الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Badji-Mokhtar Annaba University

Université Badji-Mokhtar, Annaba

جامعة باجي مختار - عنابة

Faculté des sciences
Département de Biologie
Laboratoire de Toxicologie Cellulaire

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences.

Option : Biologie Animale

Thème

L'effet combiné de la vitamine C (acide ascorbique) et de la vitamine E (α-tocophérol) contre la toxicité du nickel chez les souris (Mus musculus).

Par : DADDOUH Faouzi

Devant le jury:

Président: Mr. DJEBAR Mohamed Réda (Prof). Université Badji Mokhtar, Annaba.
Encadreur: Mr. KECHRID Zine (Prof). Université Badji Mokhtar, Annaba.
Examinateurs:
Mr. LALAOUI Korichi (Prof). Université Mentouri, Constantine
Mr. NOUADRI Tahar (MCA). Université Mentouri, Constantine.

2015/2016

Sommaire

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction **01**

Chapitre 01 : Etude bibliographique

1. *Nickel caractéristiques et toxicité*

1.1. Généralité 03

1.2. Usage et sources d'exposition 04

1.3. Devenir dans l'organisme 04

1.4. Evaluation toxicologique 05

1.4.1. Toxicité aigue 05

1.4.2. Toxicité chronique et subchronique 05

1.4.3. Cancérogénicité 06

1.4.4. Toxicité hépatique et rénale 06

1.4.5. Toxicité pulmonaire 07

1.5. Cytotoxicité du nickel 07

1.6. Radicaux libres générés par le nickel 07

2. Stress oxydative

2.1. Définition du stress oxydatif **09**

2.2. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) 09

2.2.1. Sources endogènes d'ERO 10

2.3. Stress oxydative et conséquences cellulaires 11

2.3.1. Peroxydation lipidique 11

2.3.2. Oxydation des protéines 12

2.3.3. Oxydation des glucides 14

2.3.4. Altération de l'ADN 14

2.4. Les systèmes de défenses antioxydants 16

2.4.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques 16
2.4.1.1. Les superxydesdismutases (SODs) 16
2.4.1.2. La catalase 18
2.4.1.3. Le glutathion peroxydase (GSH-Px) 18
2.4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques 20
2.4.2.1. Le glutathion 20
2.4.2.2. Les métallothionines 21
2.4.3. Les antioxydants exogènes 22
2.4.3.1. Les oligoéléments 22
2.4.3.2. Vitamine E (ou α-Tocophérol) 24
2.4.3.3. Vitamine C (ou Acide Asorbique) 28

Chapitre 02 : Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes 33
1. Matériels 33
1.1. Matériel biologique 33
1.2. Matériel chimique 33
2. Méthodes 34
2.1. Prélèvement des échantillons 36
2.2. Prélèvement des organes 36
2.3. Dosage des paramètres hématologiques 36
2.4. Dosage des paramètres biochimiques 37
2.4.1. Dosage du glucose 37
2.4.2. Dosage du calcium 37
2.4.3. Dosage des protéines totales 38
2.4.4. Dosage de l'albumine 38
2.4.5. Dosage de la bilirubine totale et directe 38
2.4.6. Dosage de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (ALT/TGP) 38
2.4.7. Dosage de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase (AST/TGO) 39
2.4.8. Dosage de l'activité de phosphatase alcaline (PAL) 39
2.4.9. Dosage de l'urée 39
2.4.10. Dosage de la créatinine 39

2.4.11. Dosage de l'acide urique 40
2.4.12. Dosage des lipides totaux 40
2.4.13. Dosage du cholestérol 40
2.4.14. Dosage des triglycérides 40
2.5. Dosage des paramètres antioxydants 41
2.5.1. Préparation de l'homogénat 41
2.5.2. Dosage du taux de glutathion hépatique (GSH) 41
2.5.3. Dosage de l'activité de glutathion péroxydase (GSH-PX) 42
2.5.4. Dosage de l'activité du catalase 43
2.6. Evaluation histologique 45
2.7. Analyse statistique 46

Chapitre 03 : Résultats

1. Effet des traitements sur la croissance corporelle des souris 47
2. Effet des traitements sur les poids relatifs et absolu du foie et des reins 50
3. Effet des traitements sur la consommation alimentaire et en eau 53
4. Effet des traitements sur les paramètres hématologiques 55
5. Effet des traitements sur les paramètres biochimiques 57
6. Effet des traitements sur les biomarqueurs biochimiques de la fonction hépatique 59
7. Effet des traitements sur les activités des biomarqueurs enzymatiques de la fonction rénale 64
8. Effet des traitements sur le profile lipidique 67
9. Effet des traitements sur les paramètres de stress oxydative 70
10. Evaluation histopathologiques de l'organe métabolique (foie) 73
11. Evaluation histopathologiques de l'organe excréteur (reins) 75

Chapitre 04 : Discussion et Conclusion générale

1. Discussion 77
2. Conclusion générale 84

- Perspectives 86
- Références bibliographiques 87
- Annexes 100
- Publication

Remerciements

Je tiens à remercier et à exprimer toute ma gratitude aux différentes personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

*Je remercie mon promoteur de thèse, monsieur **KECHRID Zine**, Professeur à l'Université d'Annaba pour son aide constante, sa rigueur scientifique et ses conseils judicieux.*

*Je remercie Monsieur **DJEBAR Mohamed Réda**, Professeur à l'Université d'Annaba, pour m'avoir bien accueilli au sein de son Laboratoire, et pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que président du jury.*

*Je remercie Monsieur **LALAOUI Korichi**, Professeur à l'université de Mentouri, Constantine, qui ma fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur. Qu'il trouve ici, le témoigne de mes très profonds respects.*

*Je remercie Monsieur **NOUADRI Tahar**, Maitre de conférence classe « A » à l'université de Mentouri, Constantine, qui' a bien voulu participer dans ce jury et examiner ce travail, Qu'il trouve ici, le témoigne de mes très profonds remerciements.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **LADJAMA Ali**, Professeur à l'Université d'Annaba de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée.*

*Je remercie aussi le Professeur **LONKAR Abdelkrim** et ses équipes de service d'anatomie pathologique d'Hopitale Ibn Roched d'Annaba, pour l'aide scientifique dans la réalisation des coupes histologiques.*

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel …….**……..03**

Tableau 02 : Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale……...**27**

Tableau 03 : Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale, déterminées avec et sans saponification **……..……27**

Tableau 04 : Les aliments les plus riches en vitamine C **……30**

Tableau 05 : Composition alimentaire des souris d'expérimentation……**33**

Tableau 06 : Variation du poids corporel en gramme chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.…**……..48**

Tableau 07: Variation du nombre des globules rouges, des globules blancs, du taux d'hémoglobine, d'hématocrite, du volume globulaire moyenne (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**…….56**

Liste des Figures

Figure 01 : Transport du nickel et ses interactions avec les molécules majeures de la cellule ……**…….....08**

Figure 02*:* Intermédiaires réduits de l'oxygène; les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène**…….10**

Figure 03 *:* Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire**…….13**

Figure 04 : Principales classes de dommages de l'ADN**……...15**

Figure 05 : Les trois types de la SOD**……17**

Figure 06 : Le glutathion (GSH) intervient comme co-facteur dans la GSH peroxydase**…….19**

Figure 07 *:* Structure chimique de la vitamine E**……...25**

Figure 08 *:* Structure chimique de la vitamine C**……...29**

Figure 09 : Réaction de la vitamine E avec des radicaux péroxyles et la régénération de la vitamine E radiculaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C ……..... **……32**

Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental**……...35**

Figure.11 : Évolution du poids corporel en gramme chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou/et E combinée**…….49**

Figure 12: Evaluation du poids absolu et relatif du foie chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminés au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**……..51**

Figure 13: Evaluation du poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.**……52**

Figure 14 : Taux de la consommation journalière de nourriture et de l'eau chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les traitées par la vitamine C ou/et E combinée……..**…….54**

Figure 15 : Variation de la concentration sérique du glucose et du calcium chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée……..**…….58**

Figure 16: La concentration sérique des protéines totales et de l'albumine chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.……**……..60**

Figure 17 : La concentration sérique de la bilirubine directe et totale chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**…….61**

Figure 18 : Variation des activités enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine transaminase (ALT) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**…….62**

Figure 19 : Variation des activités enzymatiques de phosphatase alcaline (PAL) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée ……..**….....63**

Figure 20: Variation de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.**……...65**

Figure 21: Variation de la concentration sérique de l'acide urique chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée……**……. 66**

Figure 22 : La concentration sérique des lipides totaux et du cholestérol chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées ...**……68**

Figure 23 : La concentration sérique des triglycérides chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**.....69**

Figure 24: Variation du taux du glutathion hépatique (GSH) et l'activité enzymatique du catalase chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée**.....71**

Figure 25 : Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou/et E combinée**….....72**

Figure 26: Coupes histologiques du foie des souris témoins (A), traitées par la vitamine C (B), traitées par la vitamine E (C), traitées par la vitamine E et C (D), des souris contaminées au nickel (E), contaminées au nickel et traitées par la vitamine C (F), contaminées au nickel et traitées par la vitamine E (G), et contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E (H).
Hématoxyline- Eosine, Gr : x 400**..……...74**

Figure 27: Coupes histologiques des reins des souris témoins (A), traitées par la vitamine C (B), traitées par la vitamine E (C), traitées par la vitamine E et C (D), des souris contaminées au nickel (E), contaminées au nickel et traitées par la vitamine C (F), contaminées au nickel et traitées par la vitamine E (G), et contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E (H).
Hématoxyline- Eosine, Gr : x 400**…….76**

Resumé

Les composés de nickel sont des dangers environementaux, capable d'induire des problemes sanitaires sévèves et des effets cancérogènes, qu'ils peuvent être atténué par nombreux antioxydants. Alors, cette étude a été réalisée pour déterminer les effets protecteurs de la vitamine C ou/et la vitamine E contre le nickel induisant une hématotoxicité, une hépatotoxicité, une néphrotoxicité et un stress oxydant chez les souris males Suiss albinos (Mus Musculus).

Soisante quater souris males ont été réparties en huit groupes de huit animaux chacun : un groupe a servi de témoin et les autres ont reçu respectivement: vitamine C dans l'eau de boisson (1g Vit C/l eau de boisson), vitamine E (1g Vit E/kg d'aliment), vitamines C et E (Vit C – Vit E), sulfate de nickel héxahydraté (2,7g $NiSO_4$ 6(H_2O) /kg d'aliment), sulfate de nickel héxahydraté + vitamine C (Ni-Vit C), sulfate de nickel héxahydraté + vitamine E (Ni-Vit E), sulfure de nickel héxahydraté + vitamines C et E (Ni-Vit C-Vit E). Tout les groupes ont été traité pour un duré de quatre semaines.

Les résultats obtenus ont montré une diminution de poids corprel et de la consommation alimentaire et en eau, ainssi qu'une augmentation des poids relatifs et obsolus du foie et des reins chez les souris contaminées au nickel. Les biomarqueurs biochimiques de la fonction hépatique et rénale suivant l'exposition au nickel ont été mis en evidence par l'augmentation significative de la concentration sérique du glucose, du calcium, de l'urée, de l'acide urique, de la créatinine, de bilirubine, des lipides totaux, des triglycérides de cholésterol, les activités enzymatiques de l'alanine aminotranférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), phosphatase alcaline (PAL), et inversement le taux des protéines totales et de l'albumine a été diminue en comparaison avec le groupe témoin. L'effet toxique du nickel a été aussi indiqué par une diminition significative de l'activité enzymatique du catalase, de glutathione peroxidase (GSH-Px) et le taux du glutathione hépatique (GSH). Tous ces variations des paramètres biochimiques ont été confirmés par les observations histopathologiques du foie et des reins; nécrose des hépatocytes et congestion des viens centrales, hémoragé des tissus interstitials, nécrose des tubes rénaux. De plus, les résultats hématologiques ont montré une dimunition du nombre des globules rouges, (RBC), concentration d'hémoglobine (Hb), le pourcentage d'hématocrite (Ht), et une augmentation de nombre des globules blancs en comparaison avec les souris témoins. Tous ces paramètres sont significativement améliorés en présence de la vitamine C et/ou E. Cependant, les vitamines C et E ensemble ont montré une amélioration plus éfficase que la vitamine C ou la vitamine E seule, dans l'atténuation des effets toxiques du nickel.

En conclusion, la supplimentation de la vitamine C et E combinée s'est avérée plus bénéfique que chaque vitamine contre le nickel qui induit une hématotoxicité, un stress oxydant et une dysfonctionnement hépatique et rénale chez les souris.

Mots clés: Nickel, Vitamin C et Vitamine E, Stress Oxydatif, Hématotoxicité, Hépatotoxicité, Néphrotoxicité, Souris.

Abstract

Nickel compounds are environemental hazards able to produce serious health problems and carcinogenic effects, which can be attenuated by numerous antioxidants. Therefore, this study was carried out to determine the protective effects of vitamin C and/or vitamin E against nickel-induced heamtotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity and oxidative stress in male Swiss albino mice (Mus Musculus).

Sixty four mice were divided into eight groups of eight animals each: one group served as a control and the others were received respectively: vitamin C in drinking water (1g VitC/l drinking water), vitamin E (1g Vit E/kg of diet), vitamins C and E (Vit C-Vit E), nickel sulfate hexahydrate (2,7g $NiSO_4$ $6(H_2O)$/kg of diet), nickel sulfate hexahydrate + vitamin C (Ni-VitC), nickel sulfate hexahydrate + vitamin E (Ni-VitE), nickel sulfate hexahydrate + vitamins C and E (Ni-Vit C-Vit E); all groups were treated for four weeks.

The results which have obtained revealed a reduction in body weight gain, food consumption and water intake, along with an increase of the absolute and relative liver and kidney weights in nickel intoxicated mice. The biochemical markers of liver and kidney function following nickel intoxication were evidenced by increased serum concentrations of glucose, calcium, urea, uric acid, creatinine, bilirubin, total lipids, triglycerides, cholesterol, the enzymatic activities of glutamate-pyruvate-transaminase (GPT), glutamate-oxalo-acétate-transaminase (GOT), alkaline phosphatase (ALP), and conversely the serum levels of total proteins and albumin were decreased when compared to their controls. The toxic effect of Ni was also indicated by decreased enzymatic activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the level of glutathion in liver. All these biochemical paramater variations were confirmed by the kidney and liver histopathological observations; hepatocyte necrosis, congestion within central veins, hemorrhage in the interstitial tissue with necrosis of renal tubules. In addition, the hematological indices showed that the red blood cell count (RBC), heamoglobin content (Hb) and haematocrit pourcentage (Ht) were remarkably lower than the corresponding controls, whereas white blood cell count (WBC) was significantly increased. All these paramaters were significantly improved in presence of vitamin C and/ou E. However, both vitamins C and E showed an efficient improvement than either vtamin C or vitamin E in attenuating the toxic effects of nickel.

In conclusion, the supplementation of the combined vitamin C and E proved to be more efficient than either vitamin against nickel-induced oxidative stress, heamatotoxicity and liver and kidney dysfunctions.

Key words: Nickel, Vitamin C and vitamin E, Oxydative Stress, Heamatotoxicity, Hepatotoxicity, Nephrotoxicity, Mice.

الملخص

تعتبر مركبات النيكل خطيرة ، قادرة على إحداث مشاكل صحية حرجة وتأثيرات سرطانية في الجسم، والتي يمكن تخفيفها باستعمال العديد من مضادات الأكسدة. لذلك أنجزت هذه الدراسة لغرض تقييم التأثيرات الوقائية لفيتامين C و/ أو فيتامين E ضد تأثيرات عنصر النيكل المؤدي إلى التسمم الدموي، التسمم الكبدي، التسمم الكلوي و الإجهاد التأكسدي عند ذكور الفئران السويسرية البيضاء (Mus Musculus).

استخدمت 64 فأر' قسمت الحيوانات إلى ثمانية مجموعات لكل منها ثمانية فئران : واحدة خصصت لمجموعة الشاهد، والمجموعات الأخري تلقت علي التوالي : فيتامين C في ماء الشرب (1غ / ل)، فيتامين E (1غ/ كلغ الغذاء)، فيتامينات C و E، سولفات النيكل هيدرات (2.7 غ $NiSO_4\ 6(H_2O)$ /كلغ من الغداء) ، سولفات النيكل هيدرات + فيتامين E، سولفات النيكل هيدرات + فيتامين C، سولفات النيكل هيدرات + فيتامين C وفيتامين E. كل المجموعات عولجت لمدة أربعة أسابيع.

النتائج المحصل عليها أظهرت أن هناك انخفاض في وزن الجسم الكلي و كمية الغذاء و الماء مع ارتفاع في الوزن الحقيقي والنسبي للكبد والكلى للفئران المعرضة لعنصر النيكل.
المؤشرات البيوكميائية لوظيفتي الكبد و الكلى عند المجموعة المعرضة لعنصر النيكل السمي أظهرت بوضوح ارتفاع في التركيز المصلي لسكر الغلوكوز، الكالسيوم، تركيز اليوريا، حمض باليوريك، الكرياتيتين، مادة البليريبين، الكولسترول ، الدهون الثلاثية، الليبيدات الكلية والنشاط الأنزيمي لناقلات الأمين و أنزيم الفوسفتاز القلوي و بالمقابل، مستوى البروتينات الكلية و الألبومين أظهرت انخفاض ملحوظ .
التأثير السمي لعنصر النيكل أظهر كدلك انخفاض ملحوظ في محتوى الجلوتاتيون والنشاط الإنزيمي للجلوتاتيون التأكسدي والكتلاز للمجموعة المعالجة بالنيكل مقارنة مع مجموعة الشاهد. كل من هده التغيرات في المعايير البيوكميائية تم تأكيدها بملاحظة المقاطع النسيجية للكبد و الكلى، والتي تميزت بوجود : احتقان في الأوردة المركزية النسجية، موت للخلايا الكبدية، نزف في النسيج الخلالي مع تشمع و موت خلوي في الأنابيب الكلوية.
التأثير السمي على المؤشرات الدموية للفئران المعرضة لعنصر النيكل أظهرت أيضا انخفاض في عدد كريات الدم الحمراء و في تركيز خطاب الدم (الهيموغلوبين) و في نسبة الهيماتوكريت، بينما عدد كريات الدم البيضاء أظهرت ارتفاع ملحوظ . كل من هذه المعايير تم تحسينها في وجود C فيتامين و/أو فيتامين E. لكن، كلا الفيتامنين معا (فيتامين C و فيتامين E) أظهرت تحسين فعال وأحسن من كل فيتامين لوحده في تخفيف التأثيرات السمية لعنصر النيكل.
خلاصة لذلك، اضافة كلا من الفيتامين C و E أثبتت كونها جد فعالة مقارنة مع كل فيتامين لوحده ضد عنضر النيكل المؤدي الى الاجهاد التأكسدي، التسمم الدموي والى الايصابة الوظيفية للكبد و الكلى عند الفئران.

.الكلمات الدلالية: النيكل، فيتامين C و فيتامين E، الإجهاد التأكسدي، التسمم الدموي، التسمم الكبدي، التسمم الكلوي، ، فئران.

Introduction

Introduction

La pollution de l'environnement et l'exposition permanente des êtres humains à des métaux lourds toxiques tels que le mercure, le cadmium, le nickel ou le plomb sont de graves problèmes qui ne cessent de prendre de l'ampleur dans le monde entier. L'exposition aux métaux s'est fortement aggravée au cours des cinquante dernières années avec l'augmentation exponentielle de l'utilisation de métaux lourds dans les processus et produits industriels.

Le nickel est un élément naturel de la croute terrestre, appartenant au groupe VIIIb du tableau périodique. Il était inconnujusqu'au milieu du XVIII^{éme} siècle, quand ses caractéristiques physicochimiques ont été mises en évidence et utilisées plus tard, notamment dans les batteries et les pièces de monnaie. Le nickel a aussi servi pour protéger l'acier contre la corrosion (Nickelage), ou encore comme stabilisant pour les plastiques et comme pigment dans les produits céramiques (**Maniyar et al., 2012; Schaumlöffel, 2012).** Les principales causes d'exposition de l'Homme au nickel sont l'alimentation (poissons, mollusques bivalves, végétaux dont les légumes riches en fibres) et le tabagisme où le métal ingéré principalement par voies digestives, se distribue dans le sang, et s'accumule ensuite dans différents organes cibles (foie, reins, et cerveau), provoquant ainsi des effets hépatotoxiques, néphrotoxiques et hématotoxiques **(He et al., 2013; Bardack et al., 2014; Boulila et al., 2015[a]).** De plus, de nombreuses études permettent de penser que ce métal peut induire de multiples cancers comme certains affectant le rein, le poumon, les testicules ou la prostate **(Kasprzak et al., 2003).**

Au niveau cellulaire, le nickel se présente sous des formes chimiques différentes, mais il ne pénètre efficacement dans les cellules que sous la forme cationique bivalente (Ni^{2+}) ou sous forme de chlorure ou de sulfate de nickel. L'ion nickel des composés solubles peut atteindre le noyau cellulaire par solubilisation et diffusion ou par les systèmes de transport des ions métalliques, les composés peu solubles sont phagocytés et les vacuoles libèrent les ions nickel dans le noyau cellulaire **(Kasprzak et al., 2003),** qui peuvent provoquer des lésions directes sur tous les composants cellulaires: peroxydation des lipides, protéines et des acides nucléiques, due aux attaques des radicaux libres générées par le nickel **(Audrey et al., 2015).**

Par ailleurs, les cellules ont développé des systèmes de défenses pour métaboliser les espèces oxydantes et ainsi limiter les dégâts qu'elles provoquent. Ces systèmes antioxydants protègent les constituants cellulaires des agressions radicalaires en interagissant directement

avec ces radicaux ou indirectement en produisant des peptides comme les métallothionéines ou le glutathion **(Lou et al., 2013).** De nombreuses études indiquent une production massive d'espèces oxydantes et l'inhibition des activités des principales enzymes antioxydants due à la cytototoxicité du nickel dans une cellule peuvent favoriser une mort cellulaire excessive ou une évolution tumorale**.** Les effets oxydatifs des métaux lourds peuvent être réduits par les antioxydants naturels comme les oligoéléments (zinc, cuivre, cobalt) ou les vitamines**.** La vitamine C (hydrosoluble) et la vitamine E (liposoluble) sont des antioxydants puissants protègent le corps contre les attaques des radicaux libres, responsables aux peroxydations lipidiques et protéiques (**Hattiwale et al., 2013).**

La littérature scientifique internationale a accumulé une masse considérable de preuves attestant de l'extrême toxicité des métaux lourds pour les êtres humains **(Henderson et al., 2012).** Les effets protecteurs de la vitamine C et/ou la vitamine E contre les effets hépatotoxiques (**Ajith et al., 2009; Ebuehi et al., 2012),** néphrotoxiques (**Atasayar et al., 2008)** et hématotoxiques **(Das et al., 2007)** des métaux lourds ont été bien documenté. Cependant, certains chercheurs ont étudié le rôle bénéfique de la vitamine C ou vitamine E contre le nickel qui induit des lésions hépatiques (**Rao et al., 2009; Kasprzak et al., 2011)** et altérations hématologiques **(Das et al., 2007).** Jusqu'à aujourd'hui, aucune étude ne s'est penchée sur l'effet protecteur de la vitamine C et la vitamine E en combinaison contre la toxicité du nickel.

Nous allons donc, dans un premier temps rappeler l'état des connaissances bibliographiques sur le nickel, le stress oxydatif et l'action antioxydant des vitamines C et E. Dans la partie expérimentale, nous allons intéresser à évaluer quelques bio marqueurs biochimiques de l'exploration rénale et hépatique et du profil hématologique, suivant le traitement par le nickel seul et les traitements combinés du nickel plus vitamine C et/ou vitamine E. Aussi, nous allons évaluer la variation des activités des principales enzymes antioxydants (glutathion peroxydase et catalase), et la variation du taux de glutathion intracellulaire. Enfin, nous allons performé notre étude par l'étude histologique du foie et des reins. L'ensemble des résultats nous permettra d'approfondir le rôle synergique de la forme combinée de la vitamine C et de la vitamine E à diminuer l'hépatotoxicité, le néphrotoxicité, l'hématotoxicité et l'effet du stress oxydatif du nickel chez les souris males albinos.

Chapitre 01:

Etude Bibliographique

1. Nickel caractéristiques et toxicité

1.1.Généralités

Le nickel (Ni) est un élément chimique métallique blanc argenté symbole Ni et numéro atomique 28. Il a la structure électronique [Ni] $4s^2$ $3d^8$, et il fait partie des éléments de transition qui se trouvent dans bloc ***d*** du tableau périodique**.** Pendant plusieurs milliers d'années, le nickel fut utilisé dans les pièces de monnaie sous forme d'alliages nickel-cuivre, mais il ne fut considéré comme un élément à part entière qu'à partir de 1751, lorsque le chimiste suédois Axel Frederic Crönstedt l'isola à partir du minerai de niccolite (NiAs) **(Schaumlöffel, 2012)**. Le nickel est un métal résistant, malléable, ductile et facilement polissable. Il existe sous la forme de cinq isotopes stables et a une faible réactivité chimique. Il est soluble dans l'acide nitrique dilué, est passif (non réactif) dans l'acide nitrique concentré et ne réagit pas avec les bases **(Maniyar et al., 2012).** Il présente deux états principaux d'oxydation correspondant aux espèces ioniques Ni^{+2} et Ni^{+3} **(David et al., 2015**)**.** Le nickel est assez peu répandu dans l'écorce terrestre. On le trouve dans les météorites et sous forme combinée dans des minéraux comme la garniérite ((Ni, Mg) $3[Si_2O_5]$ (OH)4)), la millérite (NiS), la niccolite (NiAs) et la pentlandite $((Fe,Ni)_9S_8)$. La plupart des sels de nickel, comme le chlorure de nickel ($NiCl_2$), le sulfate de nickel ($NiSO_4$) et le nitrate de nickel ($Ni(NO_3)2$) sont verts ou bleus, et sont le plus souvent hydratés. Alors, le nickel métallique ne se rencontre pas fréquemment dans la nature, il existe le plus sauvent sous forme d'un alliage fer-nickel dans certaines roches ultramafiques riche en fer et en magnésium**.** Les composés du nickel sont souvent identifiés en ajoutant un réactif organique, l'éthylgloxime, qui forme un précipité rouge et floculeux en présence de nickel **(Chi et al., 2016)**.

Les sources d'exposition du nickel sont divers: les rejets industriels, la circulation urbaine, les végétaux qui se trouvent à proximité des sources d'émission de raffineries et du tabac **(Sarah et al., 2014).**

Tableau 01 : Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel.

Caractères physico-chimiques	**Donnés bibliographiques**
Masse molaire	58,69 g/mole
Point de fusion	1455 °C
Point d'ébullition	2730 °C
Densité	8,9

1.2.Usages des composés de nickel

Le nickel et ses composés possèdent des meilleures caractéristiques physico-chimiques, qui le font un métal le plus demandé dans divers produits et procédés (tableau 01):

- Le carbonate tétrahydroxytrinickel est employé pour le revêtement électrolytique, comme catalyseur pour céramique.
- Le carbonate de nickel est employé dans des pièces électroniques.
- Le dichlorure de nickel anhydre sert d'absorbant 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 constitué une importante matière première pour les procédés de fonte et de production d'alliages, et il est aussi employé dans la fabrication des catalyseurs et des solutions électrolytiques dans les piles nickel-cadmium **(IARC, 2012).**

1.3.Devenir dans l'organisme

En cas d'exposition professionnelle, la principale voie de pénétration dans l'organisme est l'absorption par voie respiratoire. Le dépôt, la rétention au niveau du tractus respiratoire et l'absorption du nickel après inhalation dépendent des caractéristiques physico-chimiques des particules inhalées. La solubilité et la taille gero-dynamique des particules étant des facteurs déterminants. Chez l'homme, environ 20 à 35 % du nickel déposé au niveau des poumons sont absorbés. Le reste est expectoré, ingéré ou alors retenu au niveau du tractus respiratoire **(Delemotte et al., 2001).** De façon schématique, les composés solubles sont facilement absorbés: des composés tels le sulfate, le chlorure et le nitrate de nickel (11 %, 9,8 % et 34 % respectivement) sont donc rapidement absorbés. En revanche, les composés moins solubles comme le subsulfite et l'oxyde de nickel (0,47 %, 0,01 % respectivement) sont absorbés très lentement. Ces valeurs d'absorption en % sont en relation avec la solubilité des différents composés de nickel **(Kasprzak et al., 2003).** Dans le plasma, le nickel est essentiellement liée à l'albumine, l'alpha 2 globuline et à le L-histidine avec une demi-vie d'absorption chez l'homme variant de 1 à 2 jours. Chez l'animal, Après exposition par voie orale, la distribution du nickel s'effectue principalement dans les reins, mais il est également retrouvé au niveau du foie, du cœur, des poumons, du tissu adipeux, du système nerveux périphérique et du cerveau **(Tallkvist, 1997).** Après administration intra trachéale, 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, disulfure de trinickel), une grande partie de la dose est excrétée dans les fèces. La concentration de nickel dans l'urine et le plasma constitue un indicateur valable d'une exposition aux dérivés solubles du nickel **(ATSDR, 1997).**

1.4.Evaluation toxicologique

1.4.1. Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë accidentelle par voie orale provoque essentiellement des troubles digestifs (nausée, vaniteusement, diarrhée, douleur abdominale), des céphalées et une asthénie associés parfois à une bradycardie et une légère hyperthermie. Ces signes cèdent assez rapidement mais dans certains cas, peuvent persister quelques jours. D'après un rapport récent, l'ingestion chez plusieurs personnes de 15 à 45 mg/Kg de nickel en 24 heures (sous formes de chlorure) a entraîné également, dans quelques cas, une petite élévation de la bilirubinémie **(De-Brouwere et al., 2012).** Un cas mortel à été signalé; celui d'un enfant ayant ingéré environ 200 mg/kg de nickel (sous forme de sulfate). L'emploi des sels de nickel dans l'industrie peut produire une dermatite, cette lésion appelée eczéma du nickel « Nickel itch »; apparaît surtout chez les travailleurs occupés aux opérations de nickelage. Il s'agit d'un eczéma allergique, cependant que l'allergie respiratoire est rare **(Kolokitha & Chatzistavrou, 2009)**. Des études ont été pointé sur des animaux de laboratoire et in vitro, indiquent que les sels solubles de nickel tel que le dichlorure, le sulfate et le nitrate de nickel ont une toxicité aiguë qui varie de modérée à très élevée chez le rat [(DL_{50})] de 42,5 à 112 mg/Kg de masse corporelle, alors que la poudre de nickel et les sels de nickel insolubles (monoxyde de nickel vert ou noir, disulfure de trinickel et sulfure de nickel amorphe) présentent une toxicité plus faible (DL_{50} de 3235 à 9000 mg/Kg(m.c) **(Haney et al., 2012).**

1.4.2. Toxicité chronique et sub-chronique

Dans une étude de toxicité chronique au cours de laquelle des rats ont été exposés pendant deux années à du sulfate de nickel, par voie orale, à des concentrations de nickel de 100 et 2500 mg/kg/j, une diminution de gain du poids corporel. Le même traitement induit chez les chiens une augmentation de l'excrétion de l'albumine dans l'urine, diminution de gain du poids corporel et de la consommation d'aliment, des altérations des tissu hépatique et rénale **(Henderson et al., 2012).**

1.4.3. Cancérogénicité

Le lien potentiel entre l'exposition au nickel et le cancer à été étudie chez de nombreuses populations exposées en milieu de travail à du nickel présent surtout dans des composés inorganiques ou à l'état métallique. Dans l'analyse la plus poussée qui comportait un suivi supplémentaire de grandes cohortes, on a accordé une attention particulière aux concentrations et aux espèces des composés du nickel auxquels les travailleurs étaient exposés **(Wozniak et al**., **2002)**. On a observé une augmentation significative de la mortalité due au cancer du poumon chez les travailleurs qui ont surtout été exposés à des composés oxygénés et sulfurés du nickel. De plus, la mortalité due au cancer du nez était également plus élevée chez les travailleurs qui étaient principalement exposés à des composés solubles du nickel. Aucune information n'a été présentée au sujet d'une éventuelle exposition simultanée de ces travailleurs à des substances autres que le nickel **(Kasprzak et al., 2011)**.

1.4.4. Toxicité hépatique et rénale

Les lésions rénales se traduisent par une augmentation de la protéinurie tubulaire (excrétion de protéines de faible masse molaire) pouvant évoluer vers des dommages glomérulaires avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire se caractérisant par une excrétion urinaire de protéines de grande masse molaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium et réduction de la capacité de concentration des reins. Le nickel inhibe aussi la réabsorption de calcium en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie et à la formation d'un caillot **(Patel et al., 2012; Schaumlöffel, 2012).**

L'hépatotoxicité du nickel chez les modèles animales se traduit généralement par une augmentation des activités enzymatiques des transaminases (alanine aminotransférase, aspartate aminotransaminase), de la phosphatase alcaline et une diminution de la concentration sérique des protéines totales et de l'albumine. De plus, des atteintes hépatiques caractérisés par une nécrose des hépatocytes et une veine centrolobulaire dilatée ont été clairement observé aux rats exposés au nickel **(Pari & Amudha, 2011; Hattiwale et al., 2013; Tikare et al., 2013).** Dans le foie, le Ni(II) peut se conjuguer au glutathion (GSH) ou aux métallothionéines (MTs). Les complexes Ni(II)-GSH et Ni(II)-MTs formés arrivent ensuite au niveau des tubules proximaux où ils sont excrétés par 50% et réabsorbés par 50% par endocytose **(Henderson et al., 2012).** Les complexes réabsorbés sont dégradés par les

lysosomes libérant du nickel susceptible d'interagir d'autres composants cellulaires et de les endommager si le métal n'est pas repris en charge **(Patel et al., 2012).**

1.4.5. Toxicité pulmonaire

L'exposition répétée aux dérivés organiques du nickel produit une irritation des voies respiratoires (rhinite, ulcération de la cloison nasale, bronchite chronique). L'inhalation prolongée ou répétée de certains composés du nickel, entraîne essentiellement des signes naseaux et pulmonaires, il s'agit de réactions inflammatoires, interstitielles, d'une hyperthermie avec une évolution possible vers un emphysème ou une fibrose **(Oller et al., 2008)**. Ces symptômes ont été également observés chez les rats traites par 100 mg de Ni_3S_2/m^3 pendant 12 heures avec l'apparition d'emphysème et avec la présence des réactions inflammatoires au niveau des alvéoles à la dose de 2,5 mg/m^3 **(Zhang et al**., **2003)**.

