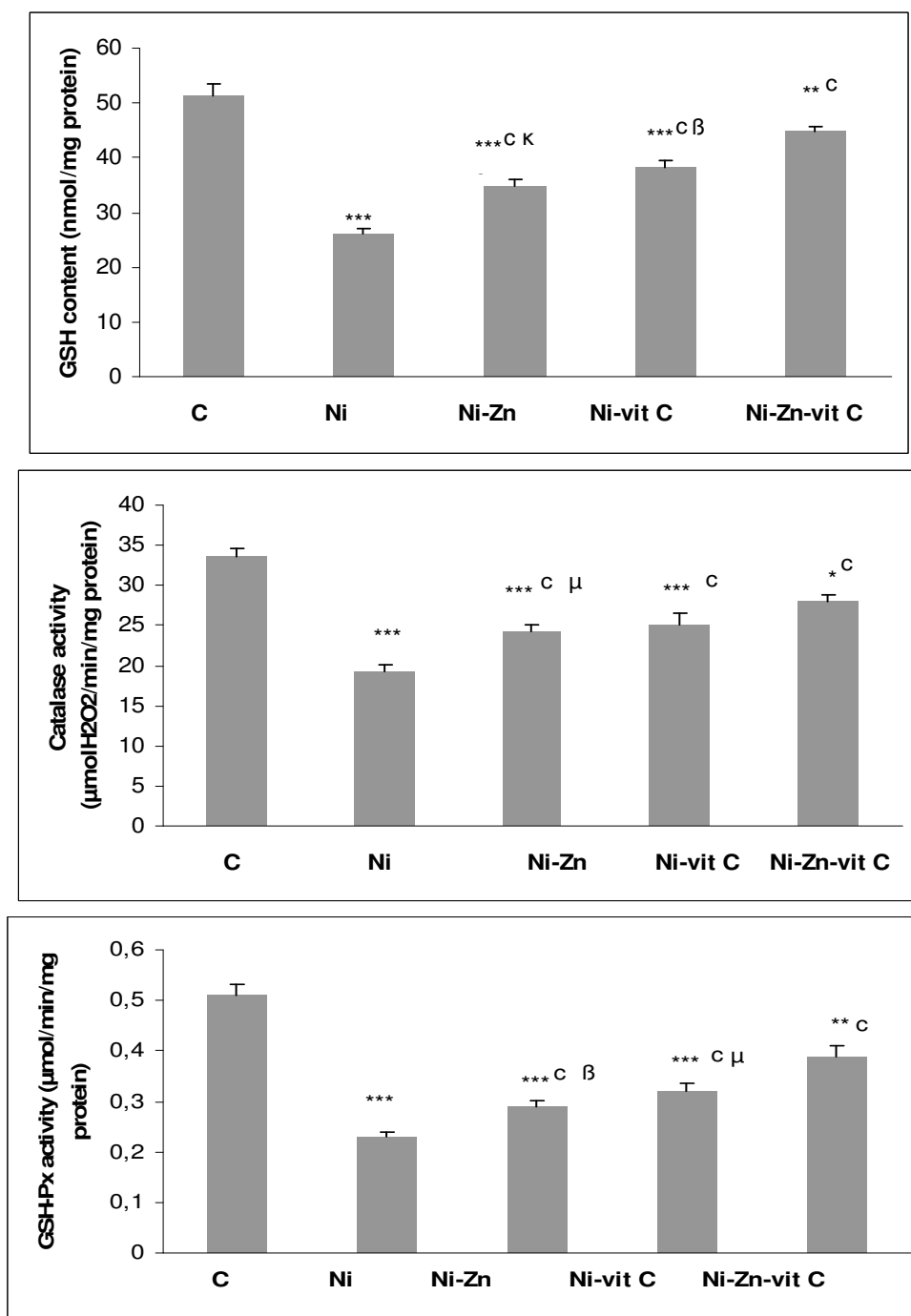


Figure 1. Values of glutathione and catalase and of GSH-Px in liver of control male rats, treated with (Ni), Ni-Zn, Ni-vit C and Ni-Zn-vit C after 6 weeks of treatment. Statistically significant differences from control: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; from Ni: * $p < 0,001$; from Ni-Zn-vit C: μ $p < 0,05$, β $p < 0,01$, κ $p < 0,001$. Values are given as mean $\pm$ SEM for group of 8 animals each.