1.5. Cytotoxicité du nickel

N'ayant aucun rôle physiologique connu à ce jour, le nickel ne possède pas de voie d'entrée ou de sortie qui lui soit spécifique. Il agit donc en mimant les métaux physiologiques afin de traverser les membranes cellulaires. Les particules non hydrosolubles du Ni(II) (e.g., Ni_3S_2 and NiO) entrent la cellule par phagocytose et l'ion de nickel va libérer de vésicules phagocytaires dans le cytoplasme et le noyau. D'une autre part, les ions des composés solubles du nickel (e.g., $NiSO_4$, $NiCl_2$, Ni(II) acétate) pénètrent dans la cellule à travers les canaux du calcium, le transporteur de métaux divalent de type I (DMT1) et diffusion **(Costa et al., 1994).** Dans la cellule, le Ni(II) peut lier aux déférentes composés et catalyse la formation des radicaux hydroxyles à partir de H_2O_2 **(Lu et al., 2005; Li et al., 2009)**. Le nickel est capable de générer les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en affectant ainsi l'ADN et les histones par des effets génotoxiques et de mutagénèse. Le nickel peut induire la mort cellulaire par apoptose via la voie intrinsèque ou extrinsèque, par l'activation de protéases à cystéine (caspases) et les facteurs pro-apoptotiques comme Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor = pièce principale de l'apoptosome) **(Lee et al., 2012).**

1.6. Radicaux libres générés par le Nickel

Les effets toxiques du nickel sont essentiellement indirects. Ce métal lourd non oxydoréducteur en milieu biologique provoquerait la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants. Des expositions courtes au Ni(II) semblent à inhiber les enzymes antioxydants comme la SOD la CAT et la GSH-Px**.** Par contre, des expositions

prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes **(Sanmiguel et al., 2013)** et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines, probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. De nombreuses études ont montré que le nickel est capable d'induire la formation des radicaux libres oxygénés responsables aux lipopéroxydations membranaires, lésions de l'ADN et oxydation des protéines (figure 01 **(Hassan et al., 2011; Henderson et al., 2012).**

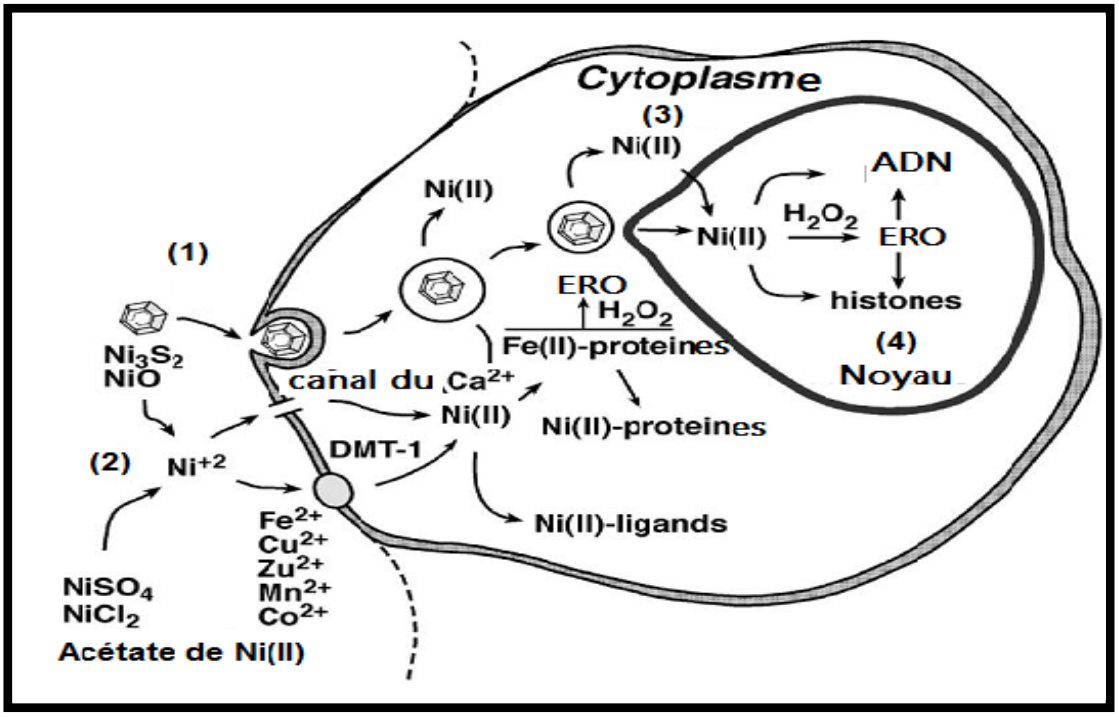


Figure 01: Transport du nickel et ses interactions avec les molécules majeures de la cellule (**Kasprzak et al., 2003):**

(1) Les composés non solubles de nickel sont phagocytés et les vacuoles libèrent les ions nickel dans le cytoplasme et le noyau cellulaire. **(2)** L'ion nickel des composés solubles peut atteindre le noyau cellulaire par solubilisation et diffusion ou par les systèmes de transport des ions métalliques ("Divalent Metal ion Transporter-1" : DMT-1). **(3)** L'ion nickel cytoplasmique forme des complexes avec des ligands non métalliques, comme les acides aminés, peptides, protéines et glutathion, dont certains sont redox-actifs catalysent la production d'**ESR** (Espèces Réactives à l'Oxygène). **(4)** L'ion nickel qui peut gagner l'intérieure du noyau et l'**ESR** généré par Ni(II) interagissent avec l'ADN et les histones, provoquant ainsi des dommages pro-mutagènes de l'ADN génomique (lésions non-réparées par inhibition des enzymes de réparation de l'ADN) et des altérations épigénétique (hyperméthylation de l'ADN et hypo-acétylation des histones).

2. Stress Oxydative

2.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue des espèces oxygénées activées (EOA) soit à une diminution de la capacité de défense antioxydant **(Seis et al., 1991).** La pollution, le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, la prise de pilule contraceptive, l'exposition immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont, par exemple, autant des sources de production d'EOA. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouvent la majeure partie des antioxydants nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydant (figure 02) **(Haleng et al., 2007)**. Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Un stress oxydant « pathologique » est ainsi potentiellement impliqué dans de nombreuses affections (plus de 200 ont été recensées) ou dans le développement de complications associées à celles– ci (e.g. diabète). A titre d'exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires tandis que celle de l'ADN se retrouve dans diverses étapes qui conduisent au développement de cancer **(Gey, 1998; Magder, 2006; Haleng et al., 2007).**

2.2. Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO^{\bullet}$ **(Valko et al., 2006).** D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singlet $^1O_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 03) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène.** Les radicaux de l'oxygène ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet}$) comme le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) ne sont pas très réactifs, mais constituent

des précurseurs d'autres espèces plus réactives **(Beyersmann & Hartwig, 2008).** La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxyles (ROO•) ou surtout le radical hydroxyle (HO•) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques; au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose **(Bal et al., 2011).** De plus, les ERO semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer **(Ciccarelli et al., 1982).**

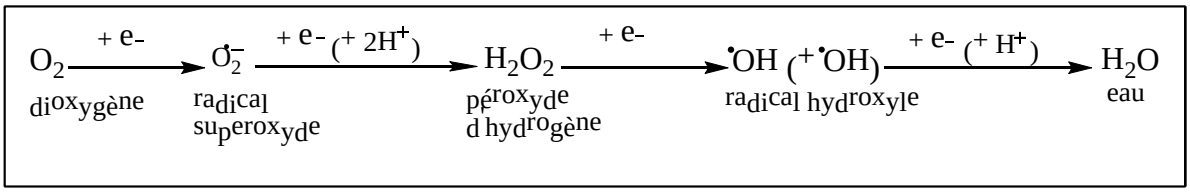


Figure 02: Intermédiaires réduits de l'oxygène; Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène **(Ahmed et al., 2013).**

2.2.1. Sources endogènes d'ERO

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des oxydants **:**

- Les NAD(P)H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent O_2 en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.
- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ERO (particulièrement O_2 et H_2O_2), lors de l'ischémie/reperfusion.
- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygenases, soit par les lipooxygenases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries ("centrale énergétique de la cellule") par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O. Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance comme indiqué précédemment à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$ qui pourraient intervenir dans l'oxydation des LDL **(Salvayre et al., 2003).**

2.3.Stress oxydant et conséquences cellulaires

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile. La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme **(Sies 1991)**. Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, des protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies **(Esterbauer et al., 1992).**

2.3.1. Peroxydation lipidique

Les ERO peuvent oxyder les lipides. Les métaux comme le cuivre et le fer on été largement utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène par HO° ou O_2° à des esters d'acides gras insaturés isolés ou constituants des membranes lipidiques **(Cadet et al., 2002)**. Le radical carboné du constituant lipidique tend alors à se stabiliser par un réarrangement conduisant au diène conjugué. Celui-ci réagit avec l'oxygène moléculaire et forme un radical peroxyle, lui même susceptible d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras. Un nouveau radical lipidique est ainsi généré, maintenant la réaction en chaîne. Il se produit ainsi des hydroperoxydes des lipides.

Lipide-H + HO° ⟶ Lipide° + H_2O → Transposition en diène

Lipide° + O_2 ⟶ Lipide-O2° (radical peroxyle)

Lipide-O_2° + Lipide-H ⟶ Lipide-O_2H (hydroperoxyde) + Lipide°

Les hydroperoxydes lipidiques sont peu stables dans les conditions physiologiques et de nombreux composés (métaux de transition, leurs complexes et des molécules telles que les hémoprotéines…) catalysent leur décomposition **(Denkhaus & Salnikow, 2002).** Un des principaux produits de dégradation est le malonedialdéhyde (MDA) qui altère la fluidité et la fonction des membranes, dont la composition en acides gras insaturés module l'oxydabilité. Ce produit est détecté par l'acide thiobarbiturique (formation de thiobarbituric acid reactants ou TBARS). On attribue par ailleurs aux peroxydes lipidiques un rôle toxique par réaction avec les thiols ou amines des protéines cellulaires et un rôle mutagène **(SanMiguel et al., 2013)**. La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques ou d'autres éléments contenant des lipides**.** Il apparaît une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation de récepteurs et d'enzymes membranaires. Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules. Le cerveau est un organe cible de la peroxydation lipidique car il est très riche en acides gras polyinsaturés **(Montagnier et al., 1998)**.

2.3.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraînent des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases. Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes. L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols **(Droge, 2002).** Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydants qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH). L'intégrité des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) **(Garrel et al., 2007).** Ces protéines, en perdant leurs propriétés biologiques, deviennent non seulement beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome, mais aussi très hydrophobes. Les carbonyles sont utilisés comme un marqueur de l'oxydation des protéines et de façon générale comme un marqueur du stress oxydant **(Hensley & Floyd 2002)**. En présence de peroxyde d'hydrogène, le cuivre et le fer peuvent libérer le radical HO° qui est le principal initiateur de l'oxydation de la chaîne polypeptidique. HO° entraîne le départ d'un atome d'hydrogène sur le carbone en alpha d'une liaison peptidique en donnant naissance à un radical centré sur le carbone. En l'absence d'oxygène,

deux radicaux centrés sur le carbone peuvent réagir entre eux pour former des liaisons croisées intra ou interchaînes. En présence d'oxygène, une réaction d'addition a lieu entre celui-ci et le radical centré sur le carbone pour conduire à un radical peroxyde. Il s'en suit une série des réactions complexes conduisant à la formation d'un radical alkoxyle, étape préalable à la fragmentation de la chaîne polypeptidique (Figure 03) **(Stadtman, 1993)**. La réaction des protéines avec les ERO peut également conduire à la formation de nouveaux radicaux organiques alcoxyle ou peroxyle. Ces radicaux peuvent endommager l'ADN **(Furukawa et al., 2005)**.

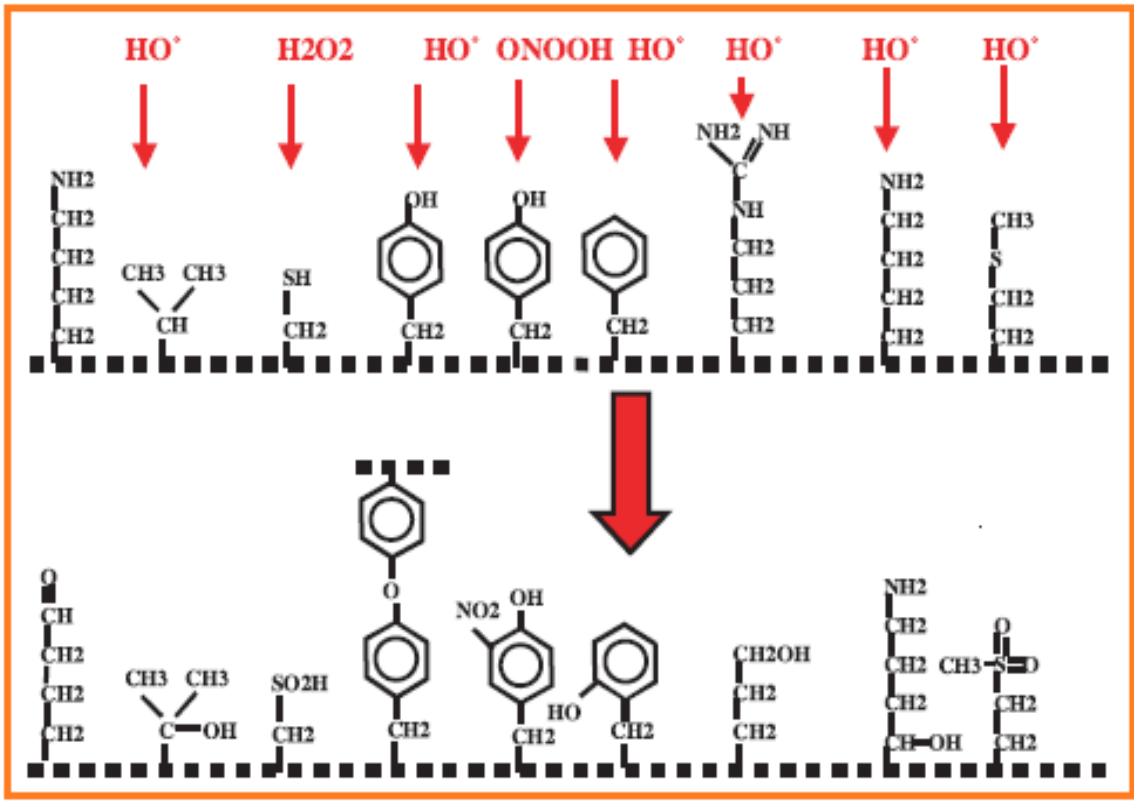


Figure 03 *:* Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire **(Favier, 2003).**

2.3.3. Oxydation des glucides

L'oxydation du glucose peut s'effectuer dans des conditions physiologiques en présence des ions métalliques conduisant à la libération d'aldéhydes et du peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation entraîne la glycation des protéines par attachement de l'aldéhyde conduisant souvent à la coupure de la chaîne protéique. La glycation des protéines favorise leur oxydabilité (réaction avec l'oxygène pour former des ERO) **(Hunt & Wolff 1991)**.

2.3.4. Altération de l'ADN

La transmission des caractères héréditaires d'une génération à une autre repose sur l'acide désoxyribonucléique (ADN). Identifié dès la fin du 19ème siècle par Miescher, Altmann et Kossel, l'ADN a été modélisé en 1953, par Watson et Crick. Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN: l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ERO cellulaires: la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, le taux des bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mitochondriale par rapport à l'ADN nucléaire. Selon la source des agressions, l'ADN est endommagé de différentes façons. On peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-oxo-2'- hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques. La figure ci-dessous illustre ces différents dommages (figure 04) **(Stohs et al., 1995).**

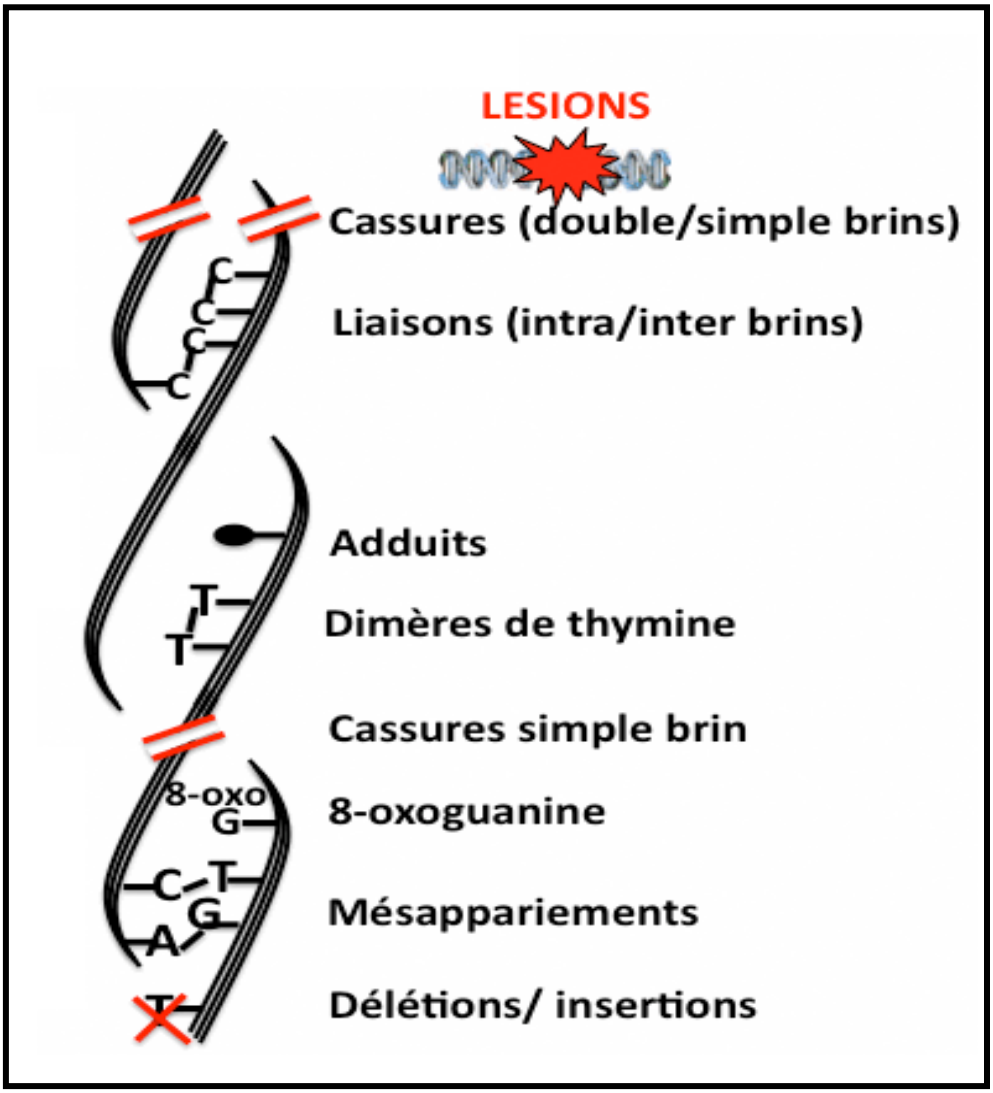


Figure 04 *:* Principales classes des dommages de l'ADN **(Stevnsner et al. 2002)**.

2.4.Les systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO. Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable. Il existe 3 types de défenses :

- Les enzymes qui existent à l'état endogène, défendent les cellules contre les radicaux libres. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases (SODs), la catalase (CAT), les peroxydases oxydases réductases (GSH-Px et GRase) et le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.
- Les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémosidérine ou du cuivre comme la céruloplasmine et l'albumine. Ce système bloque les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.
- Les molécules antioxydantes ou piégeurs des radicaux libres comme la vitamine E connue pour son activité antiradicalaire très puissante. Elle intervient au niveau des membranes lipidiques. Comme autres molécules piégeur on peut citer la vitamine C, les caroténoïdes, l'acide urique, le glutathion et les thiols, les métallothionéines **(Sies, 1997; Droge, 2002)**.

2.4.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes existent à l'état endogène et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal.

2.4.1.1. Les superoxydes dismutases (SODs)

Ce sont des métalloenzymes retrouvées dans toutes les cellules animales ou végétales. Leur structure forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, puits dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera un type précis. Il existe trois types de SOD chez l'homme notamment:

- Une SOD cytoplasmique possédant une masse molaire apparente d'environ 32 kDa. Elle a été isolée pour la première fois en 1938 à partir du sang de bœuf, d'où sa première dénomination d'hématocupréine. La présence de cuivre et de zinc dans sa structure lui confère une couleur bleu-vert et elle fut considérée comme ayant un rôle dans le stockage de ces métaux. La fonction antioxydant de cet enzyme est de dismuter les ions superoxydes d'où son nom de superoxyde dismutase. Cette enzyme est formée de deux

sous unités contenant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc**.** Les ions cuivre sont nécessaires à son activité catalytique alors que les ions zinc stabilisent la molécule. Elle est sensible à l'inhibition par le cyanure et semble protéger le cytosol.

- Une SOD située au niveau mitochondrial. Elle est la première SOD à avoir été isolée d'Escherichia coli. Le superoxyde dismutase humaine est de couleur rose en raison de la présence de manganèse au niveau du site actif de l'enzyme. Celle-ci présente un poids apparent de 80-96 kDa et comporte quatre sous unités contenant chacune un atome de manganèse et 196 acides aminés. Elle résiste assez bien à l'inhibition par le cyanure contrairement à la Cu/Zn-SOD. Elle correspond à la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) et c'est l'une des enzymes ayant une activité antioxydante la plus efficace **(Haddad, 1999).**
- Une SOD extracellulaire ou Cu/Zn-SOD extracellulaire qui est immunologiquement différente de l'enzyme cytosolique, et qui est exclusivement synthétisée par certains types cellulaires dont les cellules endothéliales et les fibroblastes. En collaboration avec la glutathion peroxydase, elle constitue la première ligne de défense contre les oxydants **(Rahman et al. 2006)**. Décrite par **Marklund en 1985**, la SOD extracellulaire est une glycoprotéine tétramérique de masse molaire voisine de 135 kDa dont chaque sous unité de 30 kDa (240 acides aminés) comporte un atome de cuivre et un atome de zinc. Les différentes SODs catalysent la même réaction avec une efficacité comparable (figure 05). Elles accélèrent la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène **(Garrel et al., 2007).**

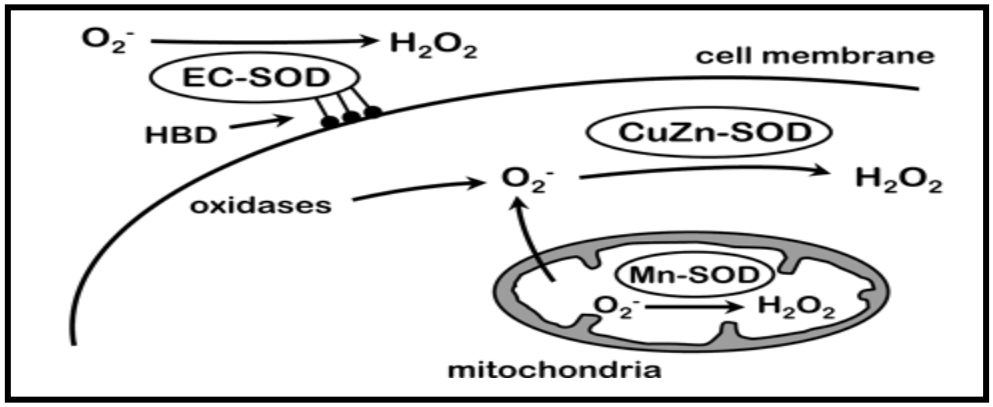


Figure 05 : Les trois types de la SOD **(Garrel et al., 2007).**

2.4.1.2.La catalase

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SODs doit être rapidement métabolisé par la catalase et la glutathion peroxydase pour que la protection apportée par les SODs soit effective **(Rahman et al., 2006)**, sinon, l'accumulation de H_2O_2 peut être nocive. C'est le cas des patients atteints d'une trisomie 21, qui ont une activité 1,5 fois supérieur à la normale. En effet, la mutation du gène codant pour la Cu/Zn-SOD (gène situé sur le chromosome 21) provoque une accumulation du H_2O_2, ce qui peut expliquer le vieillissement précoce chez les sujets trisomiques. La mutation du gène de Cu/Zn SOD peut être à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique (SLAF) qui est caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs **(Rosen et al., 1993).** La catalase est une enzyme héminique présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes. La catalase humaine, possédant une taille d'environ 240 kDa, est formée de quatre sous-unités, chacune comportant un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+}. Elle catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène (particulièrement dangereux car il donne facilement naissance à HO° dans un milieu où existent des traces de fer) en eau et en oxygène. La catalase et la GSH-Px appartiennent au mécanisme de défense secondaire contre les ERO en catalysant la conversion du H_2O_2 en H_2O. L'augmentation de tumeur peut être liée à la décroissance du taux de catalase **(Volke et al., 2013).**

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

2.4.1.3.Glutathion peroxydase (GSH-Px)

La glutathion peroxydase (GSH-Px) possédant une masse molaire d'environ 85 kDa est formée par quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous sa forme sélénocystéine qui constitue le site actif de l'enzyme. Cette enzyme qui se localise dans la mitochondrie et dans le cytosol, décompose les hydroperoxydes organiques et peroxyde d'hydrogène. Elle réduit un grand nombre de ces peroxydes avec des vitesses comparables. L'enzyme possède une grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition; il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG). La GSH-Px est donc en compétition avec la catalase pour le substrat H_2O_2 et est la source majeure de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant (figure 06; A et B) **(Meister, 1994; Valko et al., 2007).**

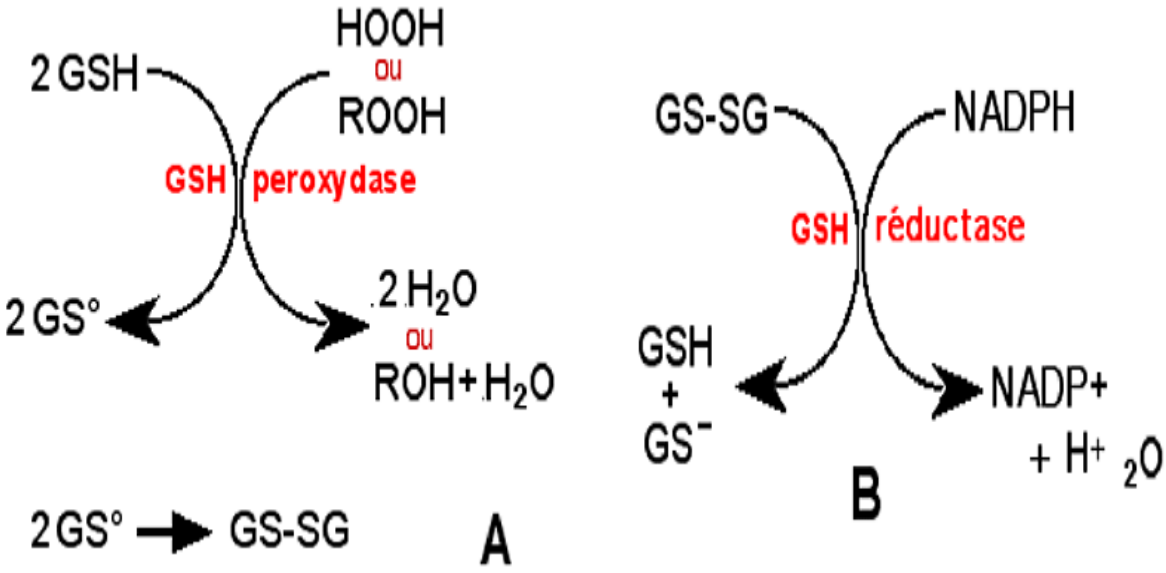


Figure 06 *:* **A ;** Le glutathion (GSH) intervient comme co-facteur dans la GSH peroxydase. « R » peut être une chaîne carbonée (ROOH : lipoperoxyde) ou un atome d'hydrogèn (H_2O_2: peroxyde d'hydrogène). **B *:*** Régénération du GSH par la GSH réductase **(Meister, 1994). .**

La GSH-Px est présente en quantité variable selon les espèces et les tissus. Chez l'homme, il existe 4 différentes peroxydases séléno-dépendantes. Son taux intracellulaire est étroitement dépendant de la concentration en sélénium. Elle réduit, en présence de glutathion réduit (GSH), H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH) **(Oberley & Oberley, 1997)**. L'efficacité de la GSH-Px est liée à un flux constant de GSH et elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phospho gluconate source de NADPH qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le glutathion réduit (GSH). Une autre GSH-Px a été caractérisée en 1982. Il s'agit d'un phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (PH-GSH-Px) membranaire. Cette enzyme présente un certain nombre de différences avec la GSH-Px: masse molaire plus faible (monomère de 20 kDa); elle est lipophile; spécificité envers les hydroperoxydes lipidiques notamment les

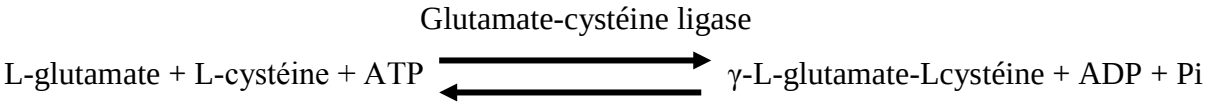
hydroperoxydes phopholipidiques et de cholestérol ; rôle unique contre la peroxydation lipidique **(Thomas et al., 1990).**

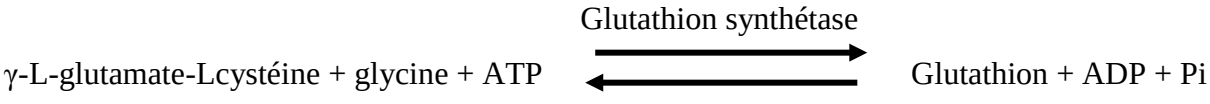
2.4.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

L'organisme se protège par un ensemble de systèmes antioxydants. Certains composés antioxydants comme les vitamines E, C, l'ubiquinone ou les caroténoïdes apportés par les aliments agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. Des composés endogènes jouent le même rôle, dont le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes. D'autres composés antioxydants ont été identifiés, notamment les métallothionéines.

2.4.2.1.Le glutathion

Le glutathion, première ligne de défense antiradicalaire, existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH) en abondance dans le milieu intracellulaire, et l'autre oxydée (GSSG). Le GSH ou γ-glutamyl-cystéinyl-glycine est le plus abondant thiol libre non protéique dans les cellules de mammifères. Sa concentration est comprise entre 0,5 et 10 mM, alors qu'elle oscille entre 0,5 et 10 µM dans le plasma. La synthèse intracellulaire de cette molécule implique deux réactions enzymatiques ATP dépendantes. C'est la γ- glutamyl-cystéine synthétase (glutamate-cystéine ligase) qui régule la biosynthèse. Le GSH ainsi formé va avoir un effet inhibiteur sur cette enzyme **(Cadet et al., 2002).**





La liaison γ-glutamyl ainsi que la fonction thiol du GSH lui confèrent un grand nombre de fonctions: le transport des acides aminés, la synthèse de nucléotides de l'ADN par le biais de la ribonucléotide réductase, la synthèse des œstrogènes, des prostaglandines et des leucotriènes, la détoxification des métaux lourds et autres xénobiotiques par action directe ou

indirecte. La forme réduite joue un rôle dans la détoxication en réagissant avec H_2O_2 ou ROOH. De façon générale, l'augmentation de GSH permet à la cellule de mettre en place des mécanismes de défense alors qu'aux fortes concentrations du toxique, les systèmes antioxydants sont submergés et la synthèse diminue **(Kubrak et al., 2012).**

Le glutathion (GSH) est impliqué dans de nombreux processus métaboliques, parmi lesquels le maintien des communications intercellulaires et la prévention de l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il piège les espèces réactives de l'oxygène car il réagit notamment avec le radical hydroxyle. Il est intéressant de noter que le GSH peut chélater les ions Cu^+ et ainsi limiter leur participation à la génération des radicaux libres par la réaction de Fenton. Dans certaines conditions physiologiques, le GSH protège l'ADN contre $^1O_2$ **(Droge, 2002).** L'action concomitante du superoxyde dismutase (SOD) peut être nécessaire pour éliminer l'anion superoxyde formé par la réaction entre l'anion thiolate, le radical thiyle et l'oxygène. Le GSH est aussi un substrat des glutathions peroxydases (GSH-Px). Cette enzyme antioxydante utilise le GSH comme source principale d'hydrogène **(Lee et al., 2012).** La réaction nécessite deux molécules de GSH et produit une molécule de GSSG. Le GSSG formé est soit expulsé soit régénéré dans les conditions physiologiques par le système glutathion réductase/NADPH. Le ratio GSH/GSSG est hautement régulé par le système glutathion réductase. Cependant, si le niveau de stress excède la capacité de la cellule de réduire le GSSG, ou d'autres facteurs limitant la réaction de réduction de GSSG, GSSG peut s'accumuler. Par conséquent, le rapport de GSH/GSSG est un indicateur dynamique du stress oxydant **(Das et al., 2007)**.

2.4.2.2.Métallothionéines (MTs)

De nombreuses protéines possèdent dans leur structure propre ou fixent sur certains de leurs sites actifs des ions métalliques et sont donc rassemblées, par commodité de langage, sous le terme de métalloprotéines. A l'intérieur de ce groupe des protéines, une distinction est faite entre celles qui possèdent une activité enzymatique (les métalloenzymes) et celles qui n'en possèdent pas. A ces dernières appartiennent les métallothionéines (MTs), qui sont des dérivés métalliques d'une protéine riche en soufre, la thionéine **(Lee et al., 2012).** Il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à des doses sublétales de certains métaux tels que le nickel, le zinc et le cuivre, il y avait induction de la synthèse de thionéine qui par liaison avec un métal forme la métallothionéine. Les liaisons soufre/métal chez ces protéines sont formées préférentiellement par la coordination tétraédrique d'un ion métallique par les groupements

thiols de cystéines régulièrement espacées le long de la structure primaire de la protéine **(Haddad, 1999).**

2.4.3. Les antioxydants exogènes

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les oligoéléments (zinc, cuivre, cobalt…etc.), les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables **(Das et al., 2007).** La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases **(Valko et al., 2006).** Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons).

2.4.3.1. Les oligoéléments

Les oligoéléments sont présents à une teneur inférieure à 1 mg/kg de poids corporel (**Horovitz, 1988)**. Ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme: ils interviennent dans de nombreux processus biologiques, soit comme constituants (exemple: calcium), soit comme cofacteurs dans divers métabolismes (ex : fer et hémoglobine pour le transport de l'oxygène). Certains de ces éléments sont nécessaires dans des quantités de l'ordre du gramme (exemple : calcium), ce sont des macro-éléments, d'autres dans des quantités de l'ordre de quelques milligrammes : ce sont les oligo-éléments. Tous doivent être apportés par une alimentation équilibrée car l'organisme ne peut pas les synthétiser (Chappuis, 1991). De plus, ces oligoéléments possèdent des propriétés antioxydants par l'activation des systèmes antioxydants enzymatiques. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GSH-Px de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (Rahman et al., 2006).

Parmi les oligo-éléments, on trouve le fer, le zinc, le cuivre le manganèse, le sélénium, le chrome, le cobalt etc...qui sont sous forme de cations.

Le fer:

L'organisme humain contient 3 à 4g de fer. Il existe sous deux formes : fer fonctionnel (dans l'hémoglobine et myoglobine où il assure notamment le transport de l'oxygène) et fer de réserve (stocké dans le foie, la rate, la moelle osseuse au sein des protéines) **(Favier et Maljournal, 1980)**. Les besoins quotidiens en fer sont de l'ordre de 20mg pour un adulte. Les conséquences d'une carence en fer sont très importantes : fatigabilité, anorexie, apathie, troubles du sommeil, vulnérabilité vis à vis des infections. On trouve cet oligo-élément dans les viandes (notamment le foie), volailles, poissons, œufs et aliments d'origine végétale **(Favier et Maljournal, 1980).**

***Le zinc*:**

Il participe à plus de 70 activités enzymatiques différentes et intervient aussi dans la croissance et l'immunité. Les principales sources alimentaires sont les produits laitiers et les œufs, les féculents et produits de la mer. Il est localisé au niveau de la peau, des cheveux et du foie. Une carence en zinc provoque notamment un retard de croissance. Les besoins journaliers sont d'environ 15mg/jour **(Favier, 1992).**

Le cuivre:

Il intervient dans de nombreuses activités enzymatiques ainsi que dans le fonctionnement du système nerveux. On le trouve beaucoup au niveau des tissus nerveux et du foie. L'apport journalier recommandé est d'environ 2mg. La carence en cuivre peut être responsable de maladies de la peau ou de troubles nerveux. Par ordre croissant, on va retrouver le cuivre dans les aliments suivants : le foie, les crustacés et coquillages, chocolat, céréales complètes et riz complet. Il peut être présent aussi dans l'eau de consommation car les canalisations sont en cuivre **(Horovitz, 1988).**

Le manganèse :

Il est nécessaire à l'activation de certaines enzymes. On retrouve les concentrations les plus élevées dans le foie, le pancréas, le rein et le cerveau; d'ailleurs le foie semble être le premier organe accumulateur de manganèse. Les végétaux sont tous riches en manganèse, surtout les noix, les graines et le thé. Le lait maternel n'est pas très riche en cet oligo-élément mais il y est présent sous une forme particulièrement assimilable. L'apport journalier recommandé est d'environ 7mg. Pour un adulte, il n'ya pas de carence connue, mais la maturation du système

nerveux cérébral du fœtus semble nécessiter une présence de manganèse plus importante que chez l'adulte et une carence maternelle peut être responsable d'un déficit de croissance cérébral (**Favier et Maljournal, 1980)**.