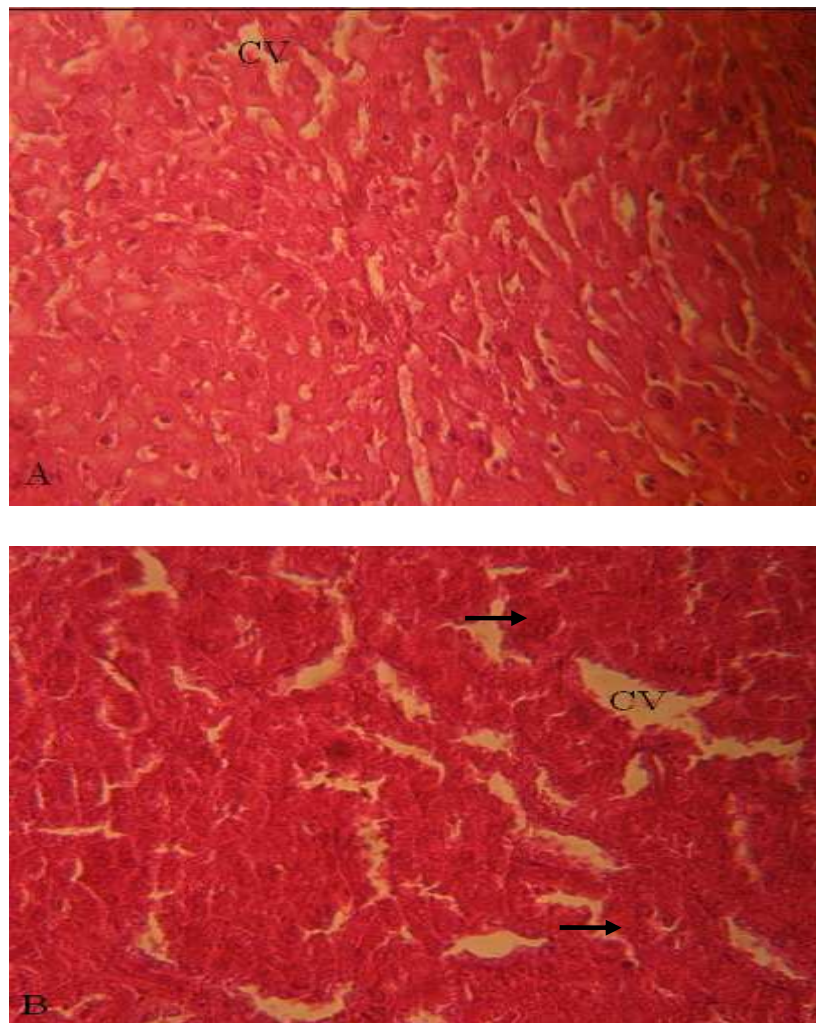
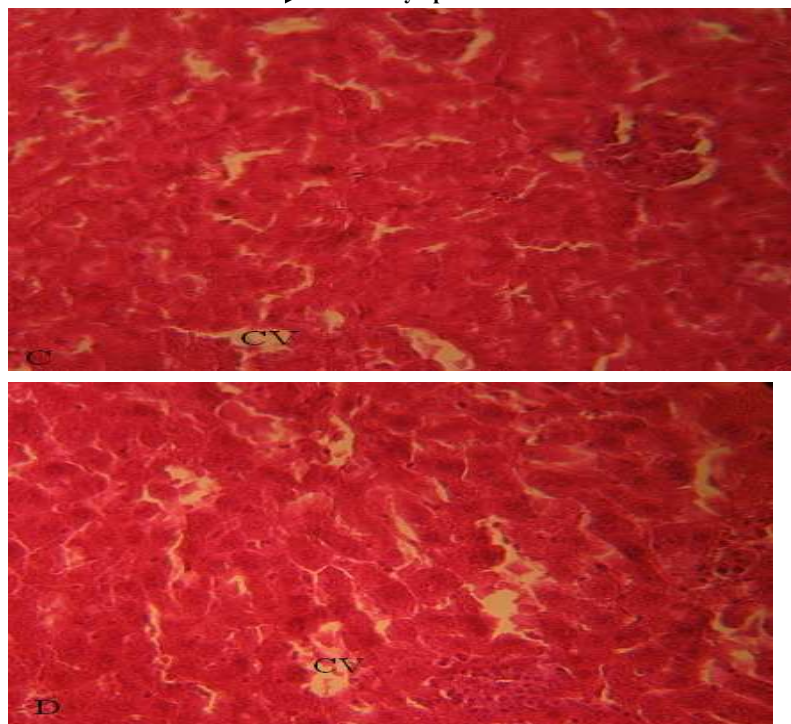


Figure 2. Effect of nickel (nickel sulphate) nickel on histological damage in the liver. Control (A), treated with Ni (B). Optic microscopy: sections were stained using the haematoxylin-eosin method (400 x). Arrows: ➔ indicate a presence of cellular debris within a central vein and ➔ indicate cytoplasmic vacuolisation.



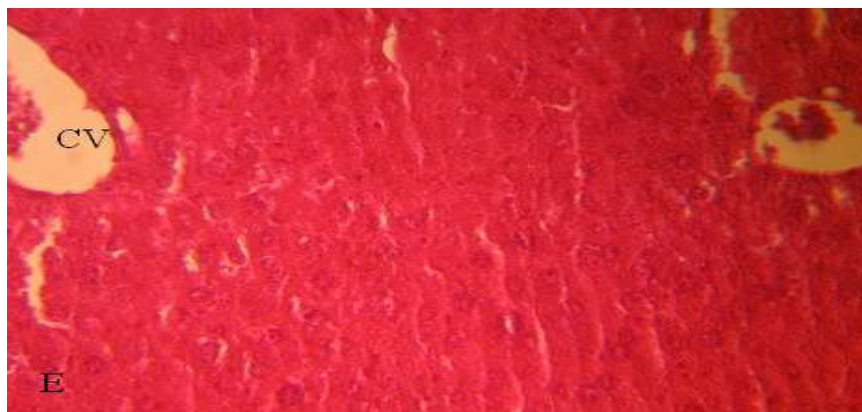


Figure 3. Effect of zinc (zinc sulphate) and vitamin C coadministrated with nickel on histological damage in the liver. Ni-Zn (C), Ni-vit C (D), and Ni-Zn-vit C (E). Optic microscopy: sections were stained using the haematoxylin-eosin method (400 x). Zn and vitamin C coadministrated with Ni maintained granular cytoplasm and normal hepatocytes.