Le sélénium :

C'est un constituant d'une enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant. Son rôle lui donne une réputation d'anti-cancer et d'antivieillissement. On constate effectivement une augmentation du nombre de cancers dans les régions où le sol est pauvre en sélénium et une carence en sélénium peut provoquer aussi l'insuffisance cardiaque par dilatation du cœur. Les meilleures sources en sélénium sont les aliments riches en protéines (viandes, poissons et autres produits de la mer, ail, noix et champignons). Les besoins journaliers sont de l'ordre de 0,8 à 1,2mg mais qui ne semblent couverts, en moyenne, qu'à 80%. De plus, le sélénium joue comme un cofacteur dans l'activité enzymatique du GSH-Px **(Mertz, 1986).**

2.4.3.2.Vitamine E (α-tocophérol)

a- Propriétés chimiques

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone, ce qui le différencie nettement est de l'ascorbate qui, lui, est hydrosoluble. Le d-α-tocophérol est donc localisé parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines.

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par **Evans et collaborateurs**. Ce nom provient du grec *tokos* pour progéniture et *pherein* pour porter. Cette famille comprend quatre substances : l'α-tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β-tocophérol, le γ-tocophérol et le δ-tocophérol. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec quatre autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l'α-tocotriénol, le β-tocotriénol, le γ-tocotriénol et le δ-tocotriénol **(Surai, 2002)**. Leurs structures chimiques se composent d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri méthyle auquel est rattachée une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique (figure 07). Cette chaine permet de définir les deux grandes familles: les tocophérols, à chaîne latérale saturée et les tocotrienols, avec une chaîne latérale présentant trois instaurations. La désignation α, β, γ ou δ dépend du nombre et de la position des groupements méthyles sur le cycle aromatique.

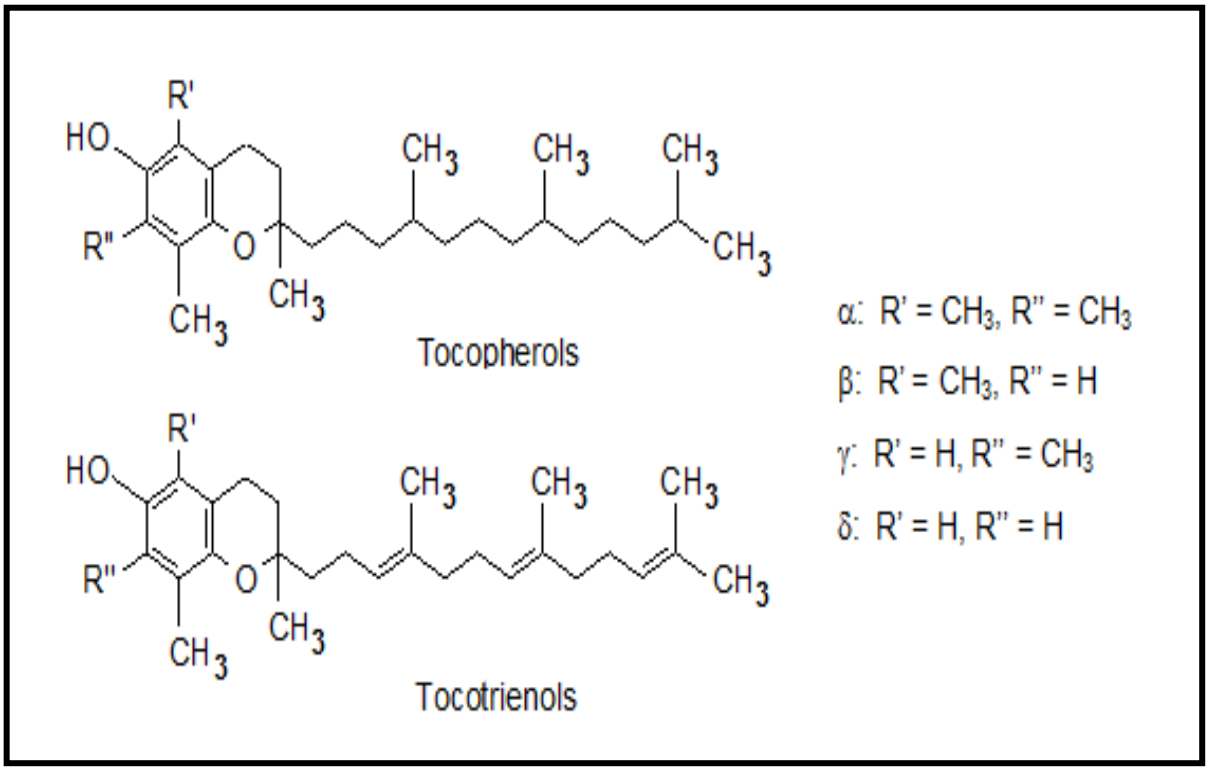


Figure 07 : Structure chimique de la vitamine E **(Lindsay and Astley, 2002).**

b- Métabolisme de la vitamine E

La vitamine E n'est pas dégradée dans le haut du tube digestif humain. Seule une partie de la vitamine E contenue dans les aliments est absorbée. La digestion de la vitamine E suit celle des lipides alimentaires. Elle est incorporée dans les micelles mixtes issues de la digestion des lipides et est absorbée dans le duodénum. Il est admis que la vitamine E est incorporée sous forme libre dans les chylomicrons. Ce processus implique la MTP (microsomal triglycerides transfert protein). En cas de faible apport alimentaire des lipides ne permettant pas la sécrétion de chylomicrons, une partie de la vitamine E semble être excrétée dans les HDL d'origine intestinale par un transporteur de la famille des ATP binding cassettes de la famille A1 (ABCA1) **(Anwar et al., 2006; 2007)**. La vitamine E restant dans les chylomicrons résiduels, c'est- à- dire celle qui n'a pas échangée avec d'autres lipoprotéines ou distribuée aux tissus périphériques lors de la lipolyse par les lipases endothéliales, est captée par le foie. L'a-tocophérol est incorporée dans les lipoprotéines a plus faible densité

(Very Low Density Lipoprotein : VLDL), selon un mécanisme non élucide, ce qui va permettre sa distribution aux tissus périphériques **(Lindsay et Astley, 2002).**

c- Sources alimentaires

La nature et la répartition des tocophérols/tocotriénols au sein des aliments font l'objet d'une littérature abondante, présenté de contradictions entre les différents auteurs. Ceci est principalement dû, d'une part à l'évolution des méthodes de dosage et d'autre part à la variabilité des teneurs dans les échantillons. Les sources alimentaires de vitamine E sont soit d'origine végétale, soit d'origine animale **(Bonvehi et al., 2000):**

- Les produits d'origine végétale constituent la source majeure de vitamine E, les aliments les plus riches étant les céréales et les huiles;
- Les céréales contiennent généralement les 4 formes de tocophérol et très souvent aussi des tocotriénols. Les teneurs en tocophérols et tocotriénols de quelques céréales, ainsi que celles de la fève de soja sont présentées dans le tableau 2. Il apparaît que la concentration en α-tocophérol est relativement faible par rapport à celle en tocotriénols. Par exemple, dans le blé, la teneur en α-tocophérol est similaire à celle du groupe β + γ-tocophérol mais la teneur en β + γ-tocotriénol est 3 à 4 fois plus élevée. C'est également le cas pour l'orge. Au niveau de l'avoine, l'α-tocotriénol est la forme prédominante, tandis que dans le maïs et la fève de soja, le groupe β + γ-tocophérol présente les concentrations les plus importantes **(Surai, 2002).**
- Les huiles végétales constituent la meilleure source de tocophérols/ tocotriénols. A titre d'exemple, les teneurs varient de 10 à 1000 mg/kg dans l'huile de maïs (tableau 03).
- Dans les huiles végétales, les formes de vitamine E les plus fréquemment rencontrées à ce niveau sont l'α- tocophérol et le γ-tocophérol ; L'huile de palme est la seule à contenir l'α-, le γ- et le δ-tocotriénol. Le beurre de cacao et l'huile de noix de coco contiennent également des tocotriénols, mais en moindre quantité. L'huile de tournesol ne renferme que de l'α-tocophérol, qui est aussi la forme prédominante dans l'huile d'olive. Le γ-tocophérol est le représentant majeur dans l'huile de noix et l'huile de maïs. L'huile de soja, quant à elle, contient surtout du γ-tocophérol et du δ-tocophérol **(Li et al., 2003).** Enfin, il faut remarquer que l'huile de noix de coco est l'huile la plus pauvre.
- Les fruits et légumes sont également des sources de vitamine E, mais dans une moindre mesure:
- Les fruits contiennent des quantités faibles, à l'exception des mûres (4,3mg/100g).

- Les pommes et les poires renferment plus de vitamine E dans la peau que dans la chair; dans les légumes, le taux de vitamine E dépend de la partie de la plante, il est élevé dans les feuilles et surtout dans les feuilles vertes à maturité **(Nakamura & Omaye, 2008).**
- Au niveau des produits d'origine animale, il faut signaler que la vitamine E est présente essentiellement sous forme d'α-tocophérol mais en quantité assez restreinte dans les tissus animaux (muscles et organes).
- Dans le lait de vache, la forme α-tocophérol est largement prédominante. La richesse en vitamine E du lait et des produits qui en dérivent dépend de l'alimentation des vaches **(Bonvehi et al., 2000).**

Tableau 02 : Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale, en mg/kg (**Surai, 2002)**.

Aliment	Tocophérols			Tocotriénols	
	α	**β et γ**	**δ**	**α**	**β et γ**
Blé	9	7 .7	0.3	4.2	41.9
Orge	5.7	3.9	0.3	19.5	16.9
Maïs	13.7	46.1	-	-	-
Avoine	3 .4	1.8	0.4	8.1	1.9
Fève de soja	4.1	19.5	4.7	0.3	0.8
Huile de maïs	488.1	1015.8	31 .0	14	17.1

Tableau 03 : Teneurs en tocophérols et tocotriénols de produits d'origine végétale, déterminées avec et sans saponification (**Bonvehi & collaborateurs, 2000).**

Aliment	Tocophérols (µg/ml)			Tocotriénols (µg/ml)		
	α	**γ**	**δ**	**α**	**γ**	**δ**
Huile de palme	198	-	11	219	408	87
Huile de tournesol	765	-	-	-	-	-
Beurre de cacao	14	225	37	9	-	-
Huile de noix	12	517	61	-	-	-
Huile de noix de coco	3	-	13	8	32	-
Huile de noisette	525	68	17	-	-	-
Huile de maïs	263	1365	88	-	-	-

d- Rôle physiologique

Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxyles lipidiques $RO_2^{\cdot}$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (symbolisée ici par α-TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α-tocophéryle (α-$T^{\cdot}$), tandis que le radical peroxyle est réduit en une molécule d'hydroperoxyde **(Hassan et al., 2011).** De plus, l'α tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $HO_2\cdot$), les radicaux hydroxyles $^{\cdot}OH$, ainsi que l'oxygène singulet $^1O_2$ (espèce réactive de l'oxygène, non radicalaire). Bien que la concentration d'α-tocophérol soit relativement faible in vivo (2.10^{-5} $mol.l^{-1}$ dans le sang), le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises **(Kinsky, 1989).**

$$RO_2^{\cdot} + \alpha\text{- TH} \longrightarrow RO_2H + \alpha\text{-}T\cdot$$

2.4.3.3.Vitamine C (acide ascorbique)

a- Propriétés chimiques

Facteur vitaminique hydrosoluble indispensable à l'homme et à de nombreuses espèces animales, l'acide L-ascorbique, de formule brute $C_6H_8O_6$, est aussi appelé vitamine C. Sa carence alimentaire provoque l'apparition de tuméfactions douloureuses gingivales et articulaires, de lésions osseuses et d'hémorragies, l'ensemble constituant la plus anciennement décrite des avitaminoses: le scorbut. L'acide L-ascorbique se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans l'eau et l'alcool, insolubles dans les solvants des graisses. La solution aqueuse est dextrogyre. Le groupement essentiel de la vitamine C est la fonction ène-diol avec ses hydrogènes mobiles qui confèrent à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique, plombique, etc.). Cette fonction est également impliquée dans le rôle physiologique de cette vitamine **(Levine et al., 1999)**. L'acide ascorbique s'oxyde facilement, surtout en milieu alcalin, en acide déhydroascorbique, les deux formes étant physiologiquement actives et présentes dans les liquides de l'organisme. L'action réductrice de l'acide ascorbique sert de base à la détermination chimique du composé; dans la plupart des tissus animaux et végétaux, c'est la seule substance qui manifeste cette activité réductrice en

milieu acide. À pH acide, l'acide ascorbique décolore le 2,6-dichloro-phénol-indophénol ; la réaction est quantitative et permet une microdétermination de l'ascorbémie **(Hattiwale et al., 2013).** L'acide ascorbique et déhydroascorbique sont dosés par formation d'hydrazones avec la 2,4-dinitro-phényl-hydrazine. La plupart des animaux, sauf les primates et le cobaye, effectuent la synthèse de la vitamine C à partir de l'acide D-glucuronique qui est dans un premier temps réduit par une déshydrogénase à NADP en acide L-gulonique. Celui-ci est transformé en lactone par une lactonase, et un système microsomial oxyde la L-gulonolactone en 2-céto L-gulonolactone **(Wandzilak et al., 1994)**.

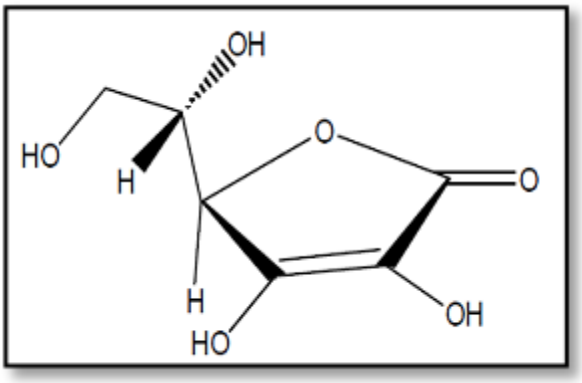


Figure 08 : Structure chimique de la vitamine C **(Richard, 2001).**

b- Métabolisme de la vitamine C

La vitamine C est hydrosoluble, il est bien absorbé dans l'appareil gastro-intestinal et absorbé par le petit intestin à l'intermédiaire d'un mécanisme de transport actif. Le transport cellulaire de la vitamine C est possible par des ***transporteurs sodium-dépendant*** de la vitamine C (Sodium-Dependent Vitamin C Transporters ; ***SVCT1*** et ***SVCT2***) **(Tsukaguchi et al., 1999).** L'acide ascorbique est largement distribué dans tous les tissus du corps, avec des niveaux plus élevés remarqués dans les glandes surrénales et la rétine, et des niveaux faibles dans les reins et les muscles. Dans le plasma, la vitamine C se trouve soit sous forme libre ou bien liée à l'albumine**.** La concentration de l'acide ascorbique est basse (5-15 mg/l) dans le plasma et les globules rouges mais elle est très élevée dans les plaquettes et les globules blancs (80 fois supérieur)**.** L'hypophyse et la corticosurrénale sont les organes les plus riches en acide ascorbique alors que le muscle et le foie ont les concentrations les plus

faibles. De plus, la vitamine C est réabsorbée a plus de 90% au niveau tubulaire rénal après filtration glomérulaire **(Liang et al., 2001).** La vitamine C est métabolisée dans le foie et les reins, avec une série des réactions. Les formes non métabolisés de la vitamine C, comme l'oxalate sont en grande partie excrétés dans l'urine, l'élimination urinaire se fait sous forme native ou sous formes des métabolites **(Li et al., 2003).**

d. Sources alimentaires

La vitamine C est présente dans tous les végétaux, mais en quantités variables. Les principales sources de vitamine C sont les fruits (agrumes, fruits rouges) et les légumes (Tableau 04). Pour assurer la couverture des besoins quotidiens en vitamine C, il est recommandé de consommer environ 500 g de fruits et légumes par jour.

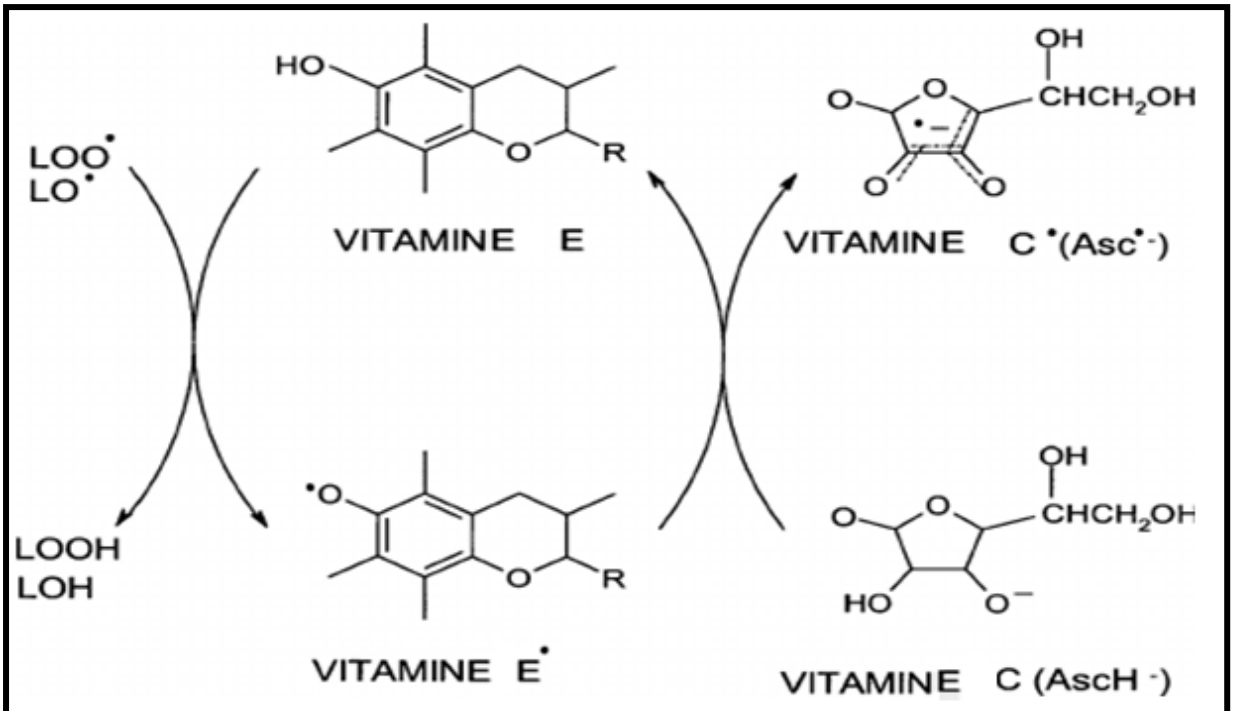
Tableau 04 : Les aliments les plus riches en vitamine C **(Richard, 2001).**

Sources alimentaires	Teneur en mg/100g d'aliment
Cynorhodon (baie d'églantier)	**1 250 à 3 000**
Cassis frais, persil frais	**200**
Poivron, brocoli, radis noir, raifort, navet, chou vert cru, kiwi, fraise, ris de veau braisé, cresson	**60 à 180**
Chou rouge cru, céréales enrichies pour petit-déjeuner, orange, citron frais, jus d'orange, mangue fraîche, lime, clémentine, jus de pamplemousse frais, chou-fleur, jus de citron frais, salade verte, fruits rouges, melon et haricot vert.	**25 à 57**

c- Rôle physiologique

❖ **C'est un puissant antioxydant *:*** La vitamine C agit principalement en piégeant directement les ERO (majoritairement l'$O2^{\bullet -}$ et l'$ONOO^-$). Elle La est aussi capable de recycler la vitamine E radicalaire (alpa-tocophéryl) en vitamine E active (alpha-tocophérol). La vitamine C devient à son tour radicalaire puisqu'elle a perdu un électron au profit de la vitamine E. Elle sera régénérée par un antioxydant enzymatique: Le glutathion sous sa forme réduite (GSH), lui-même régénéré à l'aide de NADPH et de l'enzyme glutathion réductase (GSH-R) **(Figure 09).**

Dans l'organisme, la concentration d'ascorbate (vitamine C) est comparable à celle du glutathion puisqu'elle peut atteindre 10^{-3} $mol.l^{-1}$ dans certains types cellulaires. La molécule d'acide ascorbique et sa forme déprotonée, l'ascorbate (présent majoritairement à pH physiologique), sont des agents réducteurs. L'ascorbate est un très bon capteur des radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $^{\cdot}OH$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$ (et leur forme protonée $HO_2^{\cdot}$), ce qui est tout à fait remarquable puisque ces derniers sont connus pour être très peu réactifs. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxyles $RO_2^{\cdot}$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate (symbolisé ici par $AscH^-$) est oxydé en radical ascorbyle $Asc^{\cdot -}$ qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques **(Frei, 2004).** Par conséquent, à l'opposé du radical thiyle $GS^{\cdot}$ susceptible d'initier de nombreuses réactions secondaires, le radical ascorbyle $Asc^{\cdot -}$ ne développe pas des réactions ultérieures dommageables. Une propriété importante de l'ascorbate est la « réparation » possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l'α-tocophérol (symbolisé par α-TH) à partir de leurs formes radicalaires. L'acrobate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle)) Par interaction avec un radical lipidique $R^{\cdot}$, la vitamine E (T-OH) se transforme en un radical tocophéryle ($T\text{-}O^{\cdot}$). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la vitamine C (Asc) qui, à son tour, prend une forme radicalaire ($Asc^{\cdot}$) **(Valko et al., 2004).** Cette réaction est indiquée dans la figure ci-dessous **(**figure 09).



Vitamine E: Vitamine E active (alpha-tocophérol) ;
Vitamine E˙ : Vitamine E radiculaire (alpha-tocophéryl).
Vitamine C : Vitamine C active ; **Vitamine C˙ :** Vitamine C radiculaire.
LOO˙ : Radical peroxyle lipidique ; **LOOH**: Hydroperoxyle lpidique.

Figure 09 : Réaction de la vitamine E avec des radicaux péroxyles et la régénération de la vitamine E radiculaire (alpha-tocophéryl) par la vitamine C **(Valko et al., 2004).**

- **Elle a une action antianémique *:*** La vitamine C a une action antianémique par son rôle dans la synthèse des globules rouges et son effet facilitateur de l'absorption du fer. Pour des végétariens, cette vitamine est particulièrement intéressante car elle augmente l'absorption de fer, primordiale dans la formation et le maintien du collagène (tissu conjonctif), essentiel pour les vaisseaux artériels et veineux, les tendons, les os, les dents, la cicatrisation. Elle prévient également le vieillissement prématuré **(Oda et al., 2012).**

- **Elle participe aussi au bon fonctionnement du système nerveux :** La vitamine C peut convertir certains acides aminés en neurotransmetteurs, comme la norépinéphrine. Certains de ces médiateurs ont des effets stimulants sur l'humeur ; la vitamine C a ainsi un effet antifatigue **(Schaumlöffel, 2012).**

Chapitre 02:

Matériels & Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Nous avons travaillé sur des souris mâles, Swiss albinos (Mus musculus), pesant entre 29 et 33 g et fournies par l'annexe de Kouba de l'Institut Pasteur de l'Algérie. Les souris d'expérimentation sont hébergés dans l'animalerie du laboratoire où règne une température constante (22±2°C) et une photopériode naturel (12 h jour/12h nuit) et une humidité d'environ 40%. Les animaux ont accès à volonté à l'eau et à la nourriture (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail,

El-harouche) dont la composition est équilibrée en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux (tableau 05).

Tableau05 : Composition alimentaire des souris d'expérimentation **(Southon et al., 1984).**

Composants alimentaires	**Quantité d'aliment (g/kg d'aliment)**	**Pourcentage de la composition alimentaire (%)**
Maïs (amidon)	**326**	**32.6**
Saccharose (sucre)	**326**	**32.6**
Protéines (soja)	**168**	**16.8**
Cellulose	**40**	**4**
Minéraux mixte	**40**	**4**
Mélange Vitaminique	**20**	**2**
Huiles (huile de tournesol)	**80**	**8**

1.2. Matériel chimique

Dans notre travail, le matériel chimique utilisé est constitué de:

-Sulfate de nickel héxahydraté ($NiSO_4 6H_2O$, Sigma).

-Vitamine E (α- tocopherol, Sigma).

- Vitamine C (Acide ascorbique, Sigma).

Les autres produits chimiques et les réactifs utilisés dans cette étude sont de qualité analytique reconnue.

2. Méthodes

Soixante quatre (64) souris males ont été réparties de manière aléatoire en huit groupes d'expositions (Schéma du protocole expérimental « figure 11 ») :

- **Groupe 1** : Souris témoins (T) recevant une alimentation standard et une eau de boisson normale.
- **Groupe 2 [Vit C]**: Souris recevant une alimentation standard et recevant une eau de boisson enrichie de vitamine C (1g/l) **(Yildirim & Büyükbingöl, 2003).**
- **Groupe 3 [Vit E]**: Souris recevant une alimentation additionnée de vitamine E [1 g vit E/kg d'aliment] et une eau de boisson normale (**Alberts et al., 1978).**
- **Groupe 4 [VitC-VitE]**: Souris recevant une alimentation additionnée de vitamine E [1 g vit E/kg d'aliment] et une eau de boisson enrichie de vitamine C [1g/ l).
- **Groupe 5 [(Ni)]**: Souris recevant une alimentation additionnée de $NiSO_4 6H_2O$ [2,7 g Ni/kg d'aliment] et une eau de boisson normale (**Schiffer et al., 1991)**.
- **Groupe 6 [Ni -Vit C]**: Souris recevant une alimentation additionnée de $NiSO_4 6H_2O$ [2,7 g Ni/kg d'aliment] et recevant une eau de boisson enrichie de vitamine C (1g/l).
- **Groupe 7 [Ni -Vit E]** : Souris recevant une alimentation additionnée de $NiSO_4 6H_2O$ et de vitamine E [(2,7 g Ni + 1g vit E/kg d'aliment)].
- **Groupe 8 [Ni –VitC-VitE]:** Souris recevant une alimentation additionnée de $NiSO_4 6H_2O$ et de vitamine E [(2,7 g Ni + 1g Vit E/kg d'aliment)] et recevant une eau de boisson enrichie de vitamine C (1 g /l).

Ces traitements sont poursuivit pour tous les groupes durant trente (30) jours. Les animaux témoins et traités ont été pesés chaque trois jours, afin d'en déduire la courbe de croissance. Cependant, la consommation alimentaire et en eau est mesurée durant les jours du traitement.

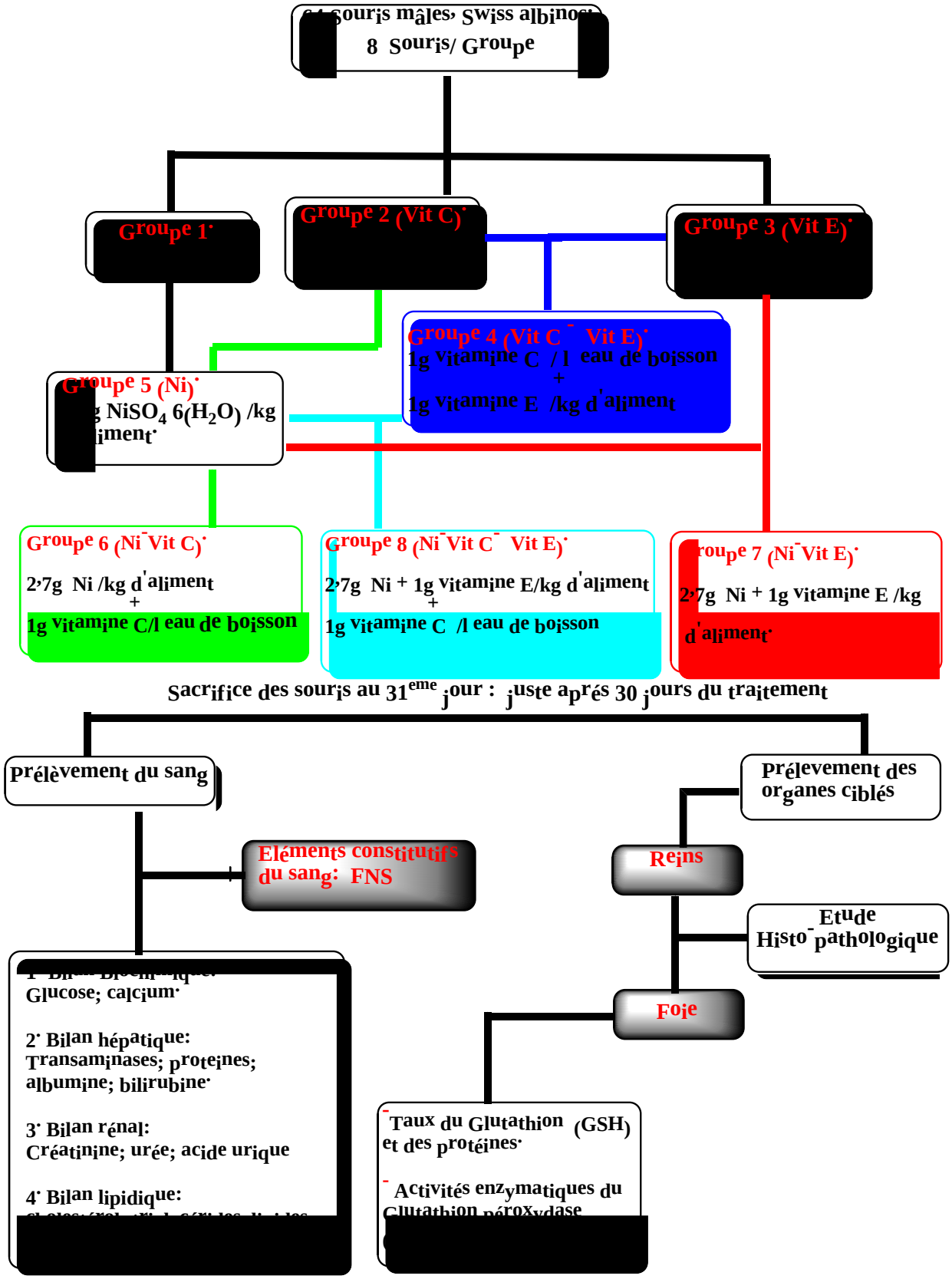


Figure 10 : Schéma des récapitulatif du protocole expérimental.

2.1.Prélèvement des échantillons

Après 30 jours de traitement, les groupes sont sacrifiés (par décapitation) et le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes polyéthylènes étiquetés. L'un contient l'anticoagulant acide éthylène-diamine-tétraacétique (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 qu'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).

2.2.Prélèvement des organes

Après la dissection, le foie et les reins sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, puis pesés. Un fragment du foie et l'organe de rein de chaque animale sont conservés dans une solution de formaldéhyde de 40%, jusqu'au moment de faire les coupes histologiques. Le deuxième fragment du foie est maintenu à (–20°C) pour le dosage du glutathion, le catalase, glutathion peroxydase et les protéines hépatiques.

2.3.Dosage des paramètres hématologiques

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 **(Couler, Counter T 540)**; est un analyseur sanguin automatisé pour échantillons de sang entier. Le Coulter aspire un volume de 2 ml du sang et les résultats sont donnés sur une fiche imprimée.

Les paramètres mesurés sont les globules rouges et blancs, l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), le volume globulaire moyen (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) (voir la photo ci-dessous).

PHOTO REPRÉSENTE LE COULTER HÉMATOLOGIQUE.
(Coulter Conter Lympho Série « T » 540)

2.4.Dosage des paramètres biochimiques

Dans notre étude, tous les paramètres biochimiques ont été évalués par la méthode colorimétrique enzymatique et non-enzymatique en utilisant les Kits biochimiques *(Spinreact, Girona Spain).* La lecture de l'absorbance optique est se fait à l'aide d'un spectrophotomètre *(JENWAY 6105).*

2.4.1. Dosage du glucose

Le glucose dans l'échantillon subit des réactions couplées décrites ci dessous pour donner un complexe coloré, qui peut être mesuré à la spectrométrie à une longueur d'onde λ = 505nm **(Kaplan, 1984**).

$$\text{Glucose} + 1/2\ O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} \text{Gluconate} + H_2O_2$$

$$4\text{-aminoantipyrine} + \text{phénol} \xrightarrow{\text{Péroxydase}} \text{Quinoneimine} + 4\ H_2O$$

2.4.2. Dosage du calcium

Le calcium présent dans l'échantillon forme un complexe coloré avec O-Cresolphtalein dans un milieu alcalin. L'intensité du chromophore formée est proportionnelle à la concentration du calcium dans l'échantillon **(Michaylova & Ilkova,1971).**

$$Ca^{2+} + \text{O-Cresolphtaleine} \xrightarrow{OH^-} \text{Complexe Coloré}$$

2.4.3. Dosage des protéines totales

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu. L'intensité de la couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon. La concentration des protéines présente dans chaque échantillon est calculé à partir des valeurs obtenus par le spectrophotomètre à longueur d'onde λ= 540nm **(Burtis et al., 1999)**.

$$\text{protéines} + Cu^{2+} \xrightarrow{\text{pH alcalin}} Cu\text{-complexe protéinique}$$

2.4.4. Dosage de l'albumine

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).**

2.4.5. Dosage de bilirubine totale et directe

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment biliaire dans le sérum réagissant avec l'acide sulfaniliquediazoté à pH acide pour produire l'azobiluribine. Le dosage de la bilirubine directe se fait en présence de Dimethylsulfoxide (DMSO). L'absorbance conduisant à calculer la concentration de bilirubine totale et directe dans le sérum est mesurée par spectrophotomètre à la longueur d'onde λ= 550nm. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine **(Kaplan et al., 1984).**

2.4.6. Dosage de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (ALT/TGP)

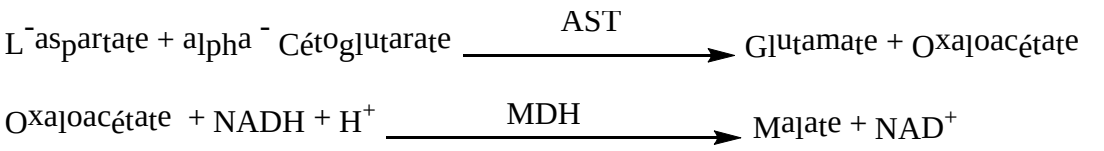
L'alanine aminotranférase (ALT) est une transaminase connue sous le nom de transaminase glutamique pyruvique (TGP). L'ALT catalyse le transfert du groupe aminé de la L-alanine vers l'α-cétoglutarate pour donner le L-glutamate et le pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH, H^+. La lecture se fait par spectrophotomètre à une longueur d'onde λ= 340nm **(Murry, 1984).**

$$L\text{-alanine} + \text{alpha-Cétoglutarate} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{Glutamate} + \text{Piruvate}$$

$$\text{Piruvate} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

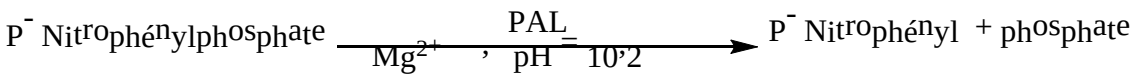
2.4.7. Dosage de l'activité enzymatique de l''aspartate aminotransférase (AST/TGO)

L'aspartate aminotransférase (AST) connue sous le nom de transaminase glutamino-oxalacétique (TGO) est untransaminase qui catalyse le transfert du groupe aminé du L-aspartae vers le α-cétoglutarate pour donner le L- glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H^+. La lecture se fait par spectrophotomètre à une longueur d'onde λ= 340nm **(Murry,1984).**



2.4.8. Dosage de l'activité enzymatique de l'activité de phosphatase alcaline(PAL)

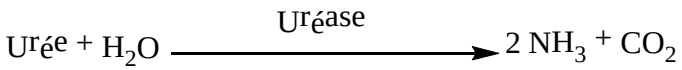
La détermination de l'activité enzymatique de PAL basée sur la réaction suivante :



La lecture de l'absorbance se fait par spectrophotomètre à longueur d'onde de 405nm **(Rosalki et al.,1993).**

2.4.9. Dosage de l'urée

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



Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et dihypochlorite de sodium pour donner un complexe coloré en vert, l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans le sérum **(Kaplan, 1984).**

2.4.10. Dosage de la créatinine

La créatinine présente dans l'échantillon de sérum réagit avec le picrate en milieu alcalin, pour donner un complexe dans des périodes initiales courtes en évitant ainsi l'interférence d'autre composé. L'absorbance (A) est mesuré à longueur d'onde de 500 nm **(Murry, 1984).**

2.4.11. Dosage de l'acide urique

L'acide urique présent dans l'échantillon donne selon les réactions décrites ci- dessous un complexe coloré, quantifiable par spectrophotomètre.

$$\text{Acide urique} + 2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoïne} + CO_2 + 2\ H_2O$$

$$2\ H_2O + 4\text{-Aminoantipyrine} + \text{DCPS} \xrightarrow{\text{Péroxydase}} \text{Quinoneimine} + 4\ H_2O$$

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon **(Schultz, 1984).**

2.4.12. Dosage des lipides totaux

Les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique pour former des ions carbonium ensuite ces ions forment avec le phosphovainille un complexe rose **(Kaplan, 1984).**

2.4.13. Dosage du cholestérol

Le cholestérol présent dans l'échantillon forme un complexe coloré selon les réactions ci-dessous :

$$\text{Cholestéryl ester} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholestéryl Estérase}} \text{Cholestéryl} + \text{Acides gras}$$

$$\text{Cholestéryl} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholestéryl Oxydase}} \text{Cholestéryl} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Phenol} + 4\text{-Aminophenazone} \longrightarrow \text{Quinoneimine} + 4\ H_2O$$

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon **(Naito,1984).**

2.4.14. Dosage des triglycérides

Détermination enzymatique des triglycérides suivant les réactions ci-dessous:

$$\text{Triglycéride} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipoprotéine lipase}} \text{Glycérol} + \text{Acides gras libres}$$

$$\text{Glycérol} + ATP \xrightarrow{\text{Glycérokinase}} G3P + ADP$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate}\ (G3P) + O_2 \xrightarrow{\text{Glycérol-3 P oxydase}} DAP + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4\text{-AP} + p\text{-Chloropheno}le \xrightarrow{\text{Péroxydase}} \text{Quinone} + H_2O$$

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon **(Naito,1984).**

2.5.Dosage des paramètres du stress oxydatif

2.5.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme du foie de chaque souris, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

2.5.2. Dosage du taux de glutathion hépatique (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode d'**Ellman** (**1959**). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-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 0.8 ml de l'homogénat.
- 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%).
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon phosphate Tris, pH 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.
- Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

- La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\textbf{GSH (n mol/mg prot)} = \frac{\textbf{DO x L x 1,525}}{\textbf{13100 x 0,8 x 0,5 mg prot}}$$

DO: Densité optique.

L:Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation.

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

13100 : Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.

0.5 : Volume de surnageant.

0.8: Volume de l'homogénat.

Dosage des protéines hépatiques

- **Principe de la méthode**

Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide ortho-phosphorique, de l'éthanol aussi que le bleu de coomassie (BBC). Ce réactif réagit avec le groupement ($-NH_2$) des protéines. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines est mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm. La coloration très sensible peut être effectuée très rapidement et reste stable pendant 30 minutes, si l'on utilise le bleu brillant de Coomassie G250 comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (SAB) comme standard **(Bradford, 1976)**

- **Mode opératoire**

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat de chaque échantillon, puis additionner 5ml de la solution de bleu brillant de Coomassie (réactif de Bradford, G250).
- L'ensemble est agité et laissé reposer pendant 5 minutes pour stabiliser la coloration.
- La lecture des absorbances est réalisée à une longueur d'onde de 595nm contre le blanc.

A partir de la courbe d'étalonnage et en fonction de la dilution, on détermine la concentration en protéines exprimée en mg/ml de l'échantillon.

2.5.3. Dosage de l'activité 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), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :

$$H2O2 + 2\ GSH \xrightarrow{GSH\text{-}Px} GSSG + 2\ H_2O$$

Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

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

$$\mathbf{GSH - Px\ (\mu mole\ GSH/min/mg\ prot)} = \frac{\mathbf{(DO\ Echantillon\ x\ DO\ Etalon)\ x\ 0,04}}{\mathbf{DO\ \ Etalon}}$$

0,04 : Concentration de substrat (GSH).

2.5.4. Dosage de l'activité du catalase (CAT)

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. 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 espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène**(Aebi, 1974).**

La réaction se fait en deux étapes:

Catalase (Fe III) + H_2O_2 --------> Catalase (Fe V) H_2O_2

Catalase (Fe V) H_2O_2 + H_2O_2 ---------> Catalase (Fe III) + H_2O + O_2

---

2 H_2O_2 --------> +2 H_2O + O_2

L'activité catalase (CAT) a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6105) par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (ε= 43.6 mM/cm) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate

pendant 1 mn à pH 7,5, 100µl de H_2O_2 (500mM) sur 20µl du S9, à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en µmol d'H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

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

Protocole utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique du catalase

Les réactive utilisés	**Essai**	**Blanc**
Tampon phosphate (100mM ; pH 7,5)	**780µl**	**800µl**
H_2O_2 30mM	**200µl**	**200µl**
S9 (1 à 1,5mg Prot/ml)	**20µl**	**--**

On note que:

- La quantité du surnageant (S9) doit être déterminée en fonction de la quantité des protéines qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 à 20 µl de S9.
- L'activité décroissant rapidement, il est important de mettre toujours le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure à une longueur d'onde λ = 240nm

$$\textbf{Catalase (µmole/min/mg prot)} = \frac{(\Delta DO)}{(\varepsilon \times L \times X \times Fd)}$$

L: Longueur de la cuve utilisée (1cm).
X : La quantité des protéines (mg/ml).

ε : Coefficient d'extinction (= 0.043 mM^{-1}. cm^{-1}).

***Fd* =** 0.02 (facteur de dilution pour le H_2O_2dans le tampon).

2.6.Évaluation histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Roched d'Annaba, service d'anatomie pathologie suivant la technique classique de **Houlot (1984):**

- L'organe du foie et des reins de chaque animal sont retirés de Bouin alcoolique et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm^2 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'alcool éthulene glycol de concentration croissante (70%, 80%,90%,100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spéciaux.

Réalisation des blocs:

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenu 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. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) sont possibles grâce à des appareils spéciaux appelés " Microtomes ". Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, déplissées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

Coloration:

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline- Eosine ou (Hématéine- Eosine); qui nécessite la présence de l'alcool acide ((95% Éthanol 2578 ml, d'H_2O 950ml, HCl 9ml) et solution d'Eosine (100ml Eosine solution aqueuse à 3%, 125ml alcool éthylique à 95%, 375 ml eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suive les étapes suivantes :

1)- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.

2)- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (06 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).

3)-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.

4)-Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.

5)- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme).

6)-Enfin déshydrater, éclaircir et monter les lames à Eukitt. Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

7)- Les coupes histologiques sont ensuite observées par microscope optique (Lutzdialuxe 22), les images ont été photographiées à l'aide d'un appareil photo (Leicaunile MP48).

2.7. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux sont exprimés sous forme de moyenne arithmétique, accompagnée de l'erreur standard (M ± SEM). La comparaison entre les moyennes est réalisée à l'aide du test "Turkey post hoc test ". La significativité des résultats est estimée par une analyse de variance (ANOVA) ; $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

Les résultats ont analysé par le logiciel de statistique **« Graph Pad Prism 6.03».**

Chapitre 03:

Résultats

3. Résultats

1. Effet des traitements sur la croissance corporelle des souris.

D'après la figure 11, l'évolution du poids corporel varie semblablement pendant la première et la deuxième semaine du traitement. Ensuite, il commence de varier différemment en comparaison avec le lot témoin. Chez les souris contaminées au nickel, l'évolution du poids corporel devient progressivement décroissante. La vitamine C et/ou E a montré une évolution normale et comparable du poids corporel en comparaison avec les souris témoins. Alors, les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et/ou E ont montré une augmentation progressive du poids corporel pendant la troisième et la quatrième semaine du traitement comparé aux souris contaminées au nickel seule. Notons aussi que le poids corporel des souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E, augmente progressivement dans le bon sens par rapport à celui enregistré chez les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou E.

Le tableau 06 montre que le moyen final du poids corporel des souris a affecté clairement par le nickel, en effet, nous constatons une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de poids corporel des souris contaminées au nickel en comparaison avec les témoins. Alors que chez les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou E, nous remarquons une augmentation hautement significative ($p<0.01$), et très hautement significative ($p<0.001$) de poids corporel chez le lot Ni-Vit C-Vit E comparativement au lot de nickel.

De plus, le moyen final du poids corporel des souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C a présenté une diminution moins important ($p<0.01$) en comparaison avec les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E. Notons aussi que le traitement uniquement vitamine C ou vitamine E n'a montré aucun changement pondéral par rapport aux souris témoins.

Tableau 06 : Variation du poids corporel en gramme chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

Les lots expérimentaux								
Paramètres	*Témoin*	*Vit C*	*Vit E*	*Vit C – Vit E*	*Ni*	*Ni- Vit C*	*Ni - Vit E*	*Ni -Vit C - Vit E*
Poids initial (g)	30 ± 0.6	31 ± 0.71	33 ± 1.1	29 ± 1.03	29 ± 1.05	32 ± 0.9	33 ± 1.07	31 ± 0.66
Poids final (g)	41 ± 1.1	38 ± 0.21	40 ± 0.17	40 ± 0.21	18 ± 0.13 **	26 ± 1.2 $^{*\ b\beta}$	28 ± 0.73 $^{*\ b}$	30 ± 0.45 $^{*\ C}$

$^{**}p < 0.01$ Comparaison avec le lot ***témoin***

$^{b}p < 0.01$; $^{C}p < 0.001$ Comparaison avec le lot ***Ni.***

$^{\beta}p < 0.01$ Comparaison les lots ***Ni- Vit C, Ni -Vit E*** avec le lot ***Ni -Vit C- Vit E.***

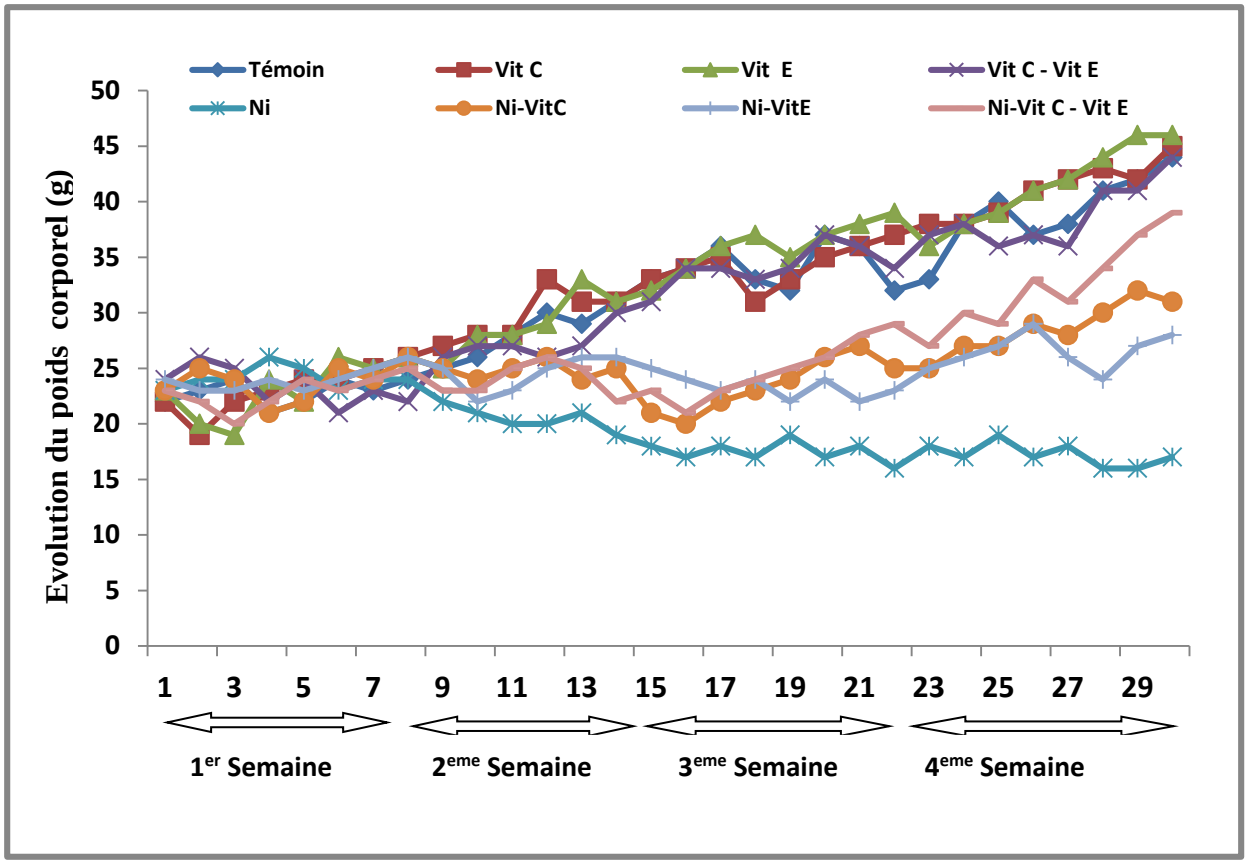


Figure. 11 : Évolution du poids corporel en gramme chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

2. Effet des traitements sur les poids absolus et relatifs du foie et des reins.

Les résultats de la figure 12 révèlent une augmentation très hautement significative ($p<0.001$) des poids absolus et relatifs du foie chez le lot contaminé au nickel en comparaison avec le lot témoin.

Chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et E on a enregistré une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni- Vit E), (Ni – Vit C - Vit E) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni- Vit C) du poids absolu du foie, hautement significative ($p < 0.01$) (Ni- Vit E) et très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni- Vit C) (Ni-Vit E-Vit C) du poids relatif du foie en comparaison avec le lot contaminé au nickel.

Cependant, les poids absolus et relatifs du foie chez les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou E ont montré une augmentation significative ($p<0.05$) (Ni-Vit C) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni-Vit E) en comparaison avec le lot Ni-Vit C- Vit E.

D'après la figure 13, nous constatons une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) du poids absolu très hautement significative ($p < 0.001$) du poids relatif des reins chez le lot contaminé au nickel en comparaison avec le lot témoin.

Chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou E on a enregistré une diminution significative ($p < 0.05$) (Ni- Vit E), (Ni – Vit C) et hautement significative ($p<0.01$) (Ni- Vit C- Vit E) du poids absolu et relatif des reins en comparaison avec le lot contaminé au nickel. Aucune variation significative des poids relatifs et absolus des organes a été enregistrée chez les souris recevant uniquement la vitamine C and/or la vitamine E.

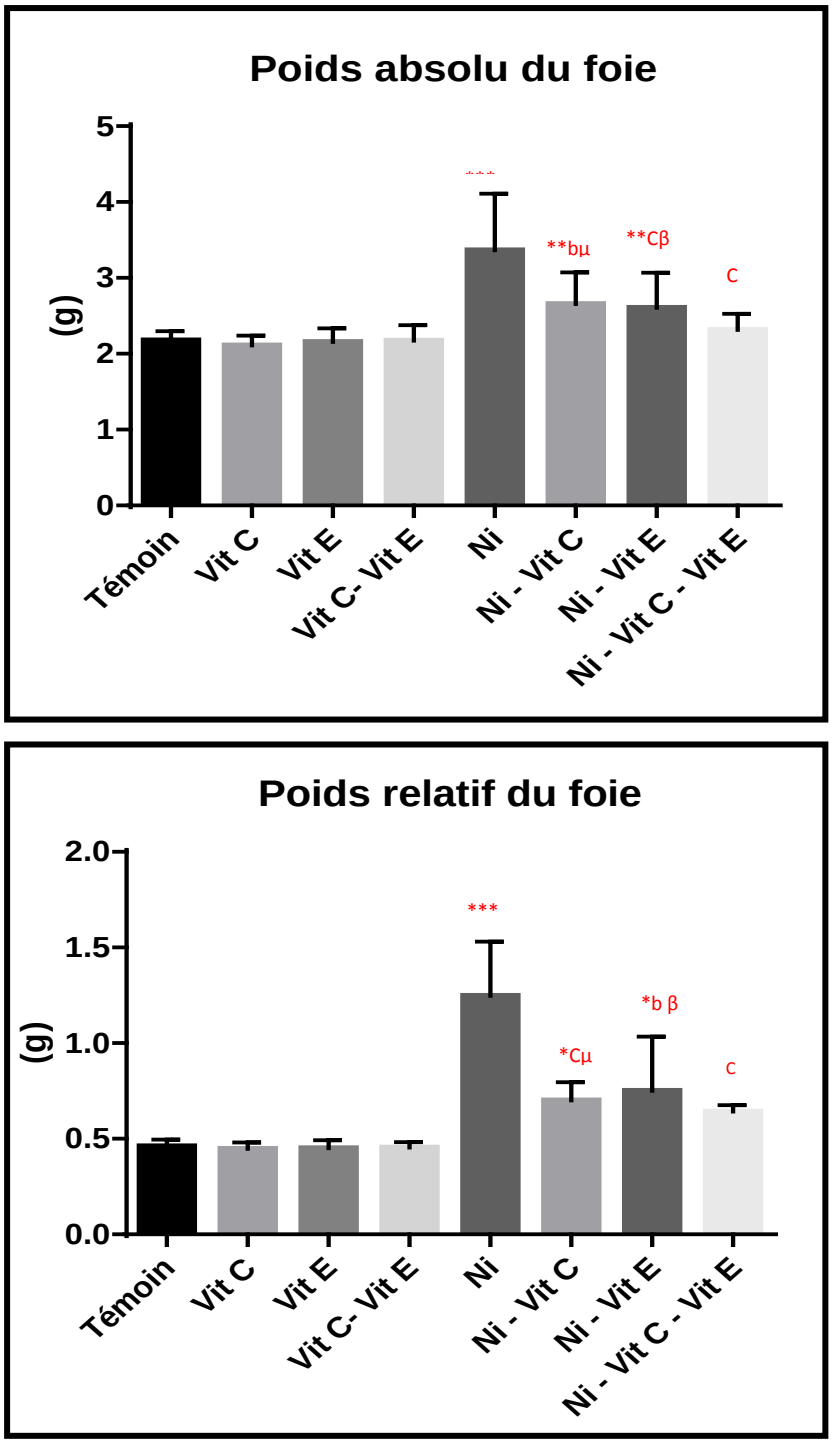
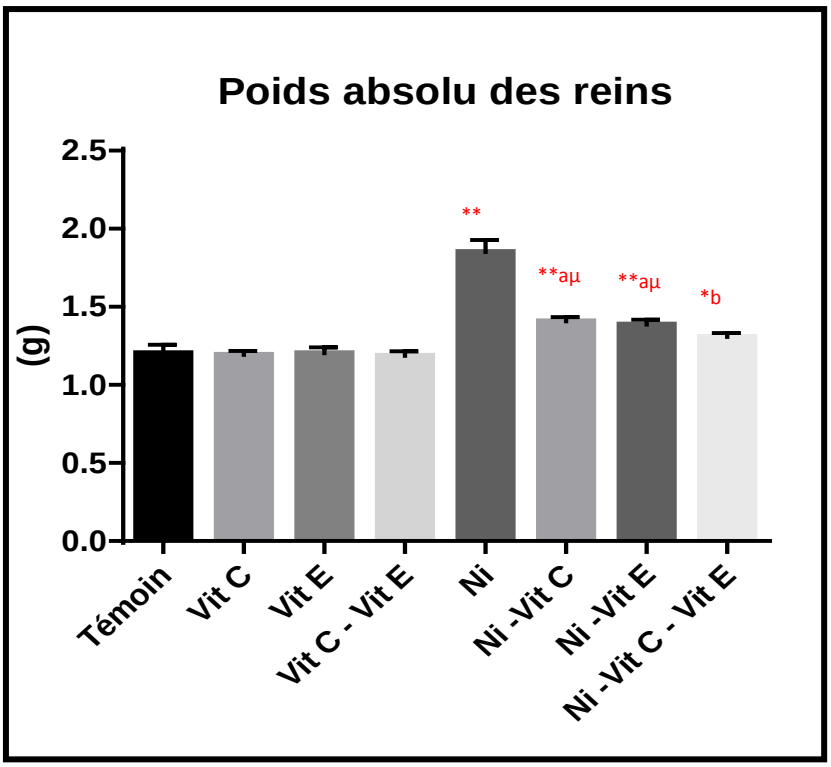


Figure 12: Evaluation du poids absolu et relatif du foie chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminés au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{b}p < 0.01$; $^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.



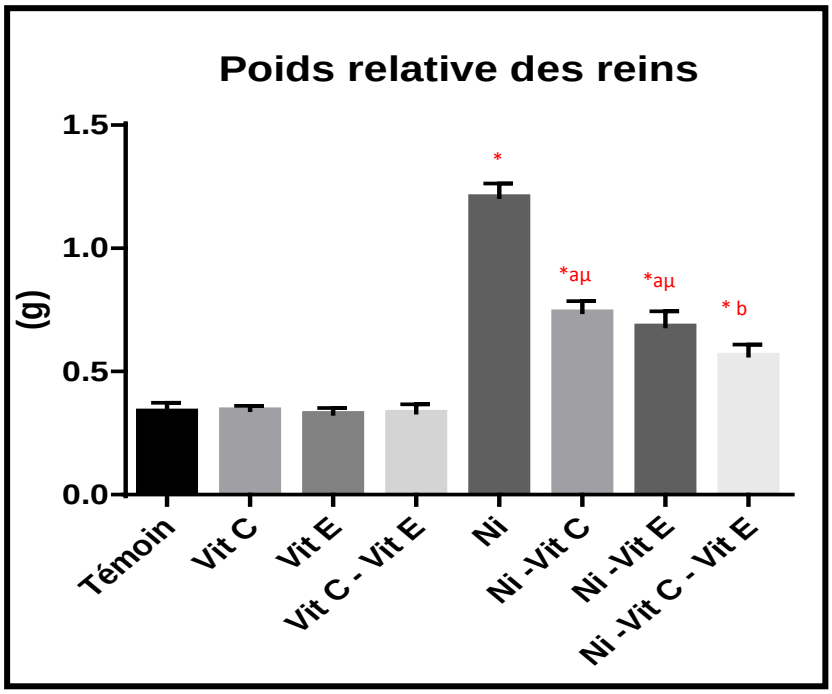


Figure 13: Evaluation du poids absolu et relatif des reins chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

3. Effet des traitements sur la consommation alimentaire et eau de boisson.

D'après le la figure 14, nous constatons une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de la consommation alimentaire et très hautement significative ($p<0.001$) de la consommation en eau chez le lot contaminé au nickel par rapport au lot témoin.

D'après les résultats des groupes contaminé au nickel et traités par la vitamine C et /ou vitamine E, nous constatons une augmentation significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C), (Ni - Vit E) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni- Vit C-Vit E) du taux de consommation de nourriture et du taux de consommation en eau par rapport à celui enregistré chez le lot contaminé au nickel.

La consommation de nourriture diminue d'une façon statistiquement hautement significativement ($p<0.01$) et significative ($p< 0.05$) pour la consommation en eau chez les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou E en comparaison avec les souris Ni – Vit C– Vit E.

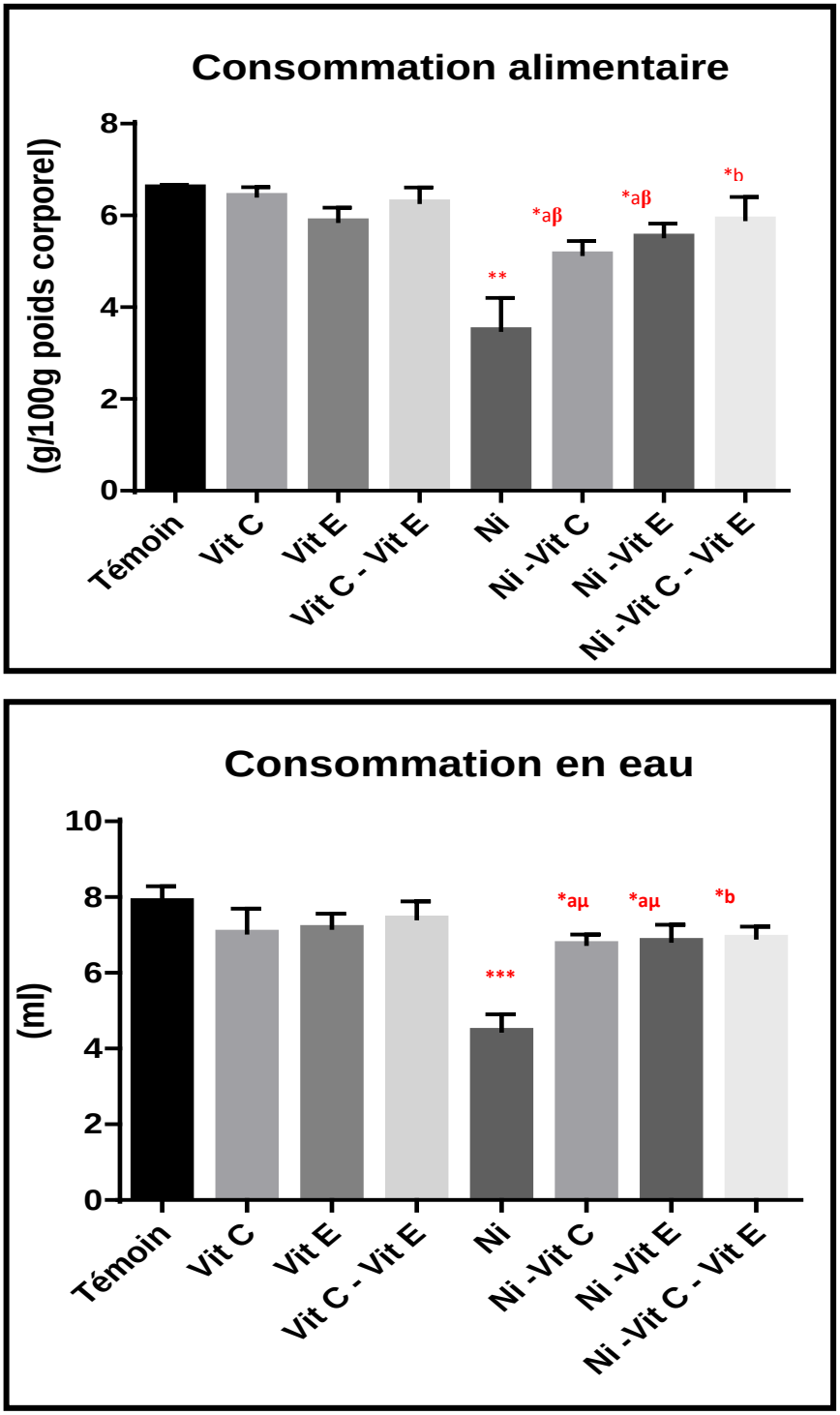


Figure 14 : Taux de la consommation journalière de nourriture et de l'eau chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et les traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$;$^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

4. Effet des traitements sur les paramètres hématologiques

Les résultats de tableau 07 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 lot témoin.

Par contre chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et E, nous remarquons une diminution significative ($p < 0.05$) (Ni -Vit C), et hautement significative ($p<0.01$) (Ni - Vit E) et (Ni -Vit C – Vit E) du nombre des globules blancs, significative($p<0.05$) (Ni - Vit E), (Ni - Vit C–Vit E) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit C)de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine(CCMH) en comparaison avec le lot nickel. De plus, nous constatons une augmentation significative ($p<0.05$)(Ni-Vit E) des globules blancs, et hautement significative ($p< 0.01$) (Ni - Vit C) de CCMH, en comparaison avec les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E (Ni-Vit C – Vit E). En revanche, on a constaté une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du nombre des globules rouges et hautement significative ($p < 0.01$) de la concentration d'hémoglobine, très hautement significative ($p < 0.001$) du taux d'hématocrite, et elle est significative ($p < 0.05$) du volume globulaire moyenne (VGM) et de la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) chez les souris contaminées au nickel par rapport aux souris témoins.

Chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et E, on a enregistré une augmentation significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C), (Ni –Vit E) et hautement significative ($p<0.01$)(Ni - Vit C- Vit E) du nombre des globules rouges et de la concentration d'hémoglobine, significative ($p< 0.05$)(Ni-Vit E), hautement significative ($p<0.01$) (Ni-Vit C-Vit E) du taux d'hématocrite, significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C) (Ni - Vit E) pour VGM, hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit E) (TGMH), suivie par une diminution significative ($p <0.05$) (Ni - Vit E)(Ni - Vit C- Vit E) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit C) de CCMH en comparaison avec le lot nickel. Cependant, la comparaison des lots: Ni - Vit C et Ni - Vit E avec le lot Ni - Vit C - Vit E montre une diminution significative ($p<0.05$) (Ni- Vit C) et hautement significative ($p<0.01$) (Ni- Vit E) des globules rouges, significative ($p < 0.05$) (Ni- Vit C), (Ni- Vit E) du taux d'hémoglobine, hautement significative ($p < 0.01$) (Ni – Vit C) et significative ($p < 0.05$) (Ni – Vit E) du taux d'hématocrite, avec une augmentation hautement significative($p < 0.01$) (Ni- Vit C) pour CCMH (Tab 09).

Tableau 07:Variation du nombre des globules rouges, des globules blancs, du taux d'hémoglobine, d'hématocrite, du volume globulaire moyenne (VGM), la teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

	Les lots expérimentaux							
Paramètres	*Témoin*	*Vit C*	*Vit E*	*Vit C-Vit E*	*Ni*	*Ni - Vit C*	*Ni - Vit E*	*Ni - Vit C– Vit E*
Globules blancs	6.06 ± 0.22	6.11± 0.17	6.04 ± 0.1	6.01 ± 0.08	8.05±0.40***	6.98 ± 0.28* a	6.84 ± 0.34* bμ	6.39 ± 0.22* b
Globules rouges	7.28 ± 0.41	6.97 ± 0.36	7.03 ± 0.43	7.06 ± 0.12	5.46±0.65***	6.71 ±0.48* a μ	6.63 ± 0.5* aβ	6.79 ± 0.43* b
Taux d'hémoglobine (g/dl)	13,37± 0.6	12.84 ± 0.5	12.79 ± 0.44	12. 9± 0.26	10.1±0.08**	11.3 ±0.57* a μ	11.10 ± 0.37 * a μ	11.85 ± 0.59* b
Taux d'hématocrite (%)	44.12 ± 0.96	43.27 ± 1.63	42.61 ± 1.73	43.23± 2.01	32.7±0.13***	37.02 ± 4.5*β	36.71± 3.44 * a μ	38.97 ± 3.25* b
VGM (fl)	43.31± 0.06	41.1 ± 0.06	42.41 ± 0.09	41.04± 0.05	33.32 ±0.09*	36.32 ± 0.09* a	38.02 ± 0.01* a	40.2 ± 0.09*
TGMH	23.61 ± 0.15	22.27 ± 0.04	22.27±0.06	21.08± 0.03	17.31±0.17*	21.31± 0.17	23,31± 0.17*b	24.30± 0.17
CCMH (pg)	31.78 ± 0.04	29.15±0.23	32.01± 0.12	32.88± 0.14	37.5± 0.19*	34. 86±0.19* bβ	31.51± 0.13* a	29.55± 0.11*a

*p < 0.05 ; **p < 0.01 ; *** p < 0.001 Comparaison par rapport au lot ***témoin***

ᵃp < 0.05; ᵇp < 0.01 Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

ᵘp < 0.05 ; ᵝp < 0.01 Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C- Vit E***

5. Effet des traitements sur les paramètres biochimiques

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p<0.001$) de la concentration sérique du glucose et hautement significative ($p<0.01$) de la concentration sérique du calcium chez le lot contaminé au nickel par rapport au lot témoin.

Alors que chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et vitamine E, on a enregistré une diminution hautement significative ($p<0.01$) (Ni-Vit C)(Ni –Vit C – Vit E) et significative ($p<0.05$) (Ni-Vit E) de la concentration sérique du glucose, significative ($p<0.05$) (Ni-Vit E) (Ni-Vit C) et hautement significative ($p<0.01$) (Ni-Vit C – Vit E) de la concentration sérique du calcium en comparaison avec le lot contaminé au nickel.

En revanche, la comparaison des lots : Ni -Vit C ou Ni – Vit E avec le lot Ni-Vit C -Vit E montre une augmentation hautement significative ($p<0.01$) (Ni-Vit C) et significative ($p<0.05$) (Ni-Vit E)de la concentration sérique du glucose, significative ($p<0.05$) (Ni-Vit C) et hautement significative ($p<0.01$) (Ni -Vit E) de la concentration sérique du calcium (figure15).

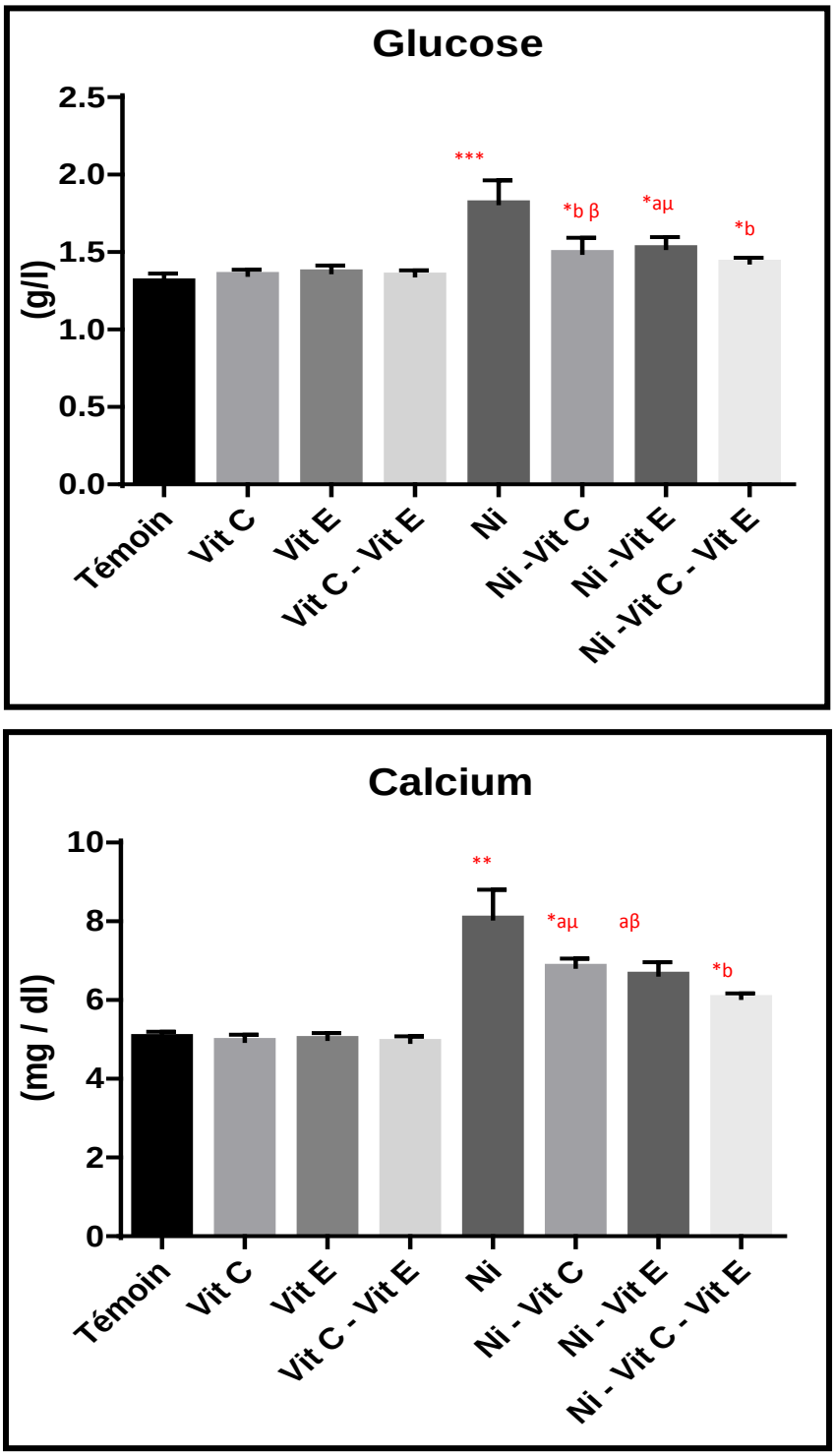


Figure 15 : Variation de la concentration sérique du glucose et du calcium chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

6. Effet des traitements sur les biomarqueurs biochimiques de la fonction hépatique

D'après résultats illustrés dans les figures16 et 17, on a remarqué une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration sérique des protéines totales et d'albumine chez le lot contaminé au nickel par rapport au lot témoin. Alors que les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et vitamine E, nous constatons une augmentation significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C) (Ni -Vit E), et très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni - Vit C – Vit E) de la concentration sérique des protéines totales, hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit C) (Ni - Vit C – Vit E) et significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit E) de la concentration sérique d'albumine par rapport au lot contaminé au nickel.