DISCUSSION

This experiment was carried out to investigate if the association of zinc and vitamin C increases the protective effects of zinc and vitamin C on nickel induced oxidative liver injury in rats. Nickel treatment resulted in marked reduction in the body weight. This in good agreement with some previously published reports [27]. The decrease in body weight might be due to the overall increased degeneration of lipids and proteins as a result of nickel toxicity [28]. Findings from this investigation indicated also an increase of absolute and relative liver weights. Therefore, the administration of nickel sulphate might be led to selective accumulation of nickel in certain organs especially liver. As a result, zinc and vitamin C supply significantly prevented the nickel induced decrease in body weight gain. Accordingly, among the main approaches used to ameliorate nickel-induced hepatotoxicity is the use of agents with powerful antioxidant proprieties. Many studies have reported that zinc and vitamin C showed significant protective effect against damage induced by heavy metals such as cadmium [29, 30] and mercury [31, 32]. Nickel sulphate group animals showed also high level of glucose. The elevation in serum glucose is a common result of nickel toxicity and is usually linked with inhibition of insulin release from Langerhans' islets [33, 34] or with a block of glucose utilization by cells even in the presence of elevated concentrations of insulin [10] or the high glycogen breakdown and new supply of glucose production from other non-carbohydrate sources such as proteins [35]. However there is an amelioration of blood glucose concentration in nickel animals treated either with zinc or vitamin C alone or in combination. It is probably as a result of the glycaemia lowering effect of zinc sulphate by decreasing systemic glucose accumulation, diminishing nickel binding to biomolecules, improving insulin secretion and action [36] and/or protects the enzymes and ATP involved in glucose metabolism against inactivation by nickel [37]. However vitamin C might alter insulin receptors in muscle or adipose tissue by increasing membrane motility, secondary this vitamin enhances glucose uptake by the diaphragm [38]. In the present study, significantly decrease in the total protein and albumin levels was found. The decrease in these two biochemical parameters concentrations of Ni-treated rats might be due to changes in protein synthesis [39, 40]. The liver is the target organ of heavy metals toxicity and its cells spell out hepatic enzymes into blood, which are commonly used as biochemical indicator index of hepatocellular damage. In the present investigation nickel intoxication caused a significant increase in the activities of GOT, GPT and alkaline phosphatase, probably due to hepatocyte membrane damage resulting in increased release and leakage out of these enzymes from the liver cytosol into the blood stream which gives an indication on the hepatotoxic effect of this metal. These results are consistent with previous findings realized by some research groups who had found an association between nickel toxicity and the increased oxidative stress of rats [41]. Consequently, biochemical perturbations seem to be correlated with the liver histological alteration such as the presence of cellular debris within a central vein and a cytoplasmic vacuolization. Previous histological studies on liver have documented Ni-induced changes characterized by dilated sinusoids, vacuolization and the appearance of hepatic cells with distorted nuclei [42]. The combination treatment of zinc or vitamin C with nickel separately or together improved the histological alteration induced by nickel, which could be attributed to the antiradicals/antioxidant. In addition, these findings are in good agreement with those obtained by other studies which postulated the beneficial role of zinc and vitamin C on histological and enzymatic changes of rats [11, 43]. Therefore, the supplementation of zinc or vitamin C had protected liver function from nickel intoxication as indicated by the significant restoration of serum total protein, albumin, serum glucose, GOT, GPT and alkaline phosphatase. The diminution of glutathione level in nickel rats may be as a result of oxidative stress, which has been occurred, in nickel toxicity. In other words the reduced of antioxidant production was due to the increased oxygen metabolites and the elevated free radicals, which cause a decrease in the activity of the anti-oxidant defense system [44, 45] and several pathways have been proposed to show the depletion of GSH level in heavy metals toxicity. Firstly, the sulfhydryl

group of cysteine moiety of glutathione has a high affinity of metals, forming thermo-dynamically stable mercaptide complexes with several metals [46, 47]. Secondly, GSH may be oxidized due to the interaction with the free radicals induced by nickel. These complexes are inert which can be excreted via the bile, and therefore GSH level could be consumed during Ni detoxification [48]. In addition the decreased activity of hepatic CAT and GSH-Px in nickel treated animals, suggests that there is an interaction between the accumulated free radicals and the active amino acids of this enzymes [49] or due to the direct binding of the metal to the active site of the enzyme [50]. In Group III (nickel-zinc), group IV (nickel-vitamin C) and group V (nickel-zinc-vitamin C), the significant improvement of the glutathione level was noticed when compared with that of Group II (nickel). Thus the observed normalization of GSH levels, GSH-Px, and catalase activities following zinc or vitamin C treatment could be because of their property to induce metallothionein (S-rich protein) as a free radical scavenger, or its indirect action in reducing the levels and accumulation of oxygen reactive species.

CONCLUSION

In conclusion, this study demonstrates exposure to nickel provoked oxidative liver injury by inducing lipid peroxidation, which was led to depletion of liver reduced glutathione, reduction in antioxidant enzyme activities and biochemical parameters variations of rats. However, zinc or vitamin C treatment may have partial ameliorative effects on these disturbances caused by nickel toxicity by increasing GSH level and the activities of antioxidant enzymes and ameliorated some biochemical parameters, but zinc and vitamin C together exercise a synergistic more effect against the observed oxidative stress.