De plus, les résultats montrent une diminution hautement significative ($p < 0.01$) (Ni-Vit C) (Ni - Vit E) de la concentration sérique des protéines totales, très hautement significative ($p<0.001$) (Ni - Vit E) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit C) de la concentration de l'albumine, en comparaison avec les souris contaminées au nickel et les deux vitamines (Ni-Vit C– Vit E). Nos résultats montrent aussi une élévation hautement significative ($p<0.01$) de la concentration sérique de la bilirubine directe et totale chez le lot contaminé au nickel en comparaison avec le lot témoin. Cependant, nous constatons une diminution claire dans la concentration de la bilirubine (directe et totales) en comparaison avec le lot de nickel seul; ($p < 0.05$) (Ni-Vit E), ($p < 0.01$) (Ni- Vit C - Vit E) pour la bilirubine totale et ($p < 0.05$) (Ni - Vit E) (Ni – Vit C – Vit E) pour la bilirubine directe.

Concernant les activités enzymatiques, les résultats indiqués dans les figures 18 et 19 montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (ALT), de l'aspartate aminotransférase (AST) et de la phosphatase alcaline (PAL) chez le lot contaminé au nickel par rapport au lot témoin.

Chez les traitements combinés avec le nickel, nous constatons une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni- Vit C) (Ni-Vit E) et (Ni- Vit C – Vit E) des activités enzymatiques de l'ALT et de PAL en comparaison avec ceux observés chez le lot nickel. Aussi, l'activité enzymatique de l'AST montre une diminution très hautement significative ($p<0.001$) (Ni- Vit C) (Ni-Vit E) et hautement significative ($p<0.01$) (Ni- Vit C – Vit E).

La comparaison par rapport aux souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E (Ni – Vit C – Vit E), montre une augmentation significative ($p < 0.05$) (Ni-Vit E) de l'activité de ALT, significative ($p < 0.05$) (Ni -Vit C) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni-Vit E) de l'activité de AST.

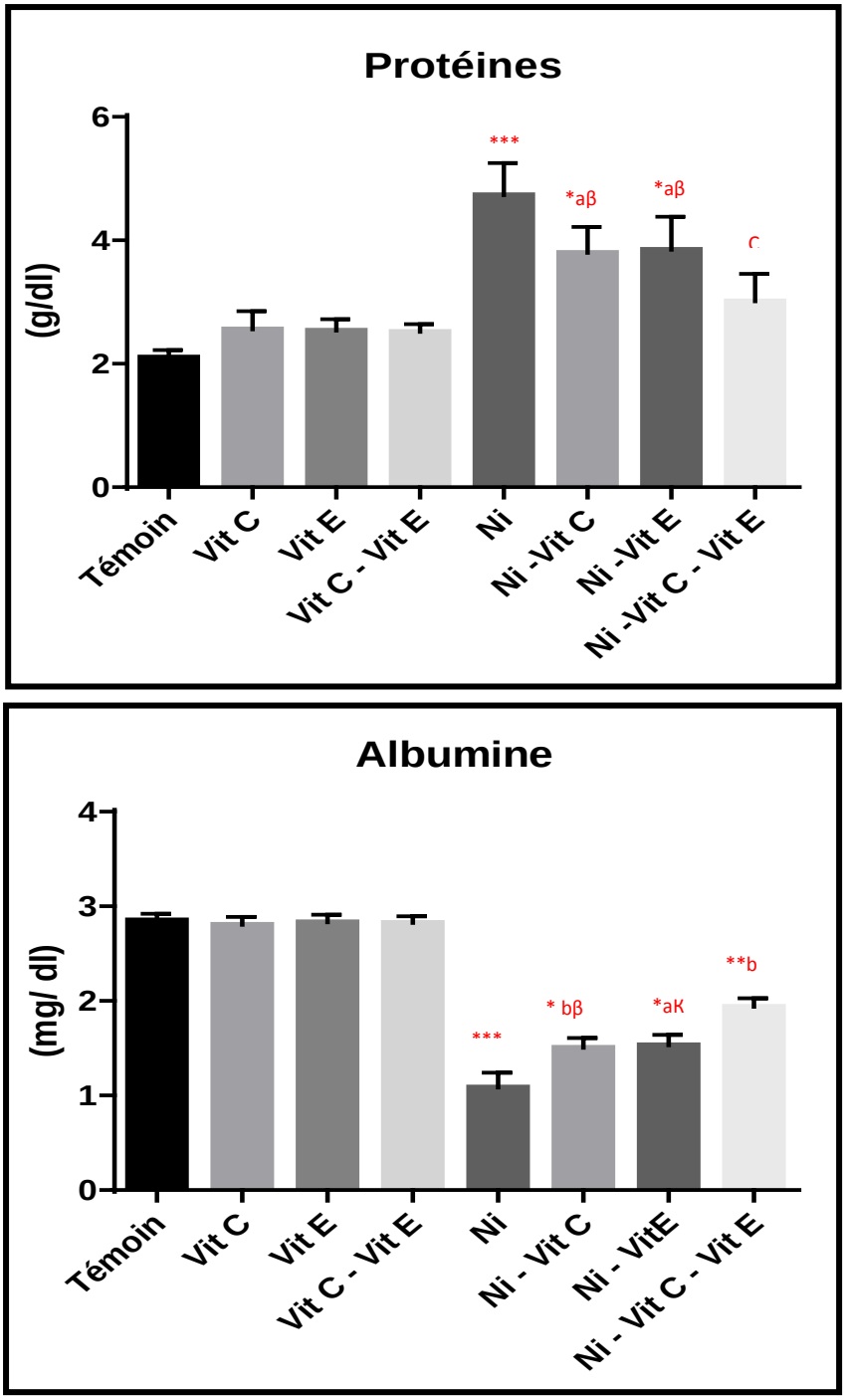


Figure 16: La concentration sérique des protéines totales et de l'albumine chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$; $^{C}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\beta}p < 0.01$; $^{\kappa}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

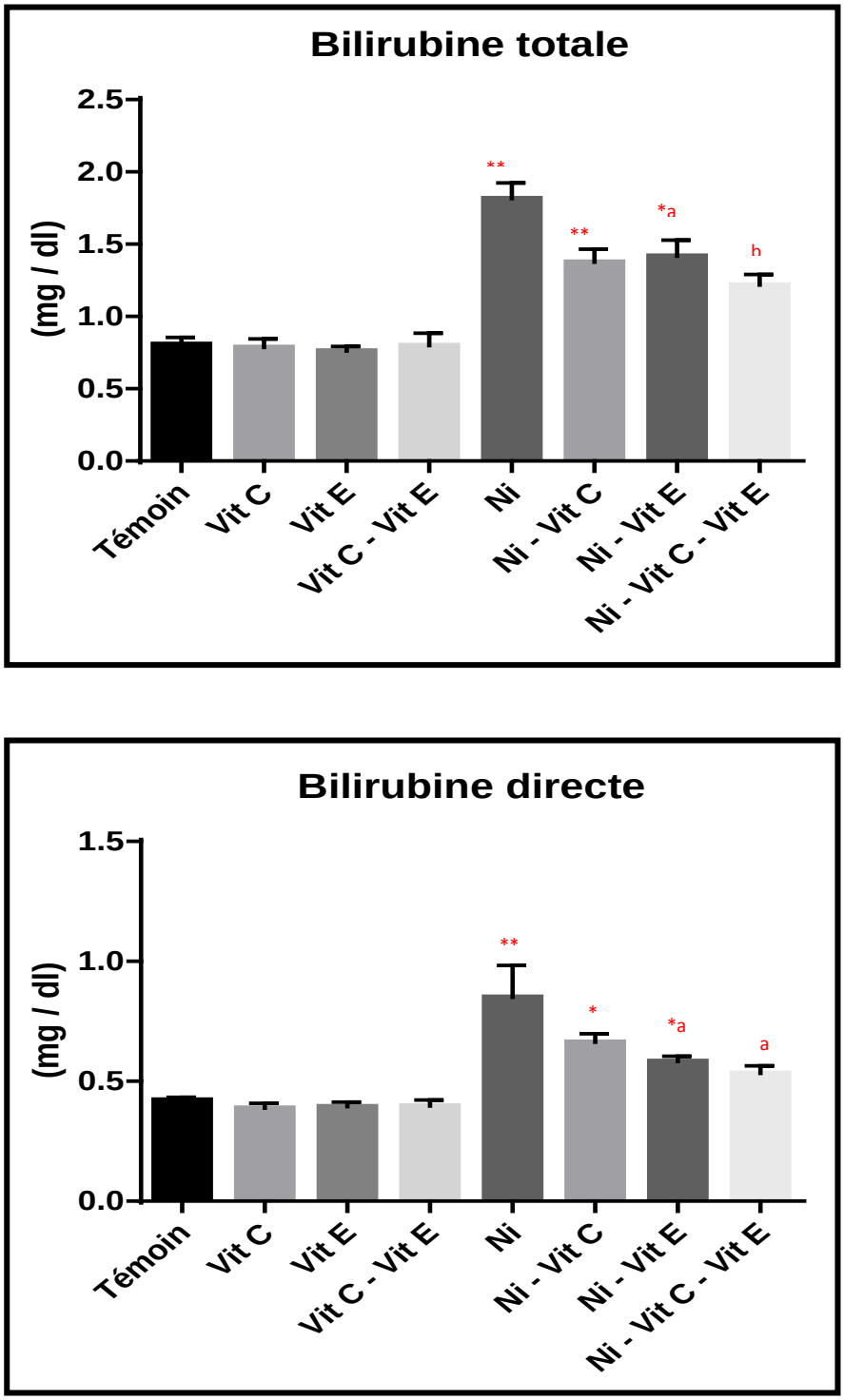


Figure 17: La concentration sérique de la bilirubine directe et totale chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

*p < 0.05; **p < 0.01: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

a p < 0.05 ; b p < 0.01: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

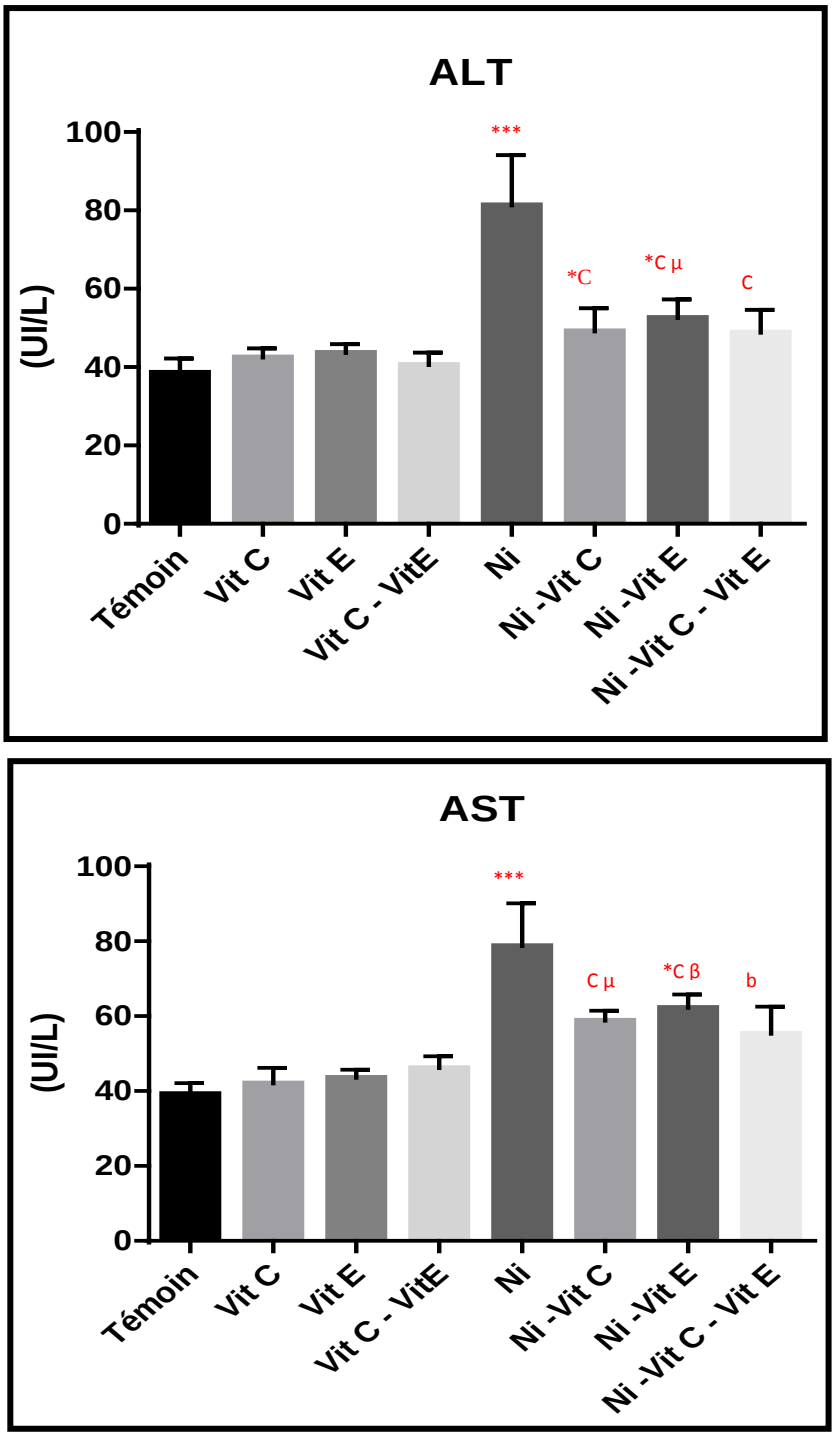


Figure 18: Variation des activités enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine transaminase (ALT) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{b}p < 0.01$; $^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}$ $p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

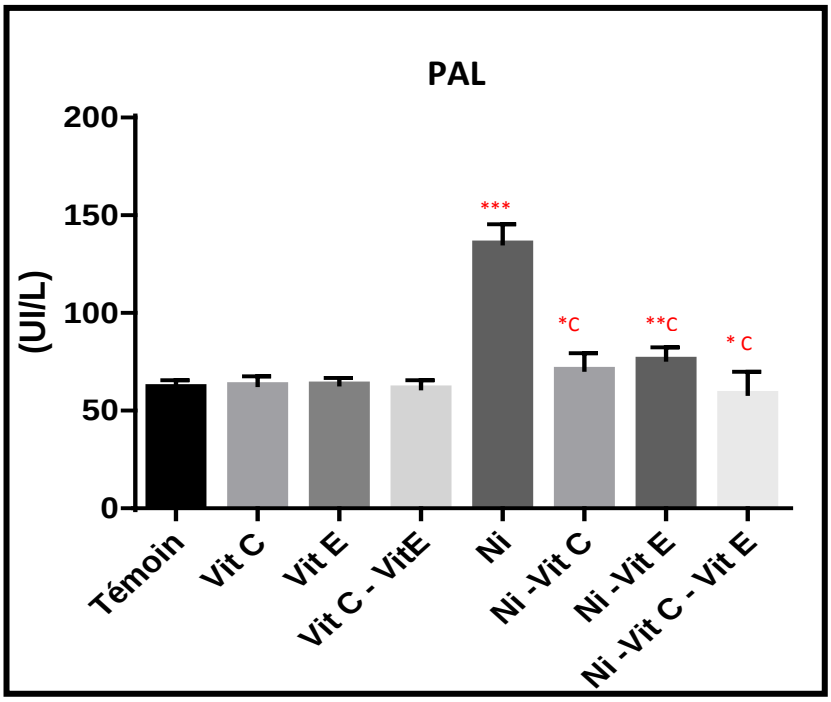


Figure 19: Variation des activités enzymatiques de phosphatase alcaline (PAL) chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

Cp < 0.001: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

7. Effet des traitements sur les biomarqueurs biochimiques de la fonction rénale.

Nous constatons une augmentation très hautement significative ($p<0.001$) de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine, et hautement significative ($p<0.01$) de la concentration sérique de l'acide urique chez le lot contaminé au nickel par rapport au témoin.

Chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et vitamine E, nos résultats indiquent une réduction hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit C), (Ni -Vit C – Vit E) et significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit E) de la concentration de l'urée et de la créatinine, significative ($p < 0.05$) (Ni– Vit C) et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit E), (Ni -Vit C – Vit E) de l'acide urique par rapport au lot contaminé au nickel.

Nous remarquons aussi une augmentation significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit E), et hautement significative($p < 0.01$) (Ni - Vit C) de la concentration de l'urée et de l'acide urique, significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C), et hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit E)de la concentration de la créatinine, en comparaison avec ceux observés chez les souris contaminées au nickel et traitées à la vitamine C et E (Ni – Vit C – Vit E) (figures 20 et 21).

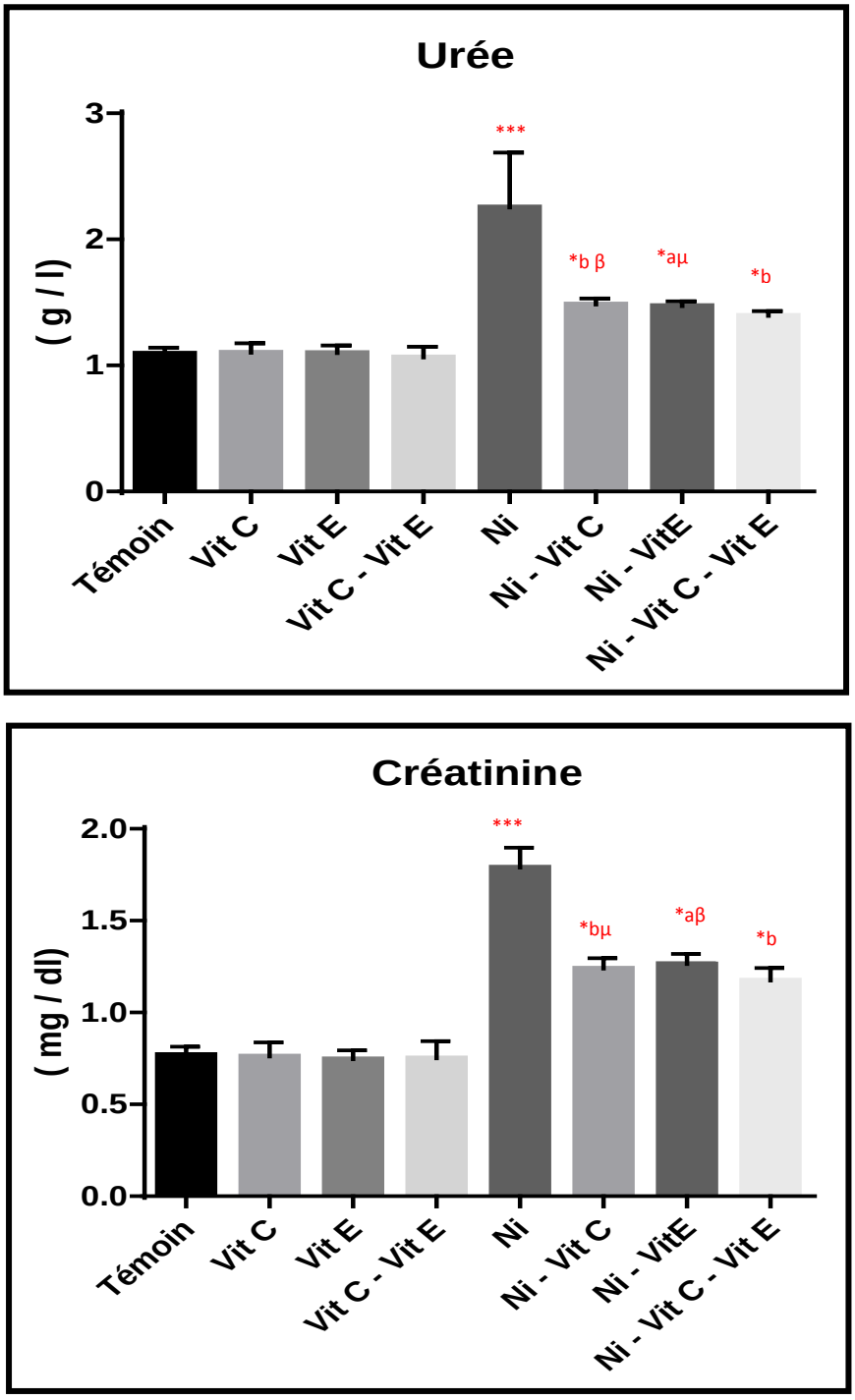


Figure 20 : Variation de la concentration sérique de l'urée et de la créatinine chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

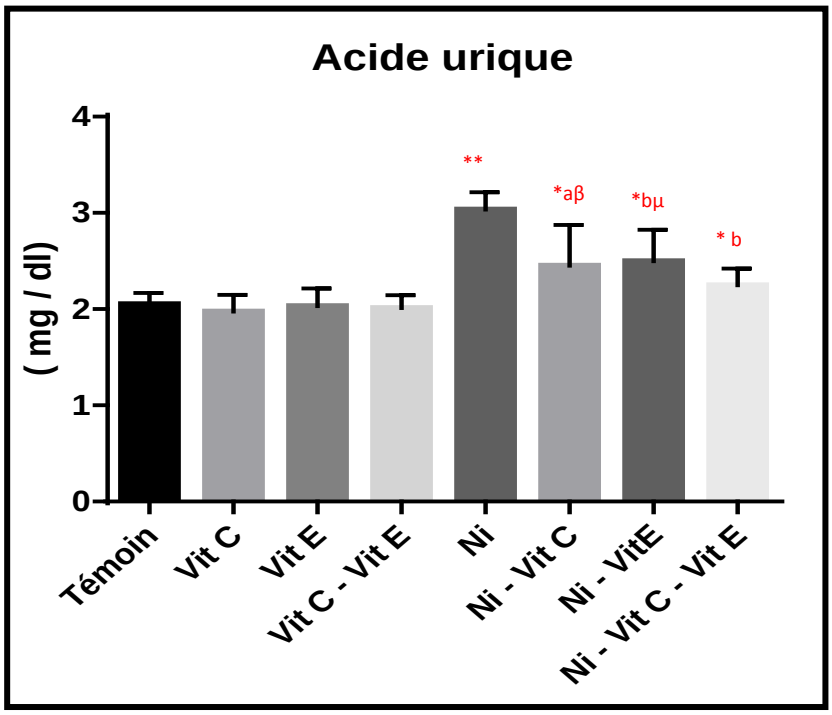


Figure 21 : Variation de la concentration sérique de l'acide urique chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{a}p < 0.05$; $^{b}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

8. Effet des traitements sur le profile lipidique.

D'après les figures 22 et 23, nous remarquons une augmentation hautement significative ($p<0.01$) de la concentration des lipides totaux et des triglycérides, très hautement significative ($p < 0.001$) de la concentration du cholestérol chez les souris contaminés au nickel par rapport au témoin.

Par contre, les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et vitamine E montrent une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni – Vit C –Vit E) de la concentration sérique des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides par rapport au lot contaminé au nickel.

Cependant, les résultats révèlent aussi une concentration plus élevée statistiquement hautement significative ($p <0.01$) (Ni – Vit C), (Ni- –Vit E) de la concentration du cholestérol, hautement significative ($p<0.01$) (Ni – Vit C) et significative ($p< 0.05$) (Ni–Vit E) de la concentration des triglycérides, en comparaison avec ceux observés chez les souris contaminées au nickel et traitées par la vitamine C et E (Ni – Vit C – Vit E).

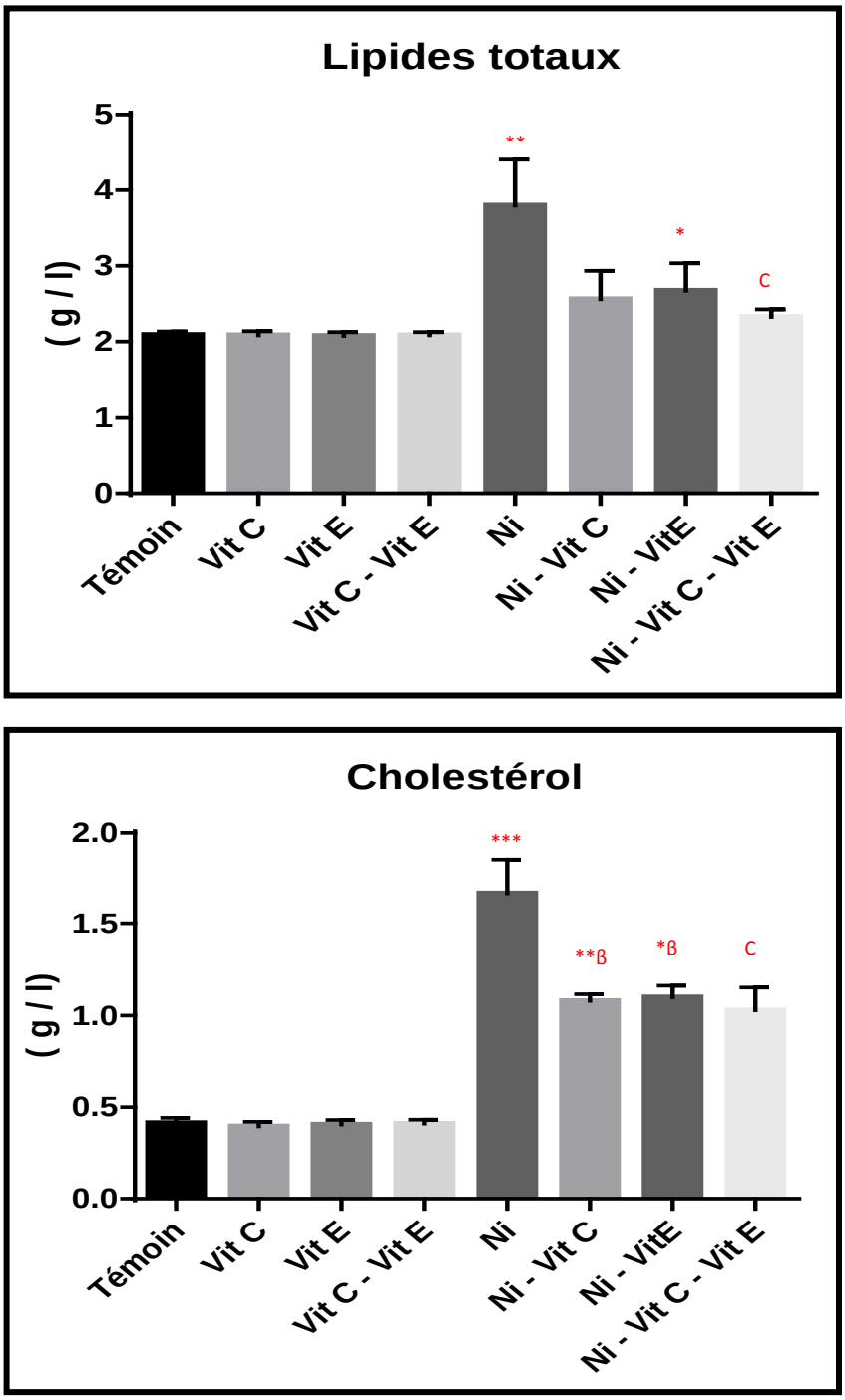


Figure 22: La concentration sérique des lipides totaux et du cholestérol chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

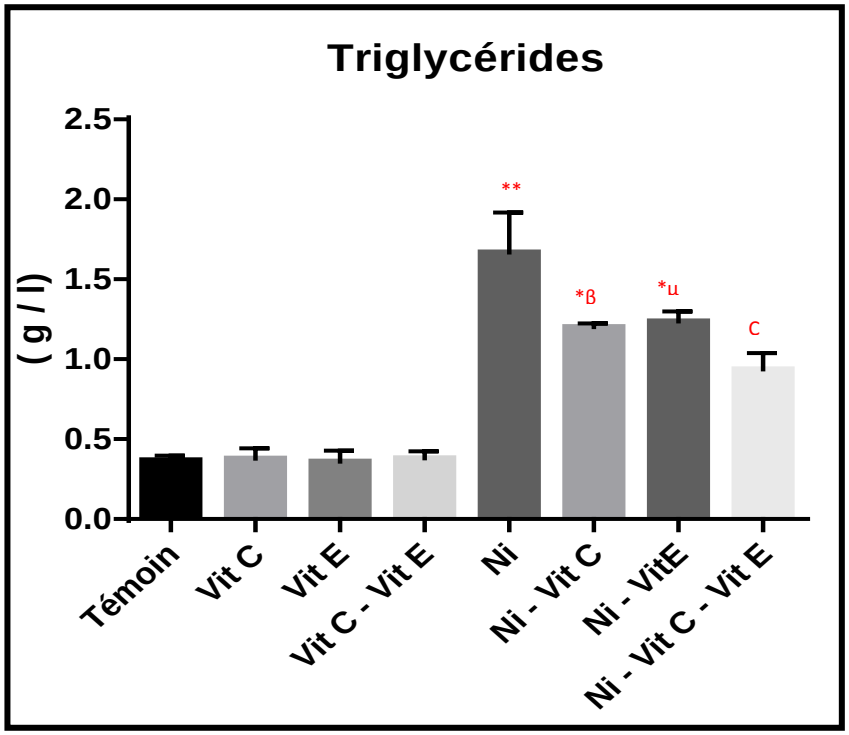


Figure 23: La concentration sérique des triglycérides chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$ Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

9. Effet des traitements sur les paramètres de stress oxydative.

Concernant l'effet oxydatif du nickel et le rôle antioxydant des vitamines, nos résultats indiquent que le taux hépatique du GSH, les activités du catalase et glutathion peroxydase ont significativement ($p < 0.001$) diminués chez les souris contaminés au nickel par rapport aux témoins.

Par contre, chez les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou / et vitamine E, nous avons constaté une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni-Vit C), (Ni - Vit E) et (Ni – Vit C – Vit E) de taux du GSH, très hautement significative ($p<0.001$) (Ni - Vit C), (Ni - Vit E) et (Ni - Vit C – Vit E) de l'activité du catalase et GSH-Px en comparaison avec le lot du nickel.

Cependant, nous avons constaté une diminution statistiquement très hautement significative ($p < 0.001$) (Ni - Vit C), hautement significative ($p < 0.01$) (Ni - Vit E) de taux de GSH hépatique, significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit C) de l'activité du catalase, hautement significative($p < 0.01$) (Ni - Vit C) et significative ($p < 0.05$) (Ni - Vit E) de l'activité du GSH-Px, en comparaison avec ceux observés chez le lot de Ni-Vit C–Vit E
(figures: 24 et 25).

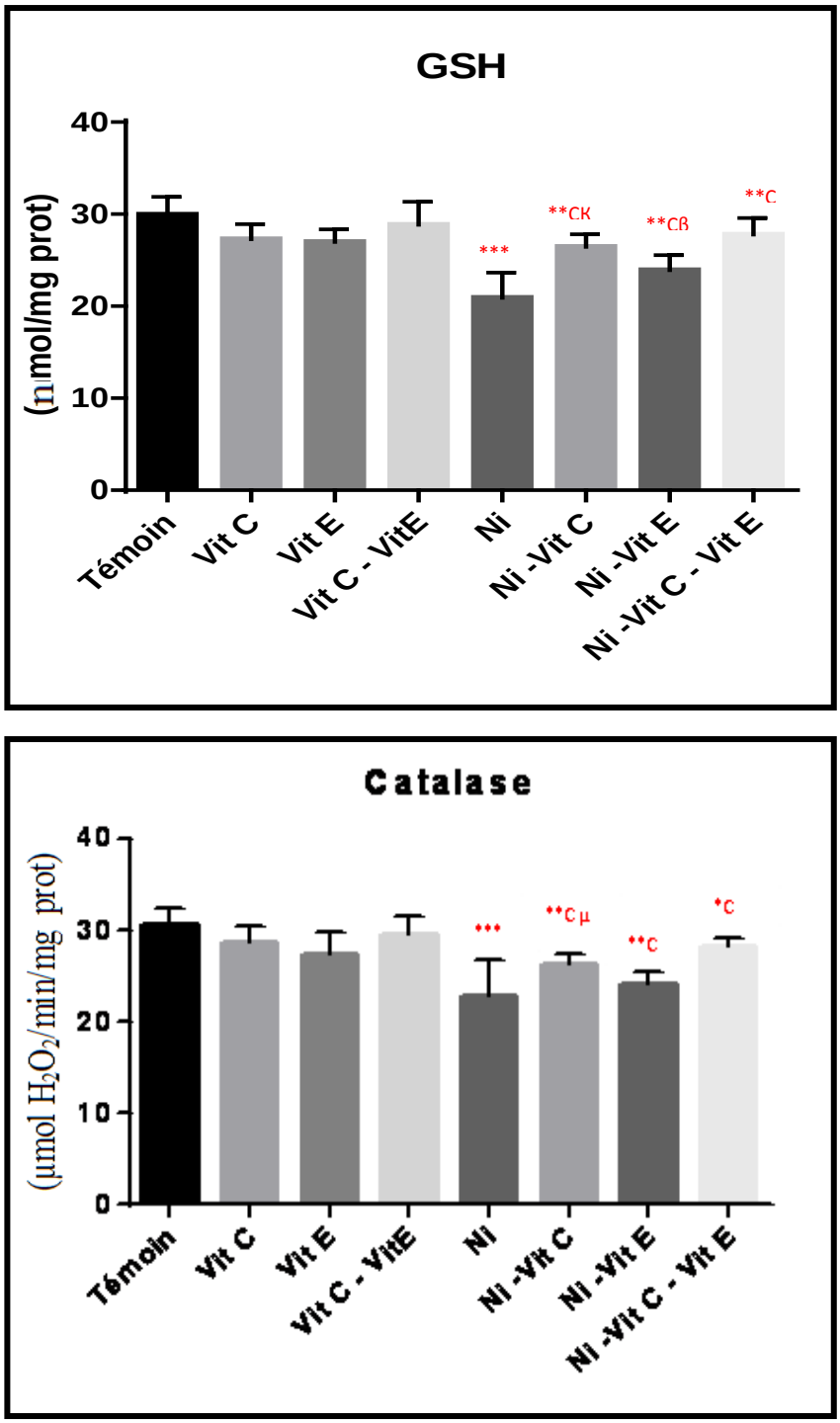


Figure 24: Variation du taux du glutathion hépatique (GSH) et l'activité enzymatique du catalase chez les souris témoins, les traitées par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminées au nickel et traitées par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: $^{K}p < 0.001$ Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

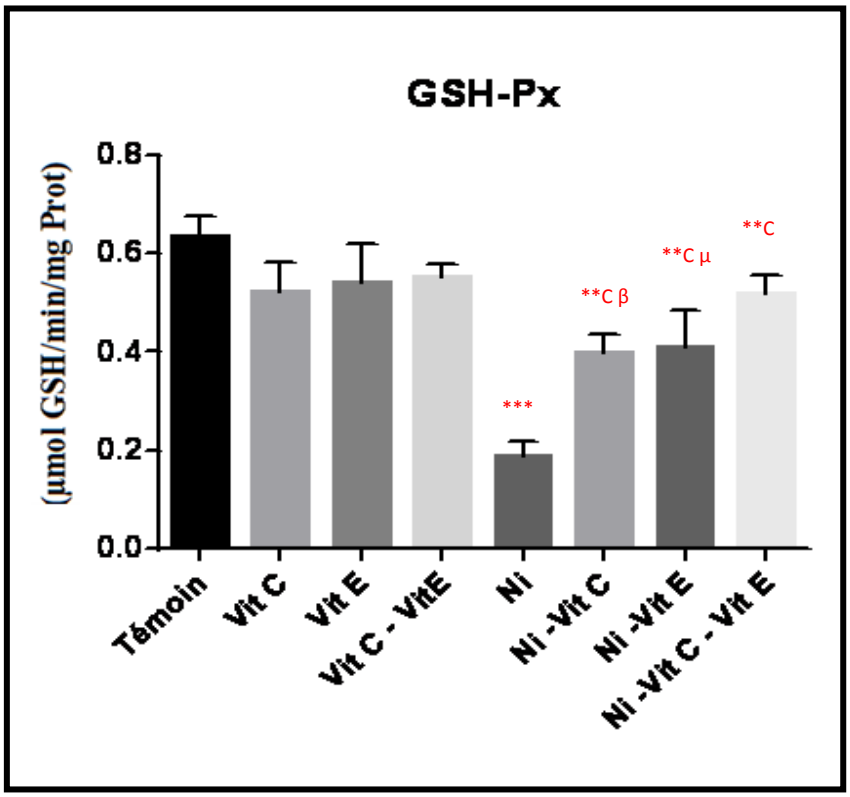


Figure 25: Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) chez les souris témoins, les traités par la vitamine C ou/et E combinée, les contaminés au nickel et les contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou/et E combinée.

$^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***témoin.***

$^{C}p < 0.001$: Comparaison par rapport au lot ***Ni.***

$^{\mu}p < 0.05$; $^{\beta}p < 0.01$: Comparaison par rapport au lot ***Ni -Vit C -Vit E***.

10. Evaluation histo-pathologiques de l'organe métabolique (foie).

L'histologie du foie pour les souris traités et témoins sont illustrées dans les figures 26. Les résultats histo-pathologiques montrent une architecture structurelle normale des hépatocytes; cellules hépatocytaires arrondies ou hexagonales séparées par des veines centrales (figure 26 A).

Le traitement par les vitamines seules ou combinés n'a causé aucun changement histologique remarquable par rapport aux témoins (Figures 26 B; C ; D).

En revanche, les souris contaminées au nickel ont montré des altérations sévères de l'architecture tissulaire du foie, caractérisées par nécrose des hépatocytes et congestion des viens centrales (figure 26 E).

Cependant, les traitements par la vitamine C et/ ou vitamine E en combinaison avec le nickel ont montré une amélioration des structure tissulaire, avec la présence de quelque cas de nécrose hépatocytaire, en comparaison avec lot du nickel (figure, 26F; G; H).

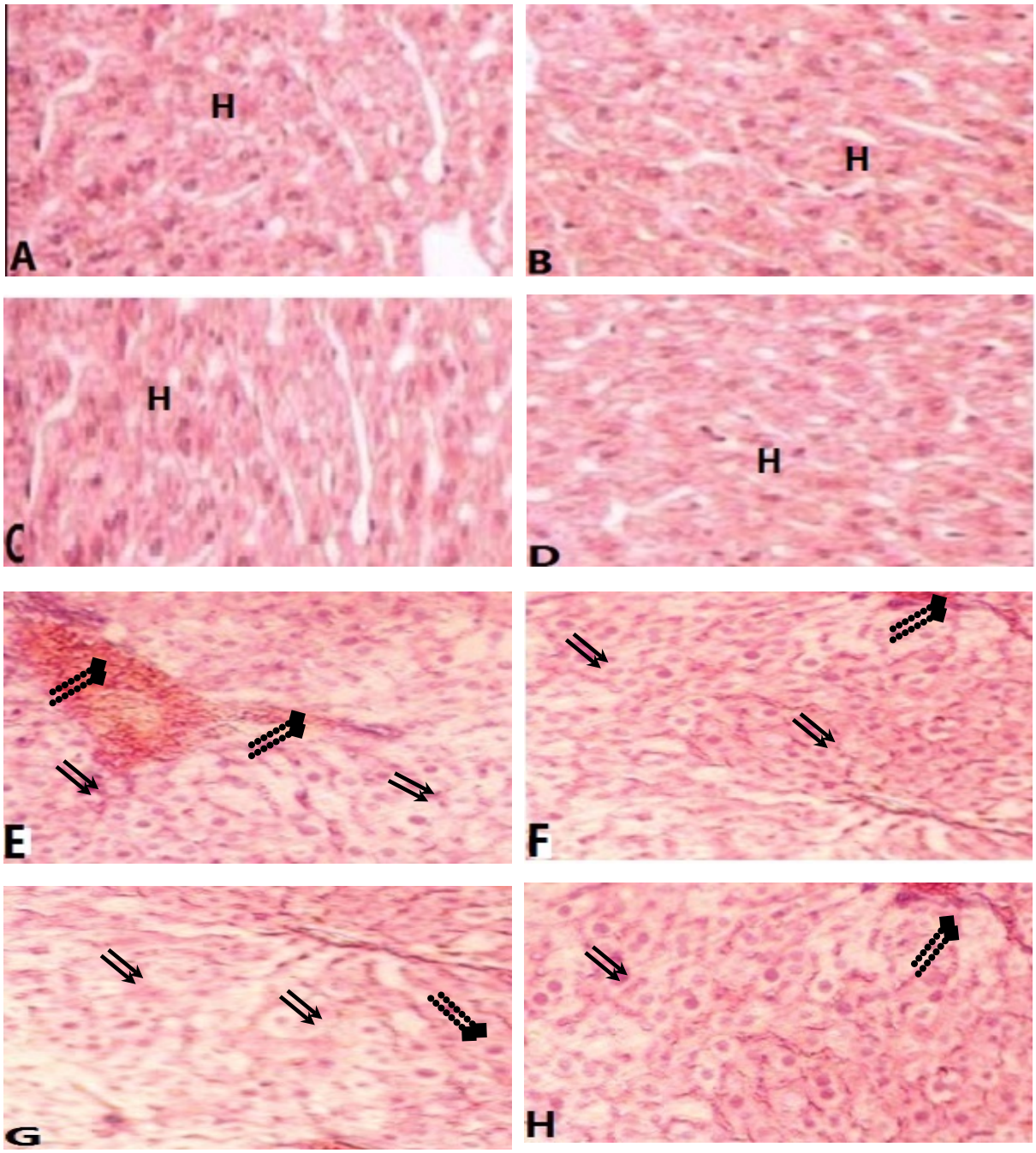


Figure 26: Coupes histologiques du foie des souris témoins (A), traitées par la vitamine C (B), traitées par la vitamine E (C), traitées par la vitamine E et C (D), des souris contaminées au nickel (E), contaminées au nickel et traitées par la vitamine C (F), contaminées au nickel et traitées par la vitamine E (G), et contaminées au nickel et traitées parla vitamine C et E (H). Hématoxyline- Eosine, Gr : x 400.

H : Hépatocytes

: Nécrose des hépatocytes

: Congestion des viens centrales

11. Evaluation histo-pathologiques de l'organe excréteur (reins)

L'histologie du cortex rénal des souris du lot témoin a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie (figure 27A)

Chez les lots traités par la vitamine C ou / et E, l'histologie du cortex rénale montre une structure normale et comparable à celle observé chez les souris témoins (figure 27B, C, D). L'architecture du cortex rénal chez les souris du lot contaminé au nickel était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés, avec la présence des foyers hémorragiques des tissus interstitiels et nécrose des tubes rénaux (figure 27E).

Pour les lots contaminés au nickel et traités par la vitamine C ou/et E, les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés). Malgré ces altérations notées chez les derniers lots, l'architecture du cortex rénale reste plus intacte que celle observée chez le lot contaminé par le nickel.

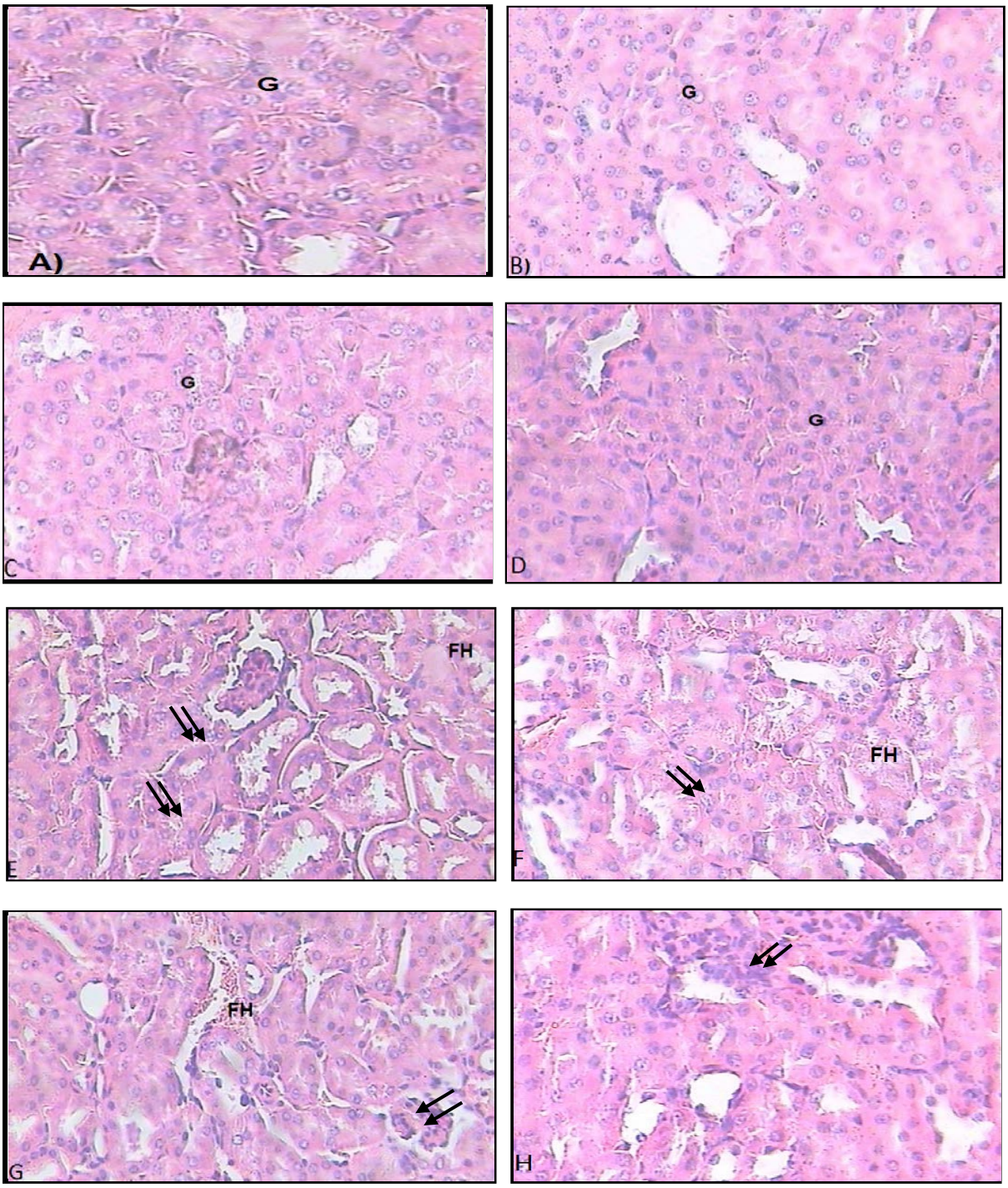


Figure 27 : Coupes histologiques des reins des souris témoins (A), traitées par la vitamine C (B), traitées par la vitamine E (C), traitées par la vitamine E et C (D), des souris contaminées au nickel (E), contaminées au nickel et traitées par la vitamine C (F), contaminées au nickel et traitées par la vitamine E (G), et contaminées au nickel et traitées parla vitamine C et E (H). Hématoxyline- Eosine, Gr : x 400.

G : Glomérules

FH : Foyers hémorragiques.

: **Nécrose tubulaire**

Chapitre 4:

Discussion et Conlusion générale

1. Discussion

Nickel est l'un des métaux lourds qui peut s'avérer gravement toxique pour l'homme et l'animale. On est exposé au nickel en inhalant de la poussière, en consommant des aliments et de l'eau, et en touchant certains objets, comme les pièces de monnaie et les bijoux. Mais c'est surtout par la consommation d'aliments et d'eau que la population est exposée au nickel **(Das et al., 2007).** Après ingestion, le nickel est rapidement absorbé à partir du tractus gastro-intestinal dans le sang, et de là dans certains organes cibles, essentiellement le foie et les reins qui concentrent les métaux lourds **(Amudha & Pari, 2011; Pari & Amudha, 2011).** Le foie étant le principal organe de l'élimination de déchets toxiques de l'organisme, car elle contient un système enzymatique impliqué dans le processus de détoxification, qui permet de neutraliser toutes les substances toxiques **(LeCluyse et al., 2012)**. De plus, le rein présente aussi un organe de l'excrétion de l'urine. Il permette d'éliminer les déchets de l'organisme, ce qui évite l'accumulation d'éléments toxiques dans le sang **(Saroj & Bai, 1999).** De nombreuse études in vivo menées sur les modèles animaux montrent que foie et le rein sont des organes ciblés par les atteintes toxiques et carcinogènes du nickel sur l'organisme **(Kasprzak et al., 1997; 2003; Boulila et al., 2015[b] ; Makni-Ayadi et al., 2016).**

A cet effet, nous avons consacré la présente étude aux effets toxiques et oxydatifs du nickel sur la fonction hépatique et rénale. Par ailleurs, la toxicité d'un xénobiotique pour un organisme peut être modifiée par l'exposition préalable, simultanée, ou consécutive à un autre xénobiotique. Les effets peuvent alors soit s'additionner ou s'amplifier, soit au contraire se combattre **(Viala, 1998).** Dans les dernières années, une grande attention a été portée sur l'utilisation intense des substances bioactives naturelles des plantes médicinales, des oligo-éléments et des vitamines pour bute d'atténuer les effets toxiques, cancérogènes et oxydatifs sur la santé humaine et animale **(Amudha & Pari, 2011; Patel et al., 2012; Lou et al., 2013; San Miguel et al., 2013).** Alors, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet protecteur de la supplémentation en vitamine C et/ou E sur le nickel qui peut induire des perturbations physiologiques, biochimiques, hématologiques et altérations histologiques à travers l'induction du stress oxydatif chez les souris males.

Dans nos conditions expérimentales, nous remarquons un déficit pondéral, une diminution de la consommation alimentaire et en eau de boisson chez les souris contaminé au nickel par rapport aux témoins. Ce résultat concorde avec celle de **Kechrid et al (2006), Adedara et al**

(2011) et Djeffal et al (2012). Le poids corporelle est définie comme un indice utile pour caractériser les risques toxicologiques **(Yavasoglu et al., 2008).** Nombreux travaux ont montré que les métaux lourds incluant le nickel sont capables d'induire des perturbations physiologiques, métaboliques, développementales, dont le stress oxydatif est une composante majeure (**Hattiwale et al., 2013)**. Ces perturbations sont due à l'inhibition de l'absorption intestinal et le transport des éléments nutritifs (les acides aminées, le glucose et certains autres minéraux essentiels comme le zinc, le fer, le magnésium, etc.), qui ont pour conséquence mauvaise assimilation des aliments par le corps **(Hattiwale et al., 2013 ; Kong et al., 2014).** De plus, des études précédentes ont montré que le perte du poids corporel peut être expliquée par l'augmentation de catabolisme des lipides et des protéines de l'organisme sous l'effet toxique **(Boulila et al., 2014[b]).** Cependant**,** la supplémentation en vitamine C et/ou vitamine E aux souris contaminées au nickel a montré une amélioration remarquable de poids corporel, en association avec l'augmentation de la consommation quotidienne de nourriture et de l'eau. Ceci pourrait être du à la réduction de l'accumulation des radicaux libres sous l'action protecteur des antioxydants. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Tikare et al. (2013).** En ce qui concerne les poids de l'organe métabolique (foie) et l'organe excréteur (riens), le nickel a causé une augmentation claire des poids absolus et relatifs du foie et des reins en comparaison avec le lot témoin. Ceci est explicable, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire et d'autre part, par l'accumulation intense de ce métal dans ces organes cibles **(Vyskocil et al., 2003; Permenter et al., 2011 ; Li et al., 2015).** De plus, le nickel peut conduire à la mort cellulaire par apoptose de certains lignées cellulaires, due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**Rudolf & Cervinka, 2010; Wang et al., 2012).** Ces dérivés lipidiques toxiques induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible **(Hannun et al., 1996 ; Lee et al., 2016).** En revanche, ces effets toxiques sur les caractères physiologies de l'animale pour les lots traités à la vitamine C et/ou vitamine E plus le nickel sont moins importants à ceux enregistrés chez les souris traités au nickel. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par **Koekkoek & van Zanten, (2016)** qu'ils ont confirmé le rôle protecteur des antioxydants contre les effets oxydatifs et cytotoxiques du nickel sur les organes cibles**.**

L'étude hématotoxique du nickel a montré une diminution importante des globules rouges (GR), d'hémoglobine (Hb), d'hématocrite (Ht), du volume globulaire moyenne (VGM), du teneur globulaire moyenne en hémoglobine (TGMH) et de la concentration corpusculaire

moyenne en hémoglobine (CCMH). Ces changements hématologiques peuvent être le résultat direct d'agressions radicalaires du stress oxydatif induit par le nickel sur les érythrocytes, en conséquence, l'oxydation des composants constitutifs des érythrocytes conduit à une diminution remarquable des cellules, qui se traduit par l'induction d'une anémie ferriprive **(Bouchoucha et al., 2013).** Au contraire, le nombre des globules blancs augmente significativement chez les souris contaminées au nickel par rapport aux témoins. Cette augmentation s'explique l'intervention des leucocytes de système de défense immunitaire contre les lésions dû aux effets des métabolites toxiques des métaux lourds **(Chuang et al., 2013)**. Par ailleurs, les traitements combinés ont montré une atténuation des effets hématotoxiques en comparaison avec le lot traité par le Ni. Ceci peut expliquer clairement le rôle antioxydant de la vitamine C et de la vitamine E contre l'effet oxydatif du nickel **(Das & Saha, 2010).**

En plus, des études précédentes ont montré que la vitamine C et la vitamine E peuvent intervenir dans le processus d'hématopoïétique par stimulation de l'activité de moelle osseuse pour la production des globules rouges et la synthèse de l'hémoglobine **(Costagliola et al., 1985; Das et al., 2007; Schaumlöffel, 2012),** conduisant ainsi à l'élévation de nombre des globules rouges.

L'analyse des paramètres biochimiques a montré une augmentation remarquable de la concentration sérique du glucose chez les souris traitées au nickel. Cette hyperglycémie est due probablement à l'action toxique de ce métal sur l'activité endocrine pancréatique par inhibition directe de la production de l'insuline par les îlots de langerhans, et il agisse aussi sur le métabolisme des hydrates de carbone **(Karami-Mohajeri & Abdollahi, 2011)**. De plus, autres études ont confirmé que le nickel et ses composés peuvent inhiber la pénétration du glucose dans les tissus animal **(Gupta et Tikoo, 2012)**. Des recherches similaires réalisées sur le poisson masculin rouge, ont montré que l'élévation du taux du glucose, peut être le résultat de la dégradation du glycogène par le glucagon sous l'intoxication de nickel. Aussi, le nickel peut induire le métabolisme des réserves de glycogène musculaire (glycogénolyse) par les glucocorticoïdes, conduisant ainsi à l'hyperglycémie plasmatique **(Kubrak et al., 2012; Pyle & Couture, 2012).** En revanche, les traitements combinés de la vitamine C et /ou vitamine E plus nickel ont diminué l'hyperglycémie. Certains travaux suggèrent que les vitamines C et E sont capables de modifier les récepteurs d'insuline des tissus musculaires et adipeux par l'augmentation de la perméabilité de la membrane a fin d'améliorer l'absorption

du glucose, et par conséquence ils conduisent à une hypoglycémie remarquable (**Tikare et al., 2011; San Miguel et al., 2013).**

Dans notre étude expérimentale, nous avons constaté aussi une augmentation de la concentration sérique du calcium chez les souris contaminées au nickel en comparaison avec les souris témoins. Ceci est probablement due à l'entrer cellulaire compétitif du nickel et du calcium à travers les mêmes transporteurs cellulaires. Elle a été documenté que l'influx d'ions nickel dans la cellule est possible à travers les canaux du calcium, le transporteur de métaux divalent de type I (Divalent Metal transport « DMT1 ») et diffusion. Cependant, le calcium entre la cellule par les canaux du calcium, lesquels le nickel utilise **(Nazıroğlu et al., 2012; Muñoz & Costa, 2012).** Cependant, les vitamines C et E ont diminué l'hypercalcémie causée par le nickel. Ceci peut expliquer par l'action des deux vitamines, en inhibant la pénétration d'ions calcium **(BjØrneboe et al., 2000).**

L'effet sur la fonction hépatique a montré une diminution claire de la concentration sérique des protéines totales et de l'albumine chez les souris traités au nickel en comparaison avec les témoins. Ceci est dû à l'intervention des groupements thiol et hydroxyle (SH, OH) des protéines dans la diminution des effets oxydatifs des radicaux libres produite par le nickel, par conséquence ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structures **(Harris et al., 2011).** D'une autre part, le nickel peut modifier le métabolisme des protéines et les acides amines et leurs synthèses au niveau du foie **(Pari & Amudha, 2011).** Cependant, la vitamine C ou/et vitamine E aide à élever le contenue des protéines et d'albumine, il l'apport presque aux limites normales par amélioration de l'activité hépatique de la biosynthèse protéique **(Hattiwale et al., 2013).**

L'élévation de la concentration de bilirubine (totale et directe) indiquée dans nos résultats peut probablement s'expliquer par l'effet hématotoxique du nickel, induisant l'hémolyse des érythrocytes et le catabolisme de l'hémoglobine qui sont responsable à hyperbilirubinemie, et la diminution de la synthèse d'albumine; le transporteur de la bilirubine **(Ali** & **Tayab, 1997).** De plus, nous avons constaté aussi que l'intoxication du nickel a provoqué une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases (AST/ALT) et de l'alcaline phosphatase (ALP), ce qui s'explique clairement l'effet hépatotoxique du nickel. Ce dernier est capable d'induire la mort cellulaire des hépatocytes par nécrose due aux effets du stress oxydatif est la production accrue des radicaux libres conduisant à la lyse cellulaire

accompagnée par libération des constituants hépatiques et cellulaire notamment les transaminases vers le milieu extracellulaire **(Pari & Amudha, 2011; He et al., 2013)**. Cependant, la vitamine C et/ou E a minimisé l'effet toxique du Ni(II) sur l'activité des enzymes transaminases (AST/ALT) et ALP, ces antioxydants peuvent stabiliser la membrane cellulaire hépatique et de protéger les hépatocytes contre les effets néfastes de nickel qui peut diminuer la fuite des enzymes vers le plasma **(Gupta & Tikoo, 2012).**

Concernant l'effet sur la fonction rénale, nos résultats ont montré aussi une augmentation claire des taux sériques de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine. Ces paramètres biochimiques sont considérés comme des biomarqueurs de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqués par ce métal. Particulièrement, l'urée et la créatinine sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale, en basant sur la filtration glomérulaire **(Vyscosyl et al., 2003)**. La concentration sérique élevée de l'urée et de la créatinine peut être expliqué par le catabolisme des composés protéiques du corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes qui jouent un rôle important dans ce processus, où les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine **(Pari & Amudha, 2011)**. D'un point physiologique, le rein est particulièrement sensible à l'action des toxiques, en raison de son intense activité métabolique et de ses multiples fonctions, notamment celles d'excrétion et de concentration des xénobiotiques **(Sunderman et al. 2001).** Le nickel s'accumule au niveau des reins, où il induit des lésions au niveau des glomérules et une protéinurie, ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, avec baisse de la filtration glomérulaire **(Tikare et al., 2013).** D'une autre part, l'augmentation de la concentration sérique de l'acide urique dans notre étude s'explique la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN) **(Cavallo et al., 2003).** Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant **(Patel et al., 2012 ; Becker et al., 1993).** Signalons que les vitamines C et E ont atténué l'effet oxydatif du nickel, conduisant à la diminution de la concentration d'acide urique, l'urée et la créatinine. Ce résultat est confirmé par nombreux chercheurs qui ont expliqué clairement le rôle antioxydant des vitamines contre la formation des radicaux libres au niveau des reins **(Droge, 2003; Ahmed et al., 2013).**

L'effet du nickel sur le profile lipidique a montré une augmentation significative de la concentration sérique des composés lipidiques qui sont principalement le cholestérol, des triglycérides et les lipides totaux. Cette augmentation peut être le résultat des dégradations intenses des lipides aux niveaux des tissus adipeux dans l'organisme (**Cempel & Janicka, 2002).** De plus, l'élévation observée de concentration en cholestérol dans le sérum, qui est associée à l'augmentation en triglycérides, peut indiquer une possible peroxydation lipidique du membrane cellulaire due aux effets oxydatifs des radicaux libres **(Das et al., 2001; Kubrak et al., 2013).** Chez les lots des traitements combinés, les concentrations sériques des paramètres lipidiques sont réglées par l'addition des vitamines C et/ou E, celui-ci semble diminuer l'activité des enzymes lipogéniques du foie, améliorer l'action de l'insuline ou augmenter l'activité de lipoprotéine lipase **(Tikare et al., 2013).**

Concernant l'effet oxydatif, le traitement par le nickel a montré une altération remarquable des systèmes de défense antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques). Parallèlement, des recherches antérieures avaient indiqué l'implication du stress oxydant dans les mécanismes de toxicité induits par le nickel **(Cavallo et al., 2003).** En fait, le stress oxydant est le résultat des processus de multi-étapes causant par un déséquilibre dans la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants (enzymatique et non enzymatique) et menant aux dommages tissulaires conduisant en premier lieu à de nombreuses maladies et finalement à l'apoptose **(Lee et al., 2016).** Alors, l'exposition aux métaux lourds, incluant le nickel peut induire un état de stress oxydant soit par production accrue des radicaux libres qui s'accumulent dans la cellule, ou par l'altération des mécanismes de défense antioxydant; y compris la détoxication et les enzymes de balayage, ou bien par l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les membranes cellulaires **(Attig et al., 2010).**

Dans la présente étude, l'exposition au nickel a eu comme conséquence une diminution du taux du glutathion (GSH) et des activités enzymatiques du catalase et du glutathion peroxydase (GSH-Px) par rapport au lot témoin. Le nickel phagocyté par la cellule augmente l'activité des radicaux libres, catalyse la transformation de l'ADN et peut causer un cancer, à travers de nombreuses réactions, produisant des métabolites intermédiaires toxiques tels que les peroxydes **(Loo et al., 2013).** Ces composés entrent dans les réactions d'oxydoréduction ou les réactions de conjugaison nécessitant du glutathion réduit, entraînant sa forte consommation, et donc sa diminution dans les cellules vivantes **(Aouacheri et al., 2009),** ce

qu'il explique clairement le rôle critique du glutathion réduit dans la biotransformation de substances exogènes y compris les métaux lourds **(SanMiguel et al., 2013)**.

Nos résultats corroborent toutes ces observations et vont dans le sens d'une induction des ERO par ce métal. 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**.** Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydants telles la glutathion peroxydase, la catalase et la super oxyde dismutase **(Loo et al., 2013).** Le nickel entraine la formation des radicaux libres responsable à l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN **(Rao et al., 2009; Lou et al., 2013))**, et par conséquent, la réduction de système antioxydant incluant la teneur en GSH au cours de l'élimination des métabolites toxiques formés par le nickel **(EL-Demerdash et al., 2012)**. Cependant, les souris contaminées au nickel et traitées à la vitamine C et/ou E comparées avec ceux contaminées au nickel ont montré une amélioration remarquable de system de défense antioxydant. Ceci, il peut s'expliqué par l'effet scavenger des vitamines vis-à-vis des radicaux oxygénés, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par le nickel peuvent se neutralisés par le GSH ils vont plutôt être captés par les vitamines en maintenant ainsi le taux normal de glutathion des cellules hépatiques **(Oda et al., 2012).** De plus, l'augmentation observée de l'activité de glutathion peroxydase GSH-Px, et de catalase dans le foie suivant le traitement par la vitamine C et E par rapport aux souris contaminées au nickel, pourrait être à cause de son action indirecte à réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène, par conséquent résulter en stress oxydant réduit **(Hoffman et al., 2012; Hattiwale et al., 2013).** Ces altérations biochimiques des marqueurs hépatiques et rénales sont supportés par les atteintes tissulaires du foie et des reins, montrant que l'exposition subchronique par voie orale du nickel entraine de multiples nécroses au niveau du foie associé à des changements de l'ultra-structure et des altérations hépatiques manifestés par nécrose cellulaire et congestion des viens centrales. Ces observations histo-pathologiques sont en accord avec ceux trouvés par **Das & Buchner, (2007).**

Bien que l'histologie du foie et des reins a été restauré au normal pour les traitements combinés avec les vitamines, ce qu'explique clairement l'effet protecteur de la vitamine C et de la vitamine E à réduire la menace des radicaux oxygénés, et par conséquence la réduction de changement pathologiques.

2. Conclusion générale

En conclusion, nos résultats montrent que l'intoxication du nickel chez les souris males adultes provoque des effets oxydatifs, hématotoxiques, hépatotoxiques et néphrotoxiques qu'on peut les résumés dans les points suivants :

- L'aspect physiologique montre que le nickel a induit un déficit pondéral avec une augmentation des poids absolus et relatifs du foie et des reins et une diminution de la consommation alimentaire et en eau de boisson par rapport au lot témoin. Signalons que la combinaison des vitamines C et E ont moindre d'effet sur ces paramètres.

- L'aspect hématologique montre une élévation des globules blancs et contrairement, les globules rouges, l'hématocrite et l'hémoglobine ont diminué significativement en comparaison avec le lot témoin. Notons que l'effet hématotoxique du nickel a diminué après l'addition de la vitamine C et/ou E.

- L'aspect biochimique montre que le nickel a induit une altération des paramètres biochimiques, biomarqueurs de la fonction hépatiques et rénale; augmentation de la concentration du glucose, du cholestérol, des lipides totaux, des triglycérides, de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, et de bilirubine total et direct, ceci s'accompagné par une augmentation de l'activité enzymatique des marqueurs hépatiques AST, ALT et ALP. Un effondrement des protéines totales, et d'albumine a été signalé aussi, ces changements sont corrigés par l'addition de la vitamine C et/ou E.

- L'effet oxydatif du nickel se manifeste par altération du système antioxydant cellulaire caractérisé par une action directe sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) et du catalase et le taux du glutathion hépatique (GSH). Tendis que, les traitements combinés du nickel et vitamines ont montré une amélioration claire de système antioxydant.

- L'aspect histologique montre des modifications tissulaires remarquables du foie des souris contaminées au nickel. Ces modifications histologiques sont caractérisés par l'appariation des nécroses hépatiques et des altérations de veine centrolobulaire. L'histopathologie des

reins a montré aussi des atteintes tissulaires, caractérisés par des nécroses tubulaires et la présence des foyers hémorragiques. Notons que ces signes histo-pathologiques sont moins importants chez les lots traités par les combinaisons ; Ni-Vit C et/ou Vit E en comparaison avec les souris contaminées au nickel.

En fin, cette étude montre que le traitement par la vitamine C et/ou la vitamine E, presque ne montre aucun changement physiologique, biochimique ou histologique remarquable par rapport au lot témoin, et les vitamines E et C combinées ont protégé mieux l'organisme animal contre les effets toxiques du nickel que chaque vitamine seule.

Perspectives

- **Perspectives**

- ✓ 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 et non enzymatique du système d'antioxydant.

- ✓ Détermination de la concentration de nickel dans le sang et quelques organes cibles en particulier le foie et les reins.

- ✓ Performer l'étude in vitro à l'échelle moléculaire et cellulaire de la toxicité du nickel, en basons sur les effets protecteurs de la vitamine C et/ou E.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques:

- Aebi, H (1974). Catalase. Meth. Enzym. Anal. Academic Press NY. **2:** 673-684.
- Ahamed, M., Ali, D., Alhadlaq, H.A., Akhtar, M. J (2013). Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). Chemosphere. **93:** 2514–2522.
- Ajith, TA., Abhishek, G., Roshny, D., Sudheesh, NP(2009). Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. Exp. Toxicol. Pathol. **61(6):**565-71.
- Alberts, D.S., Peng, Y.M., Moon, T.E (1978). Alpha-Tocopherolpretreatment increases adriamycin bone marrow toxicity. Biomed. **29(6):** 189-91.
- Ali, M.K & Tayab, S (1997). Calcium-induced bilirubin-dependent hemolysis of human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta. **1326(1):**124-30.
- Amudha, K & Pari, L (2011). Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel inducednephrotoxicity in rats. Chem. Biol. Interact. **193**:57-64.
- Anwar, K., Iqbal, J., Hussain, M.M (2007). Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. Lipid Res. **48:** 2028-38.
- Anwar, K., Kayden, H.J., Hussain, M.M (2006). Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. Lipid Res. **47:**1261-73.
- Aouacheri, W., Saka, S., Djafer, R (2009). L'effet toxique d'un insecticide (alphaméthrine) sur l'activité du système enzymatique de détoxification du glutathion. Ann. Toxicol. Anal. **21(3):** 125-129.
- Atasayar, S., Gürer-Orhan, H., Orhan, H.,Gürel, B.,Girgin, G., Ozgüneş, H (2008). Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Exp. Toxicol. Pathol. **61(1):** 23-32.
- 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.
- Attig, H., Dagnino, A., Negri, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., Banni, M (2010). Uptake and biochemical responses of mussels Mytilusgalloprovincialis exposed to sublethalnickel concentrations. Ecotoxicol. Environ. Saf. **73(7):** 1712-9.
- Audrey, F., Dumax-Vorzet, M., Tate, R.W., Rhod, H., Elder, A., Povey, C (2015). Cytotoxicity andgenotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. Mutagenesis **30(5)**: 621–633.

B

- Bal, W., Protas, A.M., Kasprzak, K.S (2011). Genotoxicity of metal ions: chemical insights. Met. Ions Life. Sci. **8:**319–373.
- Bardack, S., Dalgard, C.L., Kalinich, J.F., Kasper, C.E (2014). Genotoxic changes to rodent cells exposed in vitro to tungsten, nickel, cobalt and iron. Int J Environ. Res. Public Health **11**: 2922-40.
- Becker, B.F(1993). Towards the physiological function of uric acid. Free. Radic. Boil. Med. **14:**615-13.
- Beyersmann, D and Hartwig, A (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch. Toxicol. **82 :**493–512.
- BjØrneboe, A., BjØrneboe, G.E.,Drevoh, C.A (1990). Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. J Nutr. **90:** 0022-3166
- Bonvehi, J.S., Coll, F.V.,Rius, I.A (2000). Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienolsinvegetableoils, formulated preparations, and biscuits. Anal. Chem. Int. **83:** 627-634.
- Bouchoucha, A., Terbouche, A., Zaouani, M., Derridj, F., Djebbar, S (2013). Iron and nickel complexes with heterocyclic ligands: Stability, synthesis, spectral characterization, antimicrobial activity, acute and subacute toxicity. J Trace. Elem. Med. Biol. **27:** 191– 202.
- Boulila, S., El Feki, A., Oudadesse, H., Kallel, C., El Feki, H (2014)[a]. Detoxification of rats subjected to nickel chloride by a biomaterial-based carbonated orthophosphate. Ann. Pharm. Fr. **72(5)**: 348-62.
- Boulila, S., Elfeki, A., Oudadesse, H., Elfeki, H (2015)[b]. Substitution effects of a carbonated hydroxyapatite biomaterial against intoxication chloride nickel-exposed rats. Toxicol. Mech. Methods **25**:155-65.
- Bradford, M.M (1976).A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protien utilizing the principale of protien dye binding. Anal. Biochem. **72:**248-254.
- Burtis,A(1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Academic NY, pp 223-229.