Acknowledgements

This work was supported by research project N° F01120070054 funded by the Ministry of Higher Education Algeria. The Authors should thank members of Algiers Pasteur Institute for providing rats.

REFERENCES

- [1] A. O. Majolagbe, A. A. Paramole, H. O. Majolagbe, O. Oyewole, M.O. Sowemimo *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2010**, 2 (2):170-178.
- [2] J. Deka, H. P. Sarma. *Arch. Appl. Sci. Res.*, **2012**, 4 (2):831-836
- [3] 3- G. Scansetti, G. Maina, G.C. Botta, C.E.P. Bamba, P. Spinelli. *Int Arch Occup Environ Health*, **1998**, 71, 60-63
- [4] H. Puchelt, In: F.O. Hutzinger, The Handbook of Environmental Chemistry, (Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, **1992**) 2763
- [5] M. Goutet, M. Ban, S. Binet. *Toxicology*, **2000**, 145 (1), 15–26.
- [6] F. Condevaux, J. Guichard, A. Forichon, M. Aujoulat, J. Descotes. *Appl Toxicol.*, **2001**, 21(5), 431–434.
- [7] H. Chakroun, N Hfaïdh, F. Makni-Ayadi, F. Guerhazi, A. Kammoun, A. Elfeki. *Sexologies*, **2002**, 12, 1-4.
- [8] 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.
- [9] C. Onkelinx, J. Becker, F.W. Jr. Sunderman. *Res Commun Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1973**, 6, 663-676.
- [10] Jr Sunderman; KS Kasprzak; E Horak; P Giltz; C Onkelinx. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **1976**, 38, 177-188.
- [11] K.D. Kusal, D.G Amrita, A.D. Salim, M.P. Ashok, N.D. Swastika, G.A. Jeevan. *Biometals*, **2007**, 20, 177–184.
- [12] E.F Rostan, H.V. DeBuys, D.L .Madey, S.R. Pinnell. *Int. Dermatol.*, **2002**, 41(9), 606–611.
- [13] D. Dhawan, A. Goel, C.S. Gautam. *Med Sci. Res.*, **1992**, 20, 55–56.
- [14] H. Fusion, M. Hirai, Y.M. Hsueh, S. Moriyasu, Y. Yamane. *Toxicol. Environ. Health*, **1986**, 19, 75–89.
- [15] S.A. Mansour, H.M. Abdel-Tawab. *Pesticide Biochemistry and physiology*, **2009**, 93, 34-39.
- [16] J.I. Lee, H. Son ; M. Kim. *Vet Sci.*, **2006**, 7(4), 375 - 379.
- [17] J.O. Ayo, S.B Oladele, S. Ngam, A. Fayomi, S.B. Afolayan. *Res Vet Sci.*, **1998**, 66(1), 7 -9.
- [18] A.W. Al-hassan, A.Y. Adenkola, A.Yusuf, Z.M. Bauchi, M.I. Saleh, V.I Ochigbo. *Cell Anim Biol.*, **2010**, 4 (2), 29-33.
- [19] P. Sidhu, M.L. Garg, D.K. Dhawan. *Chemico-Biological Intr.*, **2004**, 150, 199-209.
- [20] Y. Özlem. *Afr Biotech.*, **2009**, 8 (19), 5053-5058
- [21] G.L. Ellman. *Arch Biochem Biophys.*, **1959**, 82, 70-77.
- [22] D.J. Jollow, J.R Mitchell, Z. Zampaglione, J.R. Gillerre. *Pharmacol.*, **1974**, 11, 151-157.
- [23] L. Floche, W.A. Gunzler, In: L. Packer, Methods in Enzymology, Ed, (Orlando, Florida, USA. Academic Press, **1984**) 115–121.
- [24] H. Abe, In: L.Packer, Catalase in vitro In: Methods in Enzymology. Ed, (Orlando, Florida, USA. Academic Press, **1984**) 121–126.
- [25] M. Bradford. *Anal Biochem.*, **1976**, 72, 248-254.