C

- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L.,Sauvaigo, S (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guaninelesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biol. Chem. **383(6):** 93-98.

- Cavallo, D., Ursini, CL., Setini, A., Chianese, C., Piegari, P., Perniconi, B and Iavicoli, S (2003). Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. Toxicol. In Vitro **17(5-6):** 603-607.
- Cempel, M & Janicka, K (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat Organs after oral administration of nickel (II) chloride.Biol. Trace Elem. Res. **90 (1):** 215–226.
- Chappuis P (1991). Les oligo-éléments en médecine et biologie. Lavoisier / Tec & Doc. Paris. ISBN, 978-2-85206-714-1. pp 555-632.
- Chi, C.W., Deng, Y.L., Lee, J.W., Lin, C.P (2016). Fracture resistance of dental nickel-titanium rotary instruments with novel surface treatment: Thin film metallic glass coating. J Formos Med. Assoc. **6646(16)**: 30145-30150.
- Chuang, H.C., Hsueh, T.W., Chang, C.C., Hwang, J.S., Chuang, K.J., Yan, Y.H., Cheng, T.J (2013). Nickel-regulated heart rate variability: The roles of oxidative stress and inflammation. Toxicol. Appl. Pharmacol. **266:** 298–306.
- Ciccarelli, R.B & Wetterhahn, K.E (1982).Nickel Distribution and DNA Lesions Induced in Rat Tissues by the Carcinogen Nickel Carbonate. Cancer Res. **42:** 3544-3549.
- Costa, M., Salnikow, K., Cosentino, S., Klein, C.B., Huang, X.I., Zhuang, Z (1994). Molecular Mechanisms of NickelCarcnogenesis. Environ. Health Perspect. **102(Suppl 3):** 127-130.
- Costagliola, C., Libondi, T., Menzione, M., Rinaldi, E., Auricchio, G (1985). Vitamin E and Red Blood Cell Glutathione. Metabolism **34(8):** 712-714.

D

- Das, K.K and Buchner, V (2007). Effect of nickel exposure on peripheral tissues: role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. Rev. Environ. Health **22(2):** 157–173.
- Das, K.K., Das, S.N., DasGupta, S (2001). Influence of ascorbic acid against nickel-induced hepatic lipid peroxidation in rats. J Basic Clin. Physiol. Pharmacol. **12(3):**187-95.
- Das, K.Kand Dasgupta, S (2002). Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. Environ. Health Perspect. **110(9):** 923-6.
- Das, K.K., Gupta, A.D., Dhundasi, S.A., Patil, A.M,, Das, S.N., Ambekar, J.G (2007). Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate. Biometals **20(2):**177–184.
- Das, K.K & Saha, S (2010). L-ascorbic acid and a-tocopherol supplementation and antioxidant status in nickel or lead exposed rat brain tissue. J Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. **21(4) :**325–346.

- David, S., Hall, D J., Lockwood, C.B., Barry, R., Mac, D (2015). Nickel hydroxides and related materials: a review of their structures, synthesis and properties. Proc. Math. Phys. Eng. Sci. **471(2174):** 20140792.
- De Brouwere, K., Buekers, J., Cornelis, C., Schlekat, C.E., Oller, A.R (2012). Assessment of indirect human exposure to environmental sources of nickel: Oral exposure and risk characterization for systemic effects. Sci.Total. Environ. **419:** 25–36.
- Denkhaus, E & Salnikow, K (2002). Nickel essentiality, toxicity and carcinogenicity. Rev. Oncol-Hem. **42:** 35-56.
- Delmotte, B., Lienard, M., Abadia, G.,Gingomard, M.A (2001). Encyclopédie Médico chirurgicale: Toxicol. Pathol. Profess. 16-004-A-10.
- Dickinson, D.A & Forman, H.J (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol. **64:** 1019-26.
- Djeffal, A., Messarah, M., Boumendjel, A., Kadeche, L., El Feki, A (2012). Protective effects of vitamin C andselenium supplementation onmethomyl-induced tissueoxidative stress in adult rats. Toxicol. Ind. Health 1-13. DOI: 10.1177/0748233712468020.
- Droge, W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Cell. Physiol. Rev. **82:** 47-56.

E

- Ebuehi, O.A., Ogedegbe, R.A., Ebuehi, M.O (2012). Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead-induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. Nig. Q J. Hosp. Med. **22(2):** 85-90.
- El-Demerdash, F.M., Attia, A.A., Elmazoudy, R.H (2012). Biochemical andhistopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. Journal of Environ. Sc. Health Part A: Toxic/Hazard. Sub. Environ. Eng. **47(12):** 1948-1954.
- Ellman, G.L (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. **82:** 70–77.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G (1992).The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free. Rad. Biol. Med. **13:** 341-54.
- Evans, H.M., Emerson, O.H., Emerson, G.A (1936). The isolation from wheat-germ oil of an alcohol, α-tocopherol, having the properties of vitamin E. J Biol. Chem. **33:**113, 319.

F

- Favier, A (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans lacompréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. **33:** 108-115.

- Favier A., Maljournal B (1980). Données récentes sur la biochimie de certains oligo-éléments. In : Problèmes Actuels de Biochimie Appliquée. 11e série, édité par Masson, Paris. pp 1-74.
- Favier A (1992). The role of zinc in reproduction : hormonal mechanisms. Hormonal effects of zinc on growth in children, Biol. Trace Elem. Res. **32:** 363-398.
- Flohé, L & Günzler, W.A (1984). Assays of glutathione peroxidase. Meth. Enzymol. **105:**114-21.
- Frei, B (2004). Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. J Nutr. **134:** 3196S – 3198S.
- Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M. J., Kawanishi, S (2005). Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. Biochem J. **388:** 813-8.

G

- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., Al-Gubory, K.H (2007). Oxidative stressInducibleantioxidant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal celldeath in vivo. Free. Rad. Res. **41:**251-9.
- Gey, K.F (1998). Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. Biofactors. 7**:** 113-174.
- Gupta, J andTikoo, K (2012).Involvement of insulin-induced reversible chromatin remodeling in altering the expression of oxidative stress-responsive genes under hyperglycemia in 3T3-L1 preadipocytes. Gene **504(2):** 181-91.

H

- Haddad, J (1999). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39:** 67-72.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O (2007). Le stress oxydant.Rev. Med. Liège. **62:** 628-638.
- Haney, JT., McCant, DD., Sielken, RL.Jr., Valdez-Flores, C., Grant, R.L (2012). Development of a unit risk factor for nickel and inorganic nickel compounds based on an updated carcinogenic toxicity assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. **62:** 191–201.
- Hannun, Y.A (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. Sciences **274:** 1855-1859.

- Harris, R.M., Williams, T.D., Hodges, N.J.,Waring, R.H (2011). Reactive oxygen species and oxidative DNA damage mediate the cytotoxicity of tungsten–nickel–cobalt alloys in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. **250:** 19–28.
- Hassan, S., Bilal, N., Naqvi, S., Md Ashraf,G., Souhail, N., Sharma, S., Banu, N (2011). Multivitamin-mineral and vitamins (E + C) supplementation modulate chronic unpredictable stress-induced oxidative damage in brain and heart of mice. Biol. Trace. Elem. Res. **142(3):** 589-97.
- Hattiwale, S.H, Saha S, Yendigeri S.M, Jargar J.G, Dhundasi S.A, Das K.K (2013). Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. Biometals. **26:** 329–336.
- He, M.D., Xu, S.C., Zhang, X., Wang, Y., Xiong, J.C., Zhang, X., Lu, X.L., Zhang, L., Yu, Z.P., Zhou, Z (2013). Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changesinduced by nickel in mice. Neuro. Toxicol. **38:** 9–16.
- Henderson, R.G., Cappellini, D., Seilkop, S.K., Bates, H.K., Oller, H.R (2012). Oral bioaccess ibility testing and read-across hazard assessment of nickel compounds. Regul. Toxicol. Pharmacol. **63:** 20–28.
- Hensley, K & Floyd, R.A (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging:a look back, a look ahead. Arch. Biochem. Biophy. **397:** 377-83.
- Hoffman, R.P., Dye, A.S., Bauer, J.A (2012). Ascorbic acid blocks hyperglycemic impairment of endothelial function in adolescents with type 1 diabetes. Pediatr. Diab. **13(8):** 607-10.
- Horovitz C.T (1988). Is the major part of the periodic system really inessential for life. Trace Elem. Electr. Health Dis. **2:** 135-144.
- Houlot, R (1984). Techniques d'histopathologieet de cytopathologie, Ed Maloine, pp 19- 21, 225 – 227.
- Hunt, J.V & Wolff, S.P (1991). Oxidative glycation and free radical production: a causalmechanism of diabetic complications. Free Rad. Res. Commun. **12:**115-23.

I

- International Agency for Research on Cancer: IARC (2012). Nickel and nickel compounds. A review of human carcinogens.part c: Arsenic, metals, fibres, and dusts/IArc Working group on the Evaluation of carcinogenic risks to Humans (2009: Lyon, France), vol 100c, Lyon, France.

K

- Kaplan, L.A(1984). Glucose. Kaplan A et al .Clin chem. The C.V. mosby Co. Silouis. Tronto. Princeton. pp 1032-1036.
- Kaplan, A et al (1984).Lipids.Clin. Chem. Toronto. Princeton. pp 918-919.
- Kaplan, A et al**.** (1984). Tryglycerides.Clin. Chem. Toronto. Princeton. p 437.
- Karami-Mohajeri, S., Abdollahi, M (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, andorganochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. Hum. Exp. Toxicol. **30(9):** 1119-1140.
- Kasprzak, K.S., Jaruga, P., Zastawny, T.H., North, S.L., Riggs, C.W., Olinski, R., Dizdaroglu, M (1997). Oxidative DNA base damage and its repair in kidneys and livers of nickel (II)-treated male F344 rats. Carcinogenesis **18(2):** 271-7.
- Kasprzak, KS., Diwan, BA., Kaczmarek, MZ., Logsdon, DL., Fivash, MJ., Salnikow, K (2011). Effects of ascorbic acid on carcinogenicity and acute toxicity of nickel subsulfide, and on tumor transplants growth in gulonolactone oxidase knock-out mice and wild-type C57BL mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. **257(1):** 32-7.
- Kasprzak, KS., Sunderman, FW.Jr., Salnikow, K (2003). Nickel carcinogenesis. Mutat. Res. **533(1-2):** 67-97.
- Kechrid, Z., Dahdouh, F., Djabar, R.M., Bouzerna, N(2006). Combined effect ofwater contamination with cobalt and nickel on metabolism of albino (Wistar) rats. Environ. Health Sci. Eng. **3(1):**65-69.
- Kinsky, N (1989). Antioxydants function of carotenoides, Free Rad. Biol. Med. **7:** 617-622.
- Koekkoek, W.Aand van Zanten, A.R (2016). Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. Nutr. Clin. Pract. **31(4):**457-74.
- Kolokitha, O.E & Chatzistavrou, E (2009). A severe reaction to nicontaining orthodontic appliances. Angle Orthodontist **79(1):**186–92.
- Kong, L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., Wei, C., Liang, G., Pu, Y (2014). Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. Int. J Mol. Sci. **15(11):** 21253-69.
- Kubrak, O.I., Rovenko, B.M., Husak, V.V., Storey, J.M., Storey, K.B.,Lushchak, V.I (2012). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish Carassiusauratus L. Ecotoxicol. Environ. Saf. **80:** 231–237.

L

- LeCluyse, E. L., Witek, R.P., Andersen, M.E., Powers, M.J (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. Crit. Rev. Toxicol. **42**: 501-48.
- Lee, Y.J., Lim, S.S., Baek, B.J., An, J.M., Nam, H.S., Woo, K.M., Cho, M.K., Kim, S.H., Lee, S.H (2016). Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. Environ. Toxicol. Pharmacol. **42**:76-84.
- Lee, G.C., OkSon, Y., Pratheesh, K.P., Shi, X (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis. Free Rad. Biol. Med. **53:** 742–757.
- Levine, M., Rumsey, S.C., Daruwala, R., Park, J.B.,Wang, Y (1999). Criteria and recommendations for vitamin C intake. J Amer. Med. Assoc. **281:** 1415-1423.
- Li, X., Huang, J., May, JM (2003). Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **305:** 656–661.
- Li, Q., Liu, H., Alattar, M., Jiang, S., Han, J., Ma, Y., Jiang, C (2015). The preferential accumulation of heavy metals in different tissues following frequent respiratory exposure to PM2.5 in rats. Sci. Rep. **19:**5:16936.
- Li, Y & Zamble, D.B (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. Chem. Rev. **109:** 4617–4643.
- Liang, W.J., Johnson, D., Jarvis, S.M (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. Mol. Membr. Biol. **18:** 87–95.
- Lindsay, D.G & Astley, S.B (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants :Eurofeda. Mol. Aspects Med. **23:** 1-38.
- Lou, J., Jin, L., Wu, N., Tan, Y., Song, Y., Gao, M., Liu, K., Zhang., He, J (2013). DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. Food Chem. Toxicol. **55:** 533–540.
- Lou, S., Zhong, L., Yang, X., Xue, T., Gai, R., Zhu, D., Zhao, Y., Yang, B.O., Ying, M., He, Q (2013). Efficacy of all-trans retinoid acid in preventing nickel induced cardiotoxicity in myocardial cells of rats. Food Chem. Toxicol. **51:** 251–258.
- Lu, H., Shi, X., Costa, M., Huang, C (2005). Carcinogenic effect of nickel compounds. Mol. Cell. Biochem. **279:**45–67.

M

- Makni-Ayadi, F., Sayadi, S., El Feki, A., Dhouib, A (2016). Protective effect of Dunaliella sp., lipid extract rich in polyunsaturated fatty acids, on hepatic and renal toxicity induced by nickel in rats. Toxicol. Mech. Methods. **26(3):** 221-30.
- Maniyar, S.A., Jargar, J.G., Das, S.N., Dhundasi, S.A., Das, K.K (2012). Alteration of chemical behavior of L-ascorbic acid in combination with nickel sulfate at different pH solutions in vitro. Asian Pacif. J Trop. Biomed. **36(2):** 220-222.
- Marklund, S.L., Adolfsson, R., Gottfries, C.G.,Winblad, B (1985). Superoxide dismutase isoenzymesin normal brains and in brains from patients with dementia ofAlzheimer type. J Neurol. Sci. **67:** 319-25.
- May, J.M., Cobb, C.E., Mendiratta, S., Hill, K.E., Burk, R.F (1998). Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. **273:** 23039-45.
- Meister, A (1988). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. J Biol. Chem. **269(13):** 9397-400.
- Mertz W (1986). Trace elements in human and animal nutrition. Edited par Academic Press, New-York. P 453.
- Michaylova, V & Ilkova, P (1971). Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. Analytica Chimica Acta. **53:** 194-198.
- Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS andneuro-degenerative diseases, Marcel Dekker, New York, 55-67.
- Muñoz, A & Costa, M (2012). Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity.Toxicol. Appl. Pharmacol. **260:** 1–16.
- Murry, R (1984).Aspartate aminotransferase. Clin. Chem. Toronto. pp 1112-1116.
- Murry, R.L (1984).Creatinine.Clin. Chem. Toronto. Princeton. pp 1261-1266.

N

- Naito, H.K (1984). Cholesterol. Clin. Chem. Toronto. Princeton. pp 1094-11206.
- Nakamura, Y.K & Omaye, S.T (2008). Alpha-tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. Nutr. Res. **28(10):**671-80.

- Nazıroğlu, M., ÇIğ, B., Doğan, S., Uğuz, A.C., Dilek, S., Dahdouh, F (2012). 2.45-Gz wireless devices induce oxidative stress and proliferation through cytosolic Ca^{2+} influx in human leukemia cancer cells. Rad. Biol. **88(6):** 449-456 (doi:10.3109/09553002.2012.682192).
- Oberley, T.D & Oberley, L.W (1997). Antioxidant enzyme levels in cancer. Histol. Histopathol. **12:** 525-35.
- Oda, S.S & El-Maddawy, Z.KH (2012).Protectiveeffect of vitamin E and selenium combination on deltamethrin-induced reproductive toxicity in male rats. Exp. Toxicol. Pathol. **64:** 813–819.
- Oller, A.R., Kirkpatrick, D.T., Radovsky, A., Bates, H.K(2008). Inhalation carcinogenicity study with nickel metal powder in Wistar rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. **233 (2):** 262–275.

P

- Packer, L (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. Am. J Clin. Nutr. **53(4 Suppl):** 1050S-1055S.
- Pari, L & Amudha, K (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. Eur. J Pharm. **650 (2011):** 364–370.
- Patel, E., Lynch, C., Ruff, V., Reynolds, M (2012). Co-exposure to nickel and cobalt chloride enhances cytotoxicity and oxidative stress in human lung epithelial cells.Toxicol. Appl. Pharmacol. **258:** 367–375.
- Permenter, M.G., Lewis, L.A., Jackson, D.A (2011). Exposure to nickel, chromium, or cadmium causes distinct changes in the gene expression patterns of a rat liver derived cell line. PLoSOne**6(11):** e27730. DIO: 10.1371/journal.pone. 0027730.
- Pyle, G.C(2012). Nickel. Homeo.Toxicol. Essen. Met. **13:**253–289.

R

- Rahman, I., Biswas, S.K., Kode, A (2006). Oxidant and antioxidant balance in theairways and airway diseases. Europ. J Pharmacol. **533:**222-39.
- Rao, M.V., Chawla, S.L.,Sharma, S.R(2009). Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. Food. Chem. Toxicol. **47(6):** 1368-71.
- Richard, S.S (2001). Environmental tobacco smoke and serum vitamin C levels in children. Pediatrics **107:** 540-2.
- Rosalki, S., et al.(1993). Clin. Chem. **39 (4):**648-652.
- Rosen, D.R., Siddique , T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, JP., Deng, HX (1993). Mutations in Cu/Zn superoxidedismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature **362:**59-62.

- Rudolf, E & Cervinka, M (2010). Nickel modifies the cytotoxicity of hexavalent chromium in human dermal fibroblasts. Toxicol. Lett. **197(2) :** 143-150.

S

- Salvayre, R., Auge, N., Nègre-Salvayre, A (2003). Rôle de l'oxydation dans la genèse et la rogressiondel'athérosclérose. Chapman, Eds. Masson: Paris, pp 269-290.
- SanMiguel, S.M., Opperman, L.A., Allen, E.P., Zielinski, J.E., Svoboda, KK.H (2013). Antioxidant combinations protect oral fibroblasts against metal-induced toxicity. Arch. Oral. Biol. **58:** 299 – 310.
- Sarah, Z.,Tasker, E., Standley, A., Timothy F.J (2014). Recent advances in nickel catalysis. Nature **15:** 509(7500): 299–309.
- Saroj, K.C & Bai, C (1999). Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. Biomed. Pharm. **58**: 1501–1510.
- Schaumlöffel, D (2012). Nickel species: Analysis and toxic effects. J. Trace Elem. Med. Biol. **26:** 1– 6
- Schiffer, RB., Sunderman, FW.Jr., Baggs, R.B., Moynihan, J.A (1991). The effects of exposure to dietary nickel and zinc upon humoral and cellular immunity in SJL mice. J Neuroimmunol. **34(2-3):** 229-39.
- Schultz, A. (1984). Uric acid. Clin. Chem. Toronto. Princeton, pp 1261-1266.
- Sies H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am. J Med. **91:** 31S-38S.
- Southon, S., Gee, J.M., Johnson, T.T (1984). System diet for mice and rats. Br. J. Nutr. **52(2):** 371-80.
- Stadtman, E.R (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Ann. Rev. Biochem. **62:** 797-821.
- Stevnsner, T., Thorslund, T., Desouza-Pinto, N.C., Bohr, V.A (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. Exp. Gerontol. 7**:** 1189-96.
- Stohs, S.J & Bagchi, D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Rad. Biol. Med. **18:** 321-36.
- Sunderman, FW. Jr., Hopfer, S.M., Sweeney, K.R., Marcus, A.H., Most, B.M., Creason, J (2001).Nickel absorption and kinetics in human volunteers. J Biol. Chem. **276(25):** 22223-222230.
- Surai, P.F (2002). Vitamin E.In :Surai P.F., Natural antioxidants in avian nutrition andreproduction. Nottingham University Press: Nottingham 27-128.

T

- Tallkvist, J (1997). Nickel Permeation Pathways in the Small intestine and Olfactory System.Doctoral thesis, Department of Pharmacology and toxicology,Swedish University of Agricultural Sciences,Uppsala. Sweeden, pp 13-21.
- Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F., Girotti, A.W(1990). Protective action ofphospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipidperoxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. J Biol. Chem. **265:** 454-61.
- Tikare, SN., Das-Gupta, A., Dhundasi, SA., Das, KK (2011). Effect of antioxidants L-ascorbic acid and alpha-tocopherol supplementation in nickel exposed hyperglycemic rats. J Basic.Clin. Physiol. Pharmacol. **19(2):** 89-101.
- Tikare,S., Yendigeri, S., Das, G.A., Salim, A.D., Das, K.K (2013). Protective effect of α-tocopherol against hematotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by nickel sulfate in male albino rats.Indian J. Physiol. Pharmacol. **57(3):** 280–292.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., Hediger, MA (1999). A family of mammalian Na^+ - dependent L-ascorbic acid transporters. Nature **399:** 70–75.

V

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell Biochem. **266(1-2):** 37-56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Monco, l.J., Izakovic, M., Mazur, M (2006). Free radicals, metals andantioxidants inoxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. **160:**1–40.
- Viala, A. (1998). Eléments de Toxicologie. Editions, Tec & Doc. pp 513, 453.
- Volke, A., Rünkorg, K., Wegener, G., Vasar, E.,Volke, V (2013). Dual effect of nickel on L-arginine/nitric oxide system in RAW 264.7 macrophages. International Immuno. Pharmacol. **15:** 511–516.
- Vyskocil, A., Viau, C., Cizkova, M (1993). Chronic nephrotoxicity of soluble nickel inrats. Hum. Exp. Toxicol. **13(10):** 689-93.

W

- Wandzilak, T.R., D'Andre, S.D., Davis, P.A., Williams, H.E (1994). Effect of high dose vitamin C on urinary oxalate levels. J Urol. **151:** 834-837.
- Wang, Y.F., Shyu, H.W., Chang, Y.C., Tseng, W.C (2012). Nickel (II) induced cytotoxicity and apoptosis in human proximal tubule cells through a ROS and metochondria-mediatedpathway. Toxicol. Appl. Pharmacol. DOI: 10.1016/j.taap.
- Wozniak, K & Blasiak, J(2002). Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride. Mutat . Res. **514(1-2):** 233-243.

Y

- Yang, C., Zhang, T., Li, Z., Xu, L., Liu, F., Ruan, J., Liu, K., Zhang, Z (2013). P-glycoprotein is responsible for the poor intestinal absorption and low toxicity of oral aconitine: In vitro, in situ, in vivo and in silico studies. Toxicol. Appl. Pharmacol. pii: S0041-008X(13)00431-6. doi: 10.1016/j.taap.2013.09.030.
- Yavasoglu, A., Karaaslan, M.A., Uyanikgil, Y., Sayim, F., Ates, U., Yavasoglu, N.U (2008). Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. Exp. Toxicol. Pathol. **60(4-5):**391-6.
- Yildirim, O & Büyükbingöl, Z (2003). In vivo effect of vitamin C with cobalt on oxidative stress in experimental diabetic rat kidney. Diabetes Nutr. Metab. **16:** 208-13.

Z

- Zhang, Q., Kusaka, Y., Zhu, X., Sato, K., Mo, Y., Kluz, T., Donaldson, K (2003). Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. Occup. Health **45(1):** 23-30.

Annexes

1. Fiches techniques des dosages biochimiques :

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour Dosage du Glucose

Réactifs Utilisés

Les réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R1) (Tampon) pH = 7,5	-Phosphate -Phénol -Glucose Oxydase -Peroxydase -4- Aminoantipyrine	70 mmole/l 5 mmole/l > 10 U/L 1 U/L 0,4 mmol/l
Réactif (R2) Etalon de glucose	-Glucose	100 mg/dl (5.55mmole/l)

Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon (R2)	-----	10µl	------
Echantillon	-------	-------	10µl
Réactif (R1)	1 ml	1 ml	1 ml

-Agiter bien et incuber pendant 5 min à 37 °C.

-Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 500 nm contre le blanc, le couleur est stable pendant 30 minutes.

Calcul : La concentration du glucose dans l'échantillon est calculée par la formule suivante:

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

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour Dosage du calcium

Réactifs utilisés

Réactif 1 : Tempon pH 7.5	Ethanolamine	500 mmol/l
Réactif 2 : Chromogen	O-Cresolphtalein 8- Hidroxyquinolein	0.62mmol/l 69 mmol/l
Etalon	Calcium aqueous (standard)	10mg/dl

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

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif 1 (ml)	1.0	1.0	1.0
Réactif 2 (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	---	20	---
Echantillon (µl)	---	---	20

Echantillon : Sérum

Mode opératoire :

- 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 à 570 nm.
- La coloration finale est stable au moins 40 minutes.

Calcul de la concentration

$$Calcium\ (mg/dl) = \frac{(A)\ Echantillon}{(A)\ Etalon}\ X\ Concentration\ de\ l'étalon\ (10\ mg/dl)$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour dosage des protéines totales

Réactifs utilisées

Réactif (1) : Biuret	Sodium potassium tartrate Sodium iodique Potassium iodique Sulfate de cuivre (II)	15 mmol/l 100 mmol/l 5 mmol/l 19 mmol/l
Réactif (2)	Sérum albumine bovin	7g/dl

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire

	Blanc	**Etalon**	**Echantillon**
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	---	20	---
Echantillon (µl)	---	---	20

- 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 à 540 nm.
- La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Calcul de la concentration

$$\textit{Protéine totale (g/dl)} = \frac{\textit{(A) Echantillon}}{\textit{(A) Etalon}} \textit{ X Concentration de l'étalon (7g/dl)}$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour dosage l'albumine

Réactifs utilisés

Réactif (1)	Vert de bromocrésol pH 4.2	0.12 mmol/l.
Réactif (2)	Sérum albumine aqueux (standard)	5g/dl

Réactif de travail: réactif est l'étalon sont prêts à l'emploi

Echantillon : Sérum

Mode opératoire

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

- Mélanger, incuber pendant 10 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 630 nm. --
- La coloration finale est stable au moins 1 heure.

Calcul de la concentration

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

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour dosage de la bilirubine totale et directe.

Réactifs utilisés

Réactif 1 (D)	Acide sulfanique Acide hydrochlorique (HCl)	30 mmol/l 150 mmol/l
Réactifs 2 (T)	Acide sulfanique Acide hydrochlorique Dimethylsulfoxide (DMSO)	30mmol/l 50mmol/l 7mol/l
Réactifs 3	Nitrate de sodium	29 mg/dl

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire :

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

- 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 555 nm.

Calcul de la concentration

Bilirubine totale (mg/dl)= [(A) Echantillon – (A) blanc de l'échantillon] x 19.1

Bilirubine directe (mg/dl)= [(A) Echantillon – (A) blanc de l'échantillon] x 14

Fiche technique « spinreact » pour dosage de l'activité de l'aspartate aminotransferanse (AST/TGO).

Échantillon : Sérum.

Les Réactifs utilisés

Les Réactifs	***Composition***	***Concentration***
Réactif (R1) (Tampon)	Solution TrisTampon pH 7,8 L-aspartate	80 mmole/l 200 mmole/l
Réactif (R2)	NADH Malate déhydrogenase (MDH) α -Cétoglutarate	0.18 mmol/l. 600U/L. 12 mmole/l

Mode opératoire

Température °C	37 °C
Réactif du travail	1 ml
Echantillon	50µl

Préparation de réactif de travail (RT) :

-Dissoudre le contenant de réactif (R2) dans le flacon de réactif (R1), puis agiter bien la solution jusqu'elle devient homogène.

Mélanger, incuber les tubes préparés pendant 1 min à la température de 37°C et lire l'absorbance (A) à 340 nm, avec trios répétitions (chaque 1 min d'incubation).

Calcul

ΔDO x 1750= activité TGO (U/L)

D'où Δ DO présente la valeur moyenne de trois lectures.

Fiche technique » Spinreact « pour Dosage de l'activité de l'alanine aminotransferase (ALT/TGP).

Echantillon : Sérum

Les réactifs utilisés

Les Réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R1)	Tris pH 7.8 L- alanine	100 mmol/l 500 mmol/l
Réactif (R2)	NADH Lactate déhydrogenase (LDH) α -Cetoglutarate	0.18 mmole/l 1200 U/L 15 mmol/l

Mode opératoire

Température	30°C	37 °C
Réactif du travail	1 ml	1 ml
Echantillon	100 µl	50µl

Préparation de réactif du travail (RT)

Dissoudre le contenant de Réactif (R2) dans le flacon de (R1). Ce Réactif est stable 2 semaine à 2- 8 °C.

-Mélanger, incuber les tubes préparés pendant 1 min à la température utilisée pour l'essai et lire l'absorbance (A) à 340 nm, avec trios répétitions (chaque 1 min d'incubation).

Calcul : **ΔDO x 1750 = activité TGP (U/L)**

Où ΔDO c'est la valeur moyenne des trois lectures.

Fiche technique « Spinreatct » pour Dosage de l'activité de phosphatase alcaline (PAL).

Echantillon : Sérum

Réactifs utilisés

Réactif 1 : Tampon	Diethanolamine (DEA), pH 10.4 Chlorure de magnésium	mmole/l 0.5 mmole/l
Réactif 2 : Substrat	nitrophényl phosphate (PNPP)	10 mmole/l

Mode opératoire

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

Réactif de travail:

-Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

_Mélanger, incuber les tubes préparés pendant 30 secondes à la température utilisée pour l'essai et lire l'absorbance (A) à 405 nm, avec trios répétitions (chaque1min d'incubation).

Calcul de la concentration :

ΔDo x 1750= activité ALP (U/l)

Où ΔDO c'est la valeur moyenne des trois lectures.

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour dosage de l'urée.

Échantillon : Sérum

Les réactifs utilisés

Les Réactive	Composition	Concentration
Réactif (A)	-Phosphate -EDTA -Salicylate de Sodium -Nitroprussiate de Sodium	20 mmole/l 2 mmole/l 62 mmole/l 3,4 mmole/l
Réactif (B)	Uréase	> 500 U/L
Réactif (C) (Etalon)	Etalon urée	50mg/100ml
Réactif (D)	-Hypochlorite de Sodium -Hydroxyde de Sodium	7 mmole/l 150 mmole/l

Préparation des réactifs

-Dissoudre un caché de réactif (B) dans la fiole de réactif (A).

-Agiter bien la solution R (A) + R (B) qui 'est stable pendant 4 semaine à une température de 2-8°C ou une semaine à une température ambiante.

-Mélanger et incuber les tubes à essais pendant 5min à 37°C.

-Ajouter pour chaque tube préparé 1 ml de réactif (D).

-Lire l'absorbance (A) de l'étalon et des échantillons à 580 nm.

Mode opératoire

	Blanc	***Etalon***	***Echantillon***
R (A) + R (B)	1ml	1ml	1ml
Etalon	-----	10µl	----
Echantillon	-----	------	10µl

Calcul :

$$\text{Concentration de l'urée (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Échantillon}}{\text{(A) Étalon}} \times \text{concentrations de l'étalon (mg/dl).}$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain » pour dosage de la créatinine

Echantillon : Sérum

Réactives Utilisés

Les Réactifs	**Composition**	**Concentration**
Réactif (A)	Acide Picrique	25 mmole/l
Réactif (B)	Hydroxyde de Sodium	0,2 mmole/l
Réactif (C)	Créatinine aqueux (Etalon)	2 mg/dl

Préparation de réactif De Travail (RT)

-Mélanger des volumes égaux des réactifs (A) et (B)

-Agiter bien pendant 1 min, cette solution devient stable 2 mois à 2-8 °C.

Mode opératoire

	Blanc	**Etalon**	**Echantillon**
Etalon (µl)	----	100	----
Echantillon (µl)	------	-------	100
Réactif (RT) ml	1	1	1

-Préchauffer le réactif de travail et l'échantillon pendant quelques minutes à 37 C.

-Enregistrer l'absorbance (A) à 500 nm après 30 seconde (A1) et après 90 seconde (A2) de l'incubation.

Calcul :

$$\text{Concentration de créatinine (mg/dl)} = \frac{\text{(A2-A1) échantillon}}{\text{(A2-A1) Etalon}} \times 2\text{mg/dl (Concentration de l'étalon)}$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain» pour dosage de l'acide urique

Réactifs utilisés

Réactif 1 : Tampon	Tampon phosphate pH 7.4 2-4 Dichlorophenol sulfonate (DCPS)	50 mmol/l 4 mmol/l
Réactif 2 : Enzymes	Uricase Peroxydase (POD) Ascorbate oxydase 4-Aminophenazone	60 U/L 660U/L 200U/L 1 mmol/l
Etalon	Acide urique aqueous (standard)	6 mg/dl

Réactif de travail: dissoudre le contenu de réactif 2 dans le flacon de réactif 1 et mélanger légèrement.
Echantillon : Sérum
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 520 nm.
- La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Calcul de la concentration

$$\textit{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\textit{(A) Echantillon}}{\textit{(A) Etalon}} \textit{ X Concentration de l'étalon (6mg/dl)}$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain» pour dosage des lipides totaux

Réactifs utilisés

Réactif	Phosphovanailline	235 mmol/l.
Etalon	Lipides totaux	750 mg/dl
Réactif optionnel	L'acide sulfurique	80%

Réactif de travail: Le réactif est l'étalon sont prêts à l'emploi.
Echantillon : Sérum
Mode opératoire :

	Blancs	Etalon	Echantillon
H_2SO_4 (ml)	2.5	2.5	2.5
Etalon (µl)	---	100	----
Echantillon (µl)	----	----	100

1. Mélanger entièrement à l'acide d'un agitateur et incuber les tubes préparés pendant 10min dans un bain marie à 100°C.

2. Refroidir les tubes dans l'eau glacée.

Milieu réactionnel (µL)		50	50
Phosphovainilline (mL)	1	1	1

3. Mélanger entièrement à l'acide d'un agitateur et incuber pendant 15min à 37 °C.

4. Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 520nm contre le blanc.

La coloration est stable une heure.

Calcul de la concentration :

$$\textit{Lipides totaux (mg/dl)} = \frac{\textit{(A) Echantillon}}{\textit{(A) Etalon}} \textit{ X Concentration de l'étalon (750mg/dl)}$$

Fiche technique « SpinReact, Girona Spain» pour dosage du cholestérol.

Réactifs utilisés

Réactif 1 : Tampon	PIPES pH 6.9 Phénol	90 mmol/l 26 mmol/l
Réactif 2 : Enzymes	Cholestrol esterase (CHE) Cholesterol oxidase (CHOD) 4-Aminophenazone (4-AP)	300 U/L 300 U/L 0.4 mmol/l
Etalon	Cholesterol aqueous (standard)	200/dl

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

Echantillon : Sérum.

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 30 minutes.

Calcul de la concentration

$$\textit{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{\textit{(A) Echantillon}}{\textit{(A) Etalon}} \textit{ X Concentration de l'étalon (200 mg/dl)}$$

Fiche technique « Spinreact, Girona Spain» pour dosage des triglycérides

Réactifs utilisés

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

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire

	Blancs	**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 30 minutes.