- [26] R. Haoult; Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine, Décarie, **1984**, 313.
- [27] M.P. Dieter, C.W. Jameson, A.N. Tucker, M.I. Luster, J.E. French, H.I. Hong, G.A. Boorman. *Toxicol. Environ. Health*, **1988**, 24, 357-372.
- [28] K. Cemple, K. Janicka. *Biol Trace Elem Res.*, **2002**, 90, 215-226.
- [29] H. Jemai, I. Messoudi, A. Chaouch, A. Kerkeni. *Toxicol.*, **2007**, 21, 269-273.
- [30] H.S Gamal, A.A. Eatemad. *The Open Neuroendocrinol.*, **2011**, 4, 1-8.
- [31] H. Fukino, M. Hirai, Y.M. Hsueh, Y. Yamane. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **1984**, 73(3), 395-401.
- [32] Y. Moumen, C. Abdenour. *European Journal of Scientific Research*, **2008**, 22(2), 197-204
- [33] R.L Dormer, A.L. Kerbey, M. McPherson, S. Manley, S.J.H. Ashcroft, J.G. Schofield, P.J. Randle. *Biochem.*, **1973**, 140, 135-40.
- [34] Z. Kechrid, F. Dahdouh, R.M. Djabar, N. Bouzerna. *Environ Health Sci. Eng.*, **2006**, 3 (1), 65-69.
- [35] J. Cartana, L. Arola. *Toxicol.*, **1992**, 71, 181-92.
- [36] Y. Song, K. Hes, E.B. Levitan, J.E. Manson, S. Liu. *Diab. Med.*, **2006**, 23(10), 1050-1056.
- [37] F.H. Nielsen. In: J.O. Nriagu, Nickel in the Environment (Wiley-Interscience, New York, NY, **1980**) 611-634.
- [38] S.F. Ambali, K. Shuaib, R. Edeh, B.C. Orieji, M. Shittu, M. Akande. *Biology and Medicine*, **2011**, 3 (1), 6-14.
- [39] L.A. Dostal, S.M. Hopfer, S.M. Lin, F.W. Sunderman. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **1989**, 101(2), 220-231.
- [40] K.D. Kusal, D. Shakuntala. *Biol Trace Elem Res.*, **2000**, 72(2), 175-180.
- [41] E.L.B. Novelli, R.T. Hernandez, J.L.V.B. Novelli Filho, L.L. Barbosa. *Environ Pollu.*, **1998**, 103, 295-300.
- [42] A. Rabbani-Chadegani, N. Fani, S. Abdossamadi, N. Shahmir. *Bioch Mol Toxicol.*, **2001**, 25, 127-134.
- [43] K.D. Kusal, N.D. Swastika, D. Shakuntala. *Basic Clin. Physio. Pharmacol.*, **2001**, 12 (3), 187-195.
- [44] G. Gstraunthaler, W. Pfaller, P. Kotanko. *Biochem Pharmacol.*, **1983**, 32, 2969-2972.
- [45] M. Iscan, A. Ada, T. Coban, N. Kapucuoglu, A. Aydin, A. Isimer. *Biol Trace Elem Res.*, **2002**, 89, 177-190.
- [46] H.V. Aposhian. *Rev Biochem Toxicol.*, **1989**, 10, 265-299.
- [47] A.S. El-Sharaky, A.A. Newairy, M.M. Badreldeen, S.M. Eweda, S.A. Sheweita. *Toxicology*, **2007**, 235, 185-193.
- [48] P. Manna, M. Sinha, P.C. Sill. *Arch Toxicol.*, **2008**, 82: 137-149.
- [49] J.A. Fee, R.G. Briggs. *Biochem Biophys Acta*, **1975**, 400, 439-450.
- [50] M. Misra, R.E. Rodriguez, K.S. Kasprzak. *Toxicol.*, **1990**, 41: 601-611.