Calcul de la concentration

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

2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

Préparation de Bleu de Coomassie

Dans une fiole jaugée de 1 litre, on dissout :

-Bleu de Coomassie G250 …….100mg

-Ethanol 95% …….50ml

Agitation pendant 2 heures puis, on ajoute :

-Acide orthophosphorique ……....100ml

-H2O distillée q.s.p ……1000ml

Réalisation de la gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (SAB) :

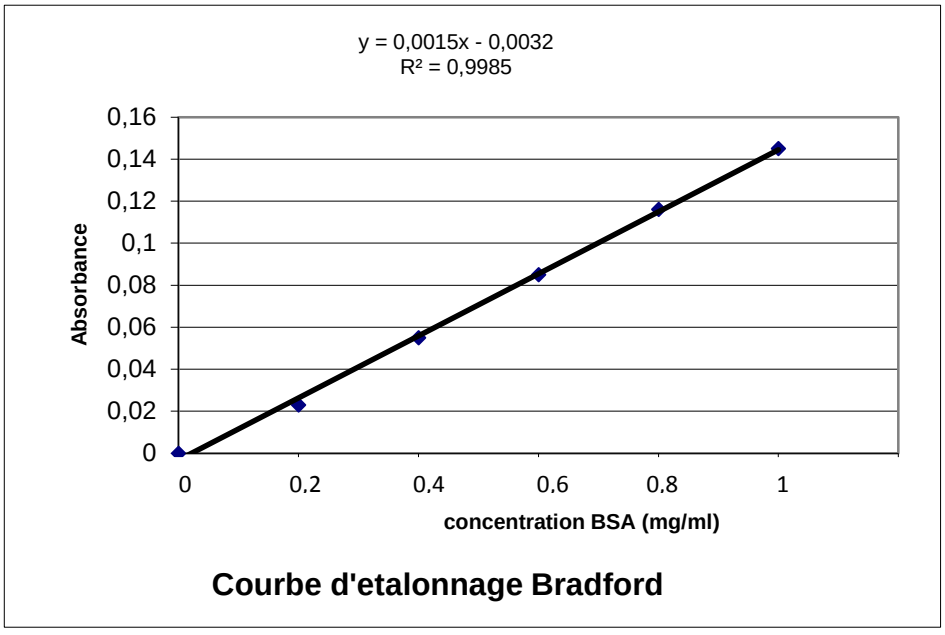
La gamme d'étalonnage indiquée dans le tableau, a été réalisée à partir d'une solution mère contenant 1mg/ml de sérum albumine bovine.

Tableau : Gamme d'étalonnage du sérum albumine bovine (S.A.B).

Tubes	1	2	3	4	5	6
SAB (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	5	5	5	5	5	5

Résultats obtenus

Concentration de SBA (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Absorbance	0	0,023	0,055	0,085	0,116	0,145



Publication

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

ISSN- 0975-1491 Vol 8, Issue 6, 2016

Original Article

EFFECT OF THE JOINT SUPPLEMENTATION OF VITAMIN C AND VITAMIN E ON NICKEL HEAMATOTOXICITY AND NEPHROTOXICITY IN MALE SWISS ALBINO MICE

FAOUZI DAHDOUH[1], SALAH ATTALAH[2], MOHAMED REDA DJABAR [1], ZINE KECHRID[3]

[1]Laboratory of Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria., [2]Laboratory of Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mentouri University, Constantine, Algeria, [3]Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria.
Email: kechridzine@yahoo.fr

Received: 28 Feb 2016 Revised and Accepted: 20 Apr 2016

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of vitamins C and E separately and in combination against nickel-induced alterations in haematological indices and kidney dysfunction.

Methods: Male Swiss albino mice were divided into eight equal groups: Control, vitamin C (Vit C), vitamin E (Vit E), vitamin C and vitamin E (Vit C+Vit E), nickel (Ni), nickel and vitamin C (Ni+Vit C), nickel and vitamin E (Ni+Vit E), and nickel plus vitamins C and E (Ni+Vit C+Vit E). Vitamin C (1g/l) was given to mice through their drinking water. Vitamin E (1g/kg) and nickel as nickel sulfate (2.7 mg/kg) were supplemented in diet for four weeks.

Results: Nickel caused a significant decrease in body weight, food and water consumption along with significant increase in the absolute and relative kidney weights. Haemoglobin, red blood cells count (RBC), hemoglobin (Hb) concentration, platelet counts (Plt) and packed cell volume (PCV) were significantly diminished, while white blood cells count (WBC) increased in nickel exposed mice. The renal damage induced by nickel was evidenced by a significant increase in the levels of serum urea, creatinine and uric acid. However, vitamins C and E in combination more significantly ameliorated the altered histopathological and biochemical changes in the kidney as well as hematological parameters of Ni intoxicated mice than either vitamin C or E.

Conclusion: The study showed that vitamin C and E combination effectively attenuated Ni-induced heamatotoxicity and nephrotoxiicty in mice.

Keywords: Nickel, Vitamins C, Vitamin E, Heamatotoxicity, Kidney injury, Histopathology

© 2016 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCTION

Nickel is a toxic metal that released into the environment by industrial activities, such as the production of batteries and paints, and also a by-product of metal alloys and medical implants. Thus nickel is an important material in industries, and hence, public health environmental problems become inevitable following exposure to nickel compounds via contaminated water and foodstuffs [1, 2]. Nickel cannot be metabolized and, therefore, accumulates in the body, where it can accumulate to high levels in certain organs, in particular, the liver and the kidney, leading to serious health effects [3]. The kidney is particularly predisposed to nickel-induced toxicity and carcinogenicity due to its involvement in nickel toxicokinetics and excretion through urine, as well as it serves as a major organ of Ni accumulation [4]. Several reports are available showing that nickel-induced nephrotoxicity is strongly related with histopathological and serum biochemistry alterations [5, 6].

Moreover, nickel is a known cytotoxic metal that induces kidney cell damages [7, 8]. Although the toxic mechanisms of nickel toxicity and carcinogenicity are still poorly understood. On the other hand, severe adverse heamtotoxic effects including disorders of the bone marrow, haematopoietic systems and the onset of anemia have been noticed in Ni exposed animals [9, 10]. The hematotoxic effect of nickel is basically due to over stimulation of metallothionein and subsequent inducing production of reactive oxygen species (ROS) that leads to oxidative damage in erythrocytes [11, 12]. Recently, the exogenous supplementation of antioxidant molecules such as vitamins C and E have received a wide attention due to their ability to quench reactive oxygen species (ROS) and thereby protecting cellular damage [13]. Vitamin E (dl-α-tocopherol) known as a lipid soluble antioxidant, improves antioxidant defense, prevents lipid peroxidation chain reactions and it can scavenge molecular oxygen, peroxide and hydroxyl radicals and atomic oxygen radicals [14],while vitamin C (ascorbic acid) is known as a potent antioxidant, belongs to the water soluble class of vitamins. Vitamin C has the ability to scavenge molecular oxygen and hydroxyl radicals and atomic oxygen radicals [15]. Numerous research workers have studied the beneficial effect of vitamin C or vitamin E against nickel toxicity following *in vivo* animal studies [16, 17] and *in vitro* studies [18] over the last few years. To our knowledge, this was the first study on the protective effect of vitamins C and E combination against nickel-induced nephrotoxicity and haematotoxicity in mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Sixty-four male Swiss albino mice weighing 29–33 g (Animal Unit of "Pasteur" Algiers Institute, Algeria) were used in this study. Animals were housed in plastic cages under a light-dark cycle 12/12 hour, a temperature 22±2 °C and humidity 40% with *ad-libitum* access to food and water. All experiments were carried out in accordance with ethical approval (AFRO. 123, 2009). Unless otherwise noted, all chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (St Louis, France).

Experimental design

Mice were randomly divided into eight groups of eight mice each and subjected to various daily treatment regimes:

Group I: (Control mice) animals fed a standard diet and given bidistilled drinking water.

GroupII (Vit C): Mice received a standard diet and vitamin C in bidistilled drinking water (1g/l).

Group III (Vit E): Animals received standard diet enriched with vitamin E (1g/kg of diet).

Group IV (Vit C+Vit E): Mice received vitamin E (1g/kg of diet) and vitamin C (1g/l of bidistilled drinking water).

Group V (Ni): Mice received standard diet supplemented with nickel sulfate (2,7g $NiSO_4$/kg diet).

Group VI (Ni+Vit C): Mice received standard diet supplemented with nickel sulfate (2,7g $NiSO_4$/kg) and vitamin C in their drinking water (1g/l).

Group VII (Ni+Vit E): Animals received standard diet supplemented with nickel sulfate and vitamin E (1g Vit E+2,7g $NiSO_4$/kg diet).

Group VIII (Ni+Vit C+Vit E): Mice received regimen the same as Group VII (1g Vit E+2,7g $NiSO_4$/kg diet), except that their drinking water contained vitamin C (1g/l).

Vitamin C, vitamin E and nickel sulfate doses were chosen depending on previously established protocols [19], [20] and [21] respectively.Throughout the study, body weight, food intake and water consumption were monitored every three days. After thirty days, animals were killed for blood collection and kidney was removed immediately, fixed in bouin's solution and used for histological examination.

Biochemical analysis

Serum biochemical markers: uric acid, creatinine and urea measured as a functional marker for nephrotoxicity. They were assessed using commercial diagnostic kits (Spinreact, Spain, ref: Creatinine-1001111, urea-1001329 and uric acid-1001011). Hematological parameters: red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count, hemoglobin (Hb) concentration, packed cell volume (PCV), and platelet count (Plt) were estimated utilizing fully automated hematological cell counter (Coulter Couter Lympho, serial « T » 540).

Histological evaluation

Slices of the kidney from each experimental group were dissected and immediately fixed in neutral buffered formalin for 24 h, processed by using a graded ethanol series, and then embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5 µm thick slices and stained with haematoxylin and eosin for light microscopic examination.

Statistical analysis

Results were displayed as mean±standard error of the mean (S. E. M), and were subjected to statistical significance evaluation. Comparisons of multiple groups of each parameter separately were tested by one-way analysis of variance with Turkey post hoc test. The level of significance was set at $p<0.05$.

RESULTS

Effect of treatment on body weight, absolute and relative kidney weights

In table 1, the body weight of animals exposed to nickel was significantly decreased ($p<0.01$) as compared to control mice. Treatment with vitamin C and/or E along with nickel showed an improvement in body weight gain ($p<0.01$, $p<0.001$) compared to nickel group.

The absolute and relative kidney weights were significantly increased ($p<0.01$, $p<0.001$) in nickel treated animals and conversely a significant decrease was noticed ($p<0.05$, $p<0.01$) in the combined treatments, with more efficacity in vitamins C and E than either vitamin C or E along with nickel in comparison with nickel exposed mice.

Effect of treatments on Food and Water Intake

As seen in table 1, there was a significant decrease in water ($p<0.001$) and food intake ($p<0.01$) in nickel treated mice as compared to control group. Groups: Ni+Vit C, Ni+Vit E and Ni+Vit C+Vit E also showed a significant decrease ($p<0.05$) of these parameters when compared with control group, but when compared with nickel group, a significant increase of food and water consumption was observed; Ni+Vit C, Ni+Vit E ($p<0.05$) and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$). Hence, the studied parameters were more improved in Ni+Vit C+Vit E treated the group as compared with either of Ni+Vit C or Ni+Vit E treatments.

Table 1: Effect of nickel and its combination with vitamin C and/or vitamin E on body weight, kidney weights (absolute and relative), food and water intake

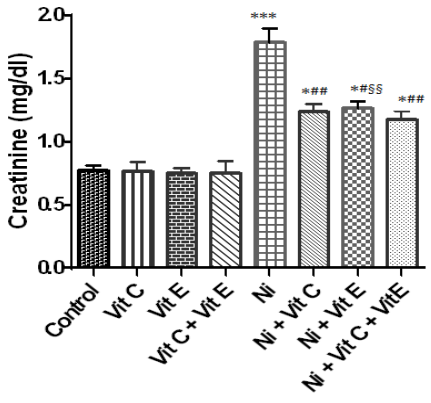
Groups	Body weight (g)		Kidney weights		Food intake	Water intake
	Initial	Final	Absolute (g)	Relative g/100g bwt	g/100g bwt	(ml/day)
Control	30±0.6	41±1.11	1.2±0.05	0.33±0.03	6.62±0.34	7.81±0.37
Vit C	31±0.71	38±0.22	1.19±0.02	0.34±0.01	6.09±0.26	7.06±0.24
Vit E	33±1.1	40±0.17	1.2±0.03	0.32±0.02	5.86±0.21	7.18±0.11
Vit C+Vit E	29±1.03	40±0.23	1.18±0.02	0.33±0.02	6.12±0.30	7.43±0.08
Ni	29±1.05	18±0.13**	1.85±0.07**	1.17±0.02***	3.52±0.15**	4.46±0.17***
Ni+Vit C	32±0.9	26±1.21$^{*\#\#\S}$	1.4±0.02$^{**\#\S}$	0.7±0.04$^{*\#\S}$	4.7±1.2$^{*\#\S\S}$	6.75±0.5$^{*\#\S}$
Ni+Vit E	33±1.07	28±0.73$^{*\#\#}$	1.38±0.03$^{**\#\S}$	0.68±0.06$^{*\#\S}$	4.9±1.08$^{*\#\S\S}$	6.83±0.3$^{*\#\S}$
Ni+Vit C+Vit E	31±0.66	30±0.45$^{*\#\#\#}$	1.3±0.02$^{*\#\#}$	0.56±0.04$^{*\#\#}$	5.15±0.6$^{*\#\#}$	6.92±0.38$^{*\#\#}$

Values are given as mean±SEM of eight mice each group. Statisticaly Significantly differences from control: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; from Ni: $^{\#}$ p<0.05,, $^{\#\#}$p<0.01, $^{\#\#\#}$p<0.001; from Ni+Vit C+Vit E: §p<0.05, §§ p<0.01.

Effect of treatment on renal function

Kidney dysfunction was noted by a significant increase in serum urea ($p<0.001$), creatinine ($p<0.001$) and uric acid ($p<0.01$) levels of nickel exposed mice as compared to the control mice. Similarly, these functional kidney markers were significantly increased ($p<0.05$) in Ni+Vit C, Ni+Vit E and Ni+Vit C+Vit E when compared with the control group.

But when compared with nickel group, a significant decrease of the above mentionned parameters was noticed [serum urea: Ni+Vit C, Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$) and Ni+Vit E ($p<0.05$); serum uric acid: Ni+Vit C ($p<0.05$), Ni+Vit E and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$); serum creatinine: Ni+Vit C, Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$) and Ni+Vit E ($p<0.05$)]. In addition, vitamin C and vitamin E concomitent treatment with nickel effectively reduced more the above biochemical parameters when compared to nickel along with either vitamin C or vitamin E (fig. 1).



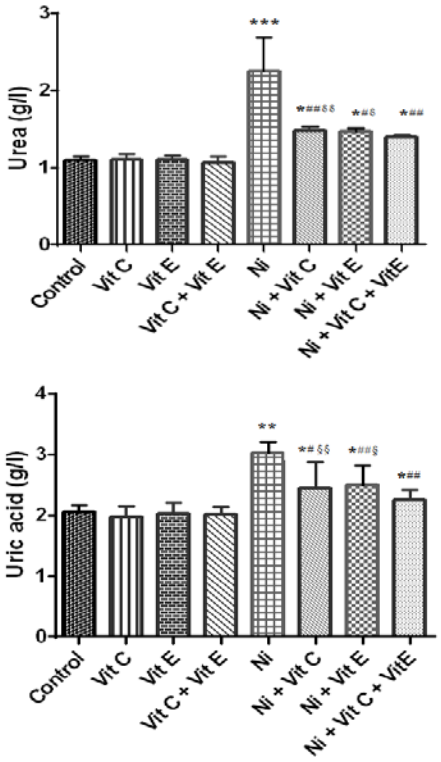


Fig. 1: Serum kidney biochemical markers; creatinine, urea and uric acid in control and experimental animals

Values are given as mean±SEM of eight mice each group. Significantly differences from control: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$; from Ni: $^{\#}p<0.05$,$^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$; from Ni+Vit C+Vit E: $^{\S}p<0.05$, $^{\S\S}p<0.01$.

Effect of treatments on hematological parameters

As showed in table 2, nickel treatment resulted significant decrease of red blood cells (RBCs), platelet counts, packed cell volume (PCV %) ($p<0.001$) and hemoglobin (Hb) concentration ($p<0.01$) concomitant with significant increase of white blood cell (WBC) count ($p<0.01$) in nickel group when compared to control group. Also, Ni+Vit C, Ni+Vit E and Ni+Vit C+Vit E treatments showed a significant increase ($p<0.05$) of those parameters in comparison with control group, but when compared with nickel group, a significant increase of red blood cells: Ni+Vit C, Ni+Vit E ($p<0.05$) and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$); packed cell volume: Ni+Vit E ($p<0.05$) and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$); heamoglobin: Ni+Vit C and Ni+Vit E ($p<0.05$) and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.01$); blood platelet: Ni+Vit C, Ni+Vit E and Ni+Vit C+Vit E ($p<0.05$) and a decrease of white blood cells: Ni+Vit C, Ni+Vit C+Vit E ($p<0.05$) and Ni+Vit E ($p<0.01$).

Whereas, treatments with both vitamins C and E exhibited a good protection than either vitamin C or E separately against nickel haematotoxicity. No significant changes were noticed in the studied parameters in either vitamin E or vitamin C treated animals when compared with untreated animals.

Histological results

The average score obtained for each animal and then for each group were considered as final damage tissue score (fig. 2). Normal histology of the glomeruli and tubules in cortex and medulla was observed in the kidney of control mice (fig. 2A). The histoarchitictural patterns of kidney were almost normal in mice treated with Vit C and Vit E alone or in combination (fig. 2B-2D).

Histopathological studies showed that nickel-induced proximal tubule degeneration and tubular necrosis (double arrows), multiple foci of hemorrhage and inflammation with the presence of lymphocytes in interstitial tissue (single arrow) (fig. 3E). Indeed, pathological lesions induced by Ni were remarkably reduced by the administration of vitamin C or vitamin E, but both vitamins along with Ni proved to be more efficient in reducing nickel-induced severe tissue alterations (fig. 3F-3H).

Table 2: Effect of nickel and its combination with vitamin C and/or vitamin E on Red blood cells (RBC), white blood corpuscle (WBC) and blood platelet (Plt) counts, heamoglobin concentration (Hb) and packed cell volume (PCV)

Groups	Red blood cells (10^6cell/µl)	Packed cell volume (%)	Heamoglobin (mg/dl)	White blood cells (10^3cell/µl)	Platelet counts (10^3 cell/µl)
Control	7.28±0.4	44.12±0.9	13.37±0.6	6.06±0,22	721.6±42.7
Vit C	6.97±0.36	43.27±1.63	12.84±0.5	6.11±0.17	709±31.7
Vit E	7.03±0.43	42.61±1.7	12.79±0.44	6.04±0.1	713±31.4
Vit C+Vit E	7.06±0.12	43.23±2.01	12.9±0.26	6.01±0.08	711±32.3
Ni	5.46±0.65***	32.7±0.13***	10.1±0.08**	8.05±0.40***	426±44.6***
Ni+Vit C	6.71±0.48$^{*\#\S}$	37.02±4.5*§	11.3±0.57$^{*\#\S}$	6.98±0.28$^{*\#}$	676.08±33$^{*\#\#\S}$
Ni+Vit E	6.63±0.5$^{*\#\S\S}$	36.7±3.44$^{*\#\S}$	11.1±0.37$^{*\#\S}$	6.84±0.34$^{*\#\#\S}$	662±36.2$^{*\#\#\S}$
Ni+Vit C+Vit E	6.79±0.43$^{*\#\#}$	38.9±3.25$^{*\#\#}$	11.85±0.59$^{*\#\#}$	6.39±0.22$^{*\#\#}$	697±35.2$^{*\#\#}$

Values are given as mean±SEM of eight mice each group. Statisticaly Significantly differences from control: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$; from Ni: $^{\#}p<0.05$,, $^{\#\#}p<0.01$, $^{\#\#\#}p<0.001$; from Ni+Vit C+Vit E: $^{\S}p<0.05$, $^{\S\S}p<0.01$.

A kidney from nickel treatment (E) showed severe proximal tubule degeneration and tubular necrosis (up than 75%) (double arrows), multiple foci of hemorrhage and inflammation with the presence of lymphocytes in interstitial tissue (single arrow).

In the combined treatments (F, H and G sections), slight lesion of the tubules with only mild tubular necrosis and interstitial inflammation were observed, when compared with untreated mice and those receiving only Ni. The severity of tissue alterations ranged from 60%, 40% and 30% in Ni+Vit C (F), Ni+Vit E (G) and Ni+Vit C+Vit E (H) respectively.

DISCUSSION

The uncontrolled release of hazardous substances, including heavy metals, may have serious effects on kidney function [22] and hematopoietic system [23]. Early reports suggest vitamins C and E as potent antioxidants, that are able to reduce oxidant threat mediated renal damage induced by heavy metals, such as cadmium [24] and mercury [25]. Therefore, this study was devoted to determining the beneficial effects of both vitamins on nickel-induced kidney injury and heamatotoxicity in mice. The decrease in final body weight, food and water intake along with significant increase in kidney weight was seen in nickel-exposed group.

These findings are concomitant with previously reports [26]. The decreased body weight is possibly due to the overall increased degeneration of lipids and proteins and the significant increase in both absolute and relative kidney weights may explain the selective accumulation of nickel in the kidney [27]. All these physiological changes observed in nickel treated mice were attenuated by

treatment with vitamin C and E separately or in combination. In this context, the present study confirmed that both vitamins have ameliorative effect against nickel-alteration in body weight of mice. Chatterjee *et al.* [28] suggested that enhancement of body weight would result in a concomitant increase in the daily food consumption and promotion of protein synthesis. Similar data were also reported in vitamin E co-administration with silver [29] and nickel nanoparticles [30].

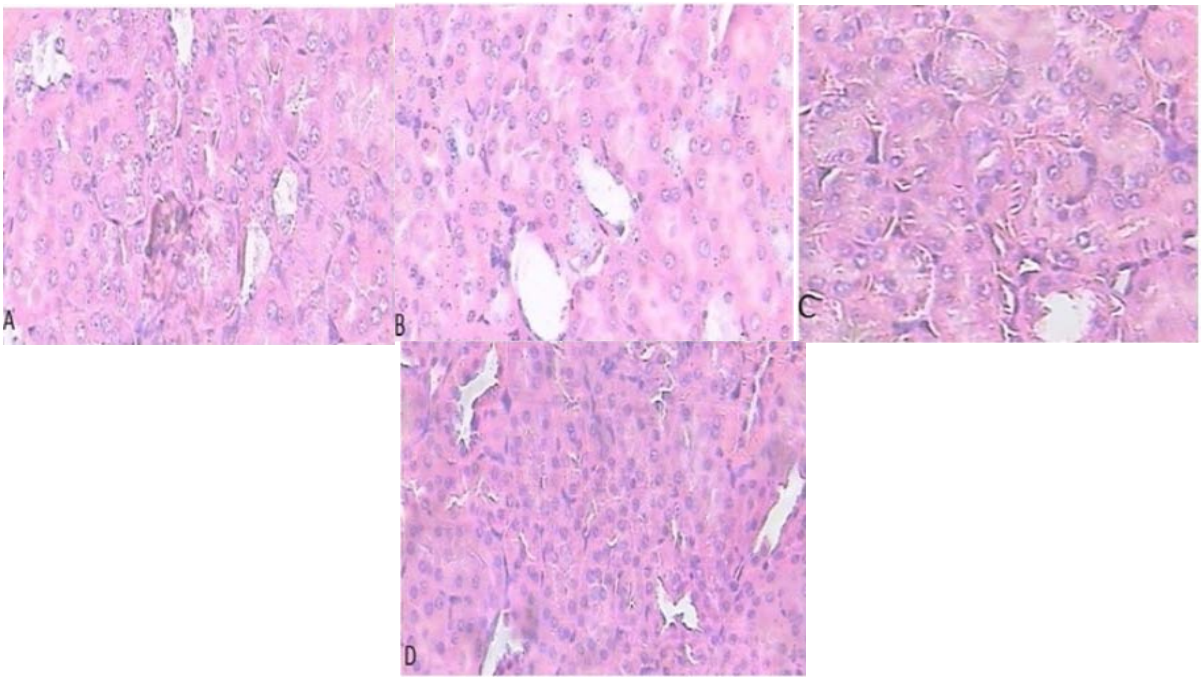


Fig. 2: Light photomicrograph of kidney sectional histology from control mice and vitamin C and/or E treated mice (H&E. X 40): Control group (A), Vitamin C (C), Vitamin E (D) and Vitamins C and E (E) treated groups, showing no histological changes were observed in the kidney of vitamin C and/or vitamin E treated animals (B-D) when compared with control kidney (A)

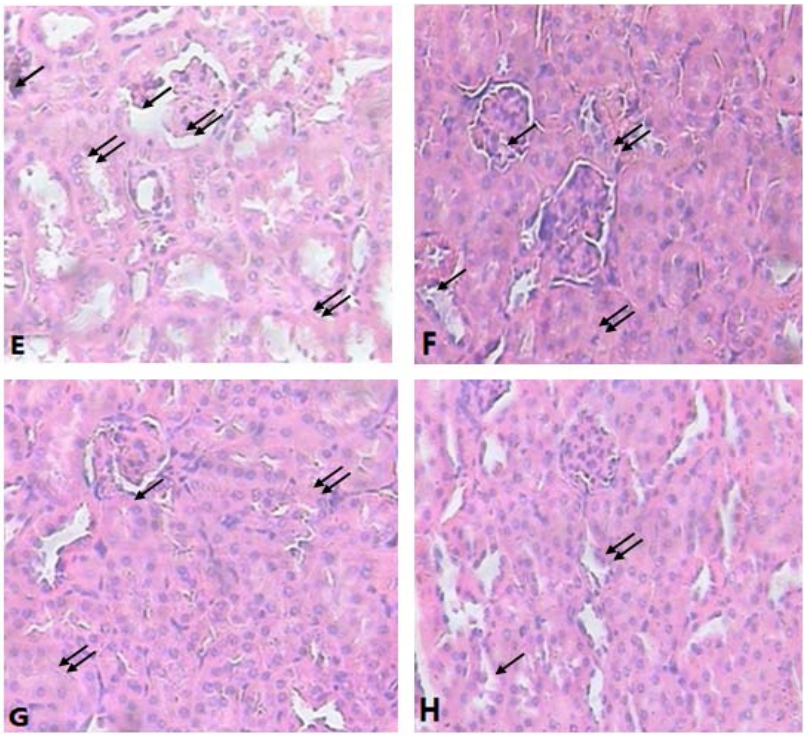


Fig. 3: Light photomicrograph of sectional kidney histology from mice treated with Ni only and those treated with vitamin C/E in combination with Ni (H&E. X 40)

In this study, we noticed renal impairment in association with an increase in serum urea, uric acid and creatinine, as well as renal histopathological changes in Ni-treated mice. The increased level or uric acid could be linked to increased degradation of purines and pyrimidines, over production or inability of its excretion [31]. The supplementation of vitamin E and/or vitamin C along with nickel

improved the altered biochemical markers and kidney histology induced by nickel, which somehow may result in the antiradical/antioxidant activity. Accordingly, these findings are in line with those obtained by Appenroth *et al.* [32], who found that vitamin E and C combination attenuated the cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. The protective effects of these antioxidants are owed to their ability to reduce oxidative stress in the kidney the following exposure to several metals [33]. The hematological indices also showed that treatment with nickel-induced significant decrease in red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb) concentration, percentage packed cell volume percentage (PCV%) and platelets count.

Thus, the results indicated that exposure to nickel could lead to anemia. In addition, it was suggested that nickel may adversely affect the hematopoietic process and bone marrow activity resulting in a reduction of RBC and Hb, which is likely due to iron deficiency or chemically induced anemia [34]. Nickel is also found to induce oxidative injury in erythrocytes following generation of reactive oxygen species (ROS)[35]. Also, the low hemoglobin concentration in this study may be as a result of a decrease in the succinyl and glycine pools, as well as the key enzymes such as, ALAD (Aminolevulinic Acid Dehydratase) that are required in the hem biosynthesis [36]. In contrast, white blood cell (BWC) count appeared a significant increase in nickel-exposed animals. This result is in line with earlier reports on rats with potential exposure to arsenic [37] and to cadmium [38], where the plausible explanation of the elevation in white blood cells is due to their contribution to the inflammatory response to toxic metals. Vitamin C and E alone or in combination improved the studied hematological parameters approximately to their normal values. These vitamins are likely involved in activating blood cell productions and hemoglobin synthesis by stimulating bone marrow, as well as they, act as antioxidants to reduce oxidative injury in erythrocytes.

CONCLUSION

The present study indicated that vitamins C and vitamin E combination proved to be more efficiently than either vitamin C or vitamin E to alleviate nickel-induced nephrotoxicity and heamto-toxicity. Furthermore, it provides biological evidence supporting the beneficial interaction (synergistic) between the antioxidant vitamins in protecting nickel toxicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors greatly knowledge the Ministry of Higher Education and Scientific Research for supporting this research (project reference number: N ° FOI 120070054).

CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

REFERENCES

1. De Brouwere K, Buekers J, Cornelis C, Schlekat CE, Oller AR. Assessment of indirect human exposure to environmental sources of nickel: oral exposure and risk characterization for systemic effects. Sci Total Environ 2011;419:25-36.
2. Leblanc JC, Guérin T, Noël L, Calamassi-Tran G, Volatier JL, Verger P. Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st french total diet study. Food Addit Contam 2005;22:624-41.
3. Cempel M, Janicka K. Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. Biol Trace Elem Res 2002;90:215-26.
4. Bardack S, Dalgard CL, Kalinich JF, Kasper CE. Genotoxic changes to rodent cells exposed *in vitro* to tungsten, nickel, cobalt and iron. Int J Environ Res Public Health 2014;11:2922-40
5. Boulila S, Elfeki A, Oudadesse H, Elfeki H. Substitution effects of a carbonated hydroxyapatite biomaterial against intoxication chloride nickel-exposed rats. Toxicol Mech Methods 2015;25:155-65.
6. Jadhav SH, Sarkar SN, Patil RD, Tripathi HC. Effects of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: a biochemical and histopathological study in male rats. Arch Environ Contam Toxicol 2007;53:667-77.
7. Permenter MG, Lewis JA, Jackson DA. Exposure to nickel, chromium, or cadmium causes distinct changes in the gene expression patterns of a rat liver derived cell line. PLoS One 2011;6:e27730. Doi:10.1371/journal.pone.0027730. [Article in Press]
8. Huang X, Zhuang Z, Frenkel K, Klein CB, Costa M. The role of nickel and nickel-mediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. Environ Health Perspect 1994;102 Suppl 3:281-4.
9. Tikare SN, Yendigeri S, Gupta AD, Dhundasi SA, Das KK. Effect of garlic (Allium sativum) on hematology and erythrocyte antioxidant defense system of albino rats exposed to heavy metals (nickel II & chromium VI). Indian J Physiol Pharmacol 2012;56:137-46.
10. Adjroud O. The toxic effects of nickel chloride on liver, erythropoiesis, and development in Wistar albino preimplanted rats can be reversed with selenium pretreatment. Environ Toxicol 2013;28:290-8.
11. Tkeshelashvili LK, Tsakadze KJ, Khulusauri OV. Effect of some nickel compounds on red blood cell characteristics. Biol Trace Elem Res 1989;21:337-42.
12. Das KK, Saha S. L-ascorbic acid and α tocopherol supplementation and antioxidant status in nickel or lead-exposed rat brain tissue. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2010;21:325-46.
13. Emilie P, Maurice H, Gilles C, Joel P, Jacques M, Dalila C. Oxidative stress and dystrophy facioscapulohumeral: effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate and selenomethionine supplementation. Free Radical Biol Med 2014;75 Suppl 1:S14.
14. Pascoe GA, Fariss MW, Olafsdottir K, Reed DJ. A role of vitamin E in protection against cell injury. Maintenance of intracellular glutathione precursors and biosynthesis. Eur J Biochem 1987;166:241-7.
15. Cathcart RF. 3rd. Vitamin C: the nontoxic, non-rate-limited, antioxidant free radical scavenger. Med Hypotheses 1985;18:61-77.
16. Das KK, Buchner V. Effect of nickel exposure on peripheral tissues: role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. Rev Environ Health 2007;22:157-73.
17. Hattiwale SH, Saha S, Yendigeri SM, Jargar JG, Dhundasi SA, Das KK. Protective effect of L-ascorbic acid on nickel-induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. Biometals 2013;26:329-36.
18. Kasprzak KS, Diwan BA, Kaczmarek MZ, Logsdon DL, Fivash MJ, Salnikow K. Effects of ascorbic acid on carcinogenicity and acute toxicity of nickel subsulfide, and on tumor transplants growth in gluconolactone oxidase knock-out mice and wild-type C57BL mice. Toxicol Appl Pharmacol 2011;257:32-7.
19. Yildirim O, Büyükbingöl Z. *In vivo* effect of vitamin C with cobalt on oxidative stress in experimental diabetic rat kidney. Diabetes Nutr Metab 2003;16:208-13.
20. Alberts DS, Peng YM, Moon TE. Alpha-Tocopherol pretreatment increases adriamycin bone marrow toxicity. Biomedicine 1978;29:189-91.
21. Schiffer RB, Sunderman FW Jr, Baggs RB, Moynihan JA. The effects of exposure to dietary nickel and zinc upon humoral and cellular immunity in SJL mice. J Neuroimmunol 1991;34:229-39.
22. Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. Nephron Physiol 2005;99:105-10.
23. Brucka-Jastrzębska E, Protasowicki M. Effects of cadmium and nickel exposure on haematological parameters of common carp, Cyprinus carpio L. Acta Ichthyol Piscatoria 2005;35:29–38.
24. Karabulut-Bulan O, Bolkent S, Yanardag R, Bilgin-Sokmen B. The role of vitamin C, vitamin E, and selenium on the cadmium-induced renal toxicity of rats. Drug Chem Toxicol 2008;31:413-26.
25. Muthu K, Krishnamoorthy P. Effect of Vitamin C and Vitamin E on mercuric chloride-induced reproductive toxicity in male rats. Biochem Pharmacol 2012;1:102.
26. Milton Prabu S, Shagirtha K, Renugadevi J. Quercetin in combination with vitamins (C and E) improves oxidative stress and renal injury in intoxicated cadmium rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010;14:903-14.

27. Obone E, Chakrabarti SK, Bai C, Malick MA, Lamontagne L, Subramanian KS. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in Sprague-Dawley rats following 13 w of subchronic exposure. J Toxicol Environ Health A 1999;57:379-401.
28. Chatterjee K, Chakarborty D, Majumdar K, Bhattacharyya A, Chatterjee GC. Biochemical studies on nickel toxicity in weanling rats--influence of vitamin C supplementation. Int J Vitam Nutr Res 1979;49:264-75.
29. Yin N, Yao X, Zhou Q, Faiola F, Jiang G. Vitamin E attenuates silver nanoparticle-induced effects on body weight and neurotoxicity in rats. Biochem Biophys Res Commun 2015;458:405-10.
30. Kong L, Tang M, Zhang T, Wang D, Hu K, Lu W, *et al*. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. Int J Mol Sci 2014;15:21253-69.
31. Amudha K, Pari L. Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel-induced nephrotoxicity in rats. Chem Biol Interact 2011;193:57-64.
32. Appenroth D, Fröb S, Kersten L, Splinter FK, Winnefeld K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. Arch Toxicol 1997;71:677-83.
33. Atef M, Al-Attar. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. Saudi J Biol Sci 2011;18:63-72.
34. Hosokawa S1, Nishitani H, Umemura K, Tomoyoshi T, Sawanishi K, Yoshida O. Relationship between serum nickel concentrations and anaemia in chronic haemodialysis patients. Int Urol Nephrol 1987;19:447-51.
35. Novelli EL, Rodrigues NL, Nagahashi AM, Sforcin JM, Ribas BO. Nickel chloride effects on erythrocyte generation of superoxide radical. Braz J Med Biol Res 1990;23:643-5.
36. Das Gupta A, Das SN, Dhundasi SA, Das KK. Effect of garlic (Allium sativum) on heavy metal (nickel II and chromium VI) induced alteration of serum lipid profile in male albino rats. Int J Environ Res Public Health 2008;5:147-51.
37. Klibet F, Boumendjel A, Khiari M, El Feki A, Abdennour C, Messarah M. Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: alleviation by pistacia lentiscus oil. Pharm Biol 2016;54:354-63.
38. Karmakar R, Bhattacharya R, Chatterjee M. Biochemical, a haematological and histopathological study in relation to time-related cadmium-induced hepatotoxicity in mice. Biometals 2000;13:231-9.