

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT  
En Sciences  
Option : Biochimie appliquée

### THEME

**Etude de l'effet de Mentha et Pistacia sur la toxicité du Nickel.**

Présentée par: M. KHIARI Mohamed

Directeur de thèse : M. KECHRID Zine

Professeur, Université Badji Mokhtar-Annaba

#### Membres de Jury:

Président : M. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université Badji Mokhtar  
Annaba

Examineurs : M. LALAOUI Korichi

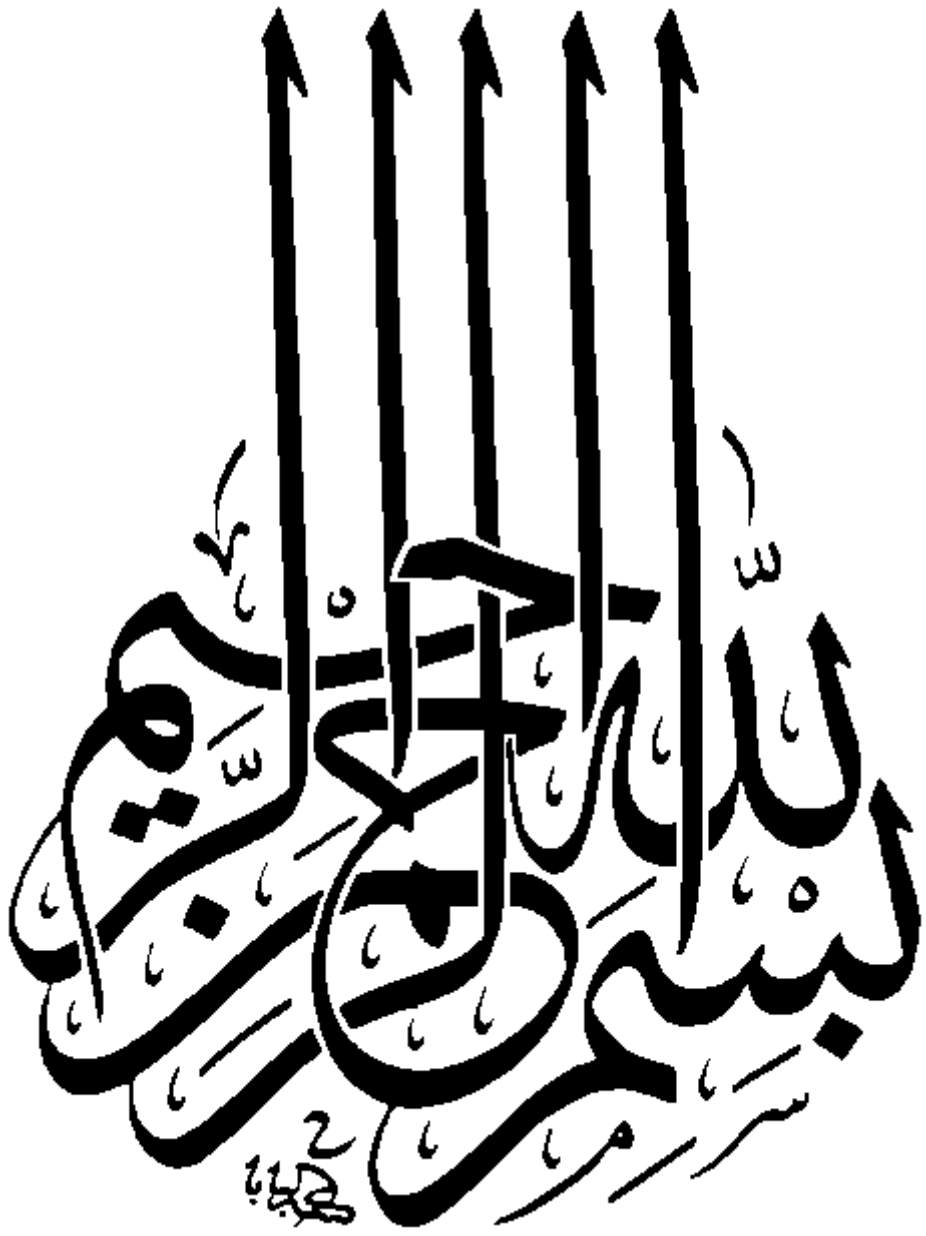
Professeur, Université Mentouri  
Constantine

M. DJABRI Belgacem

Professeur, Université Larbi Tébessi  
Tébessa

N° DBCH...../2018

Année universitaire : 2017/2018



## **Remerciements**

*Je me dois de remercier Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de ce travail «**EL HAMDOLLILAH**».*

*Je tiens avant tout à exprimer ma très grande gratitude à Monsieur le Professeur **KECHRID Z.**, directeur de cette thèse, non seulement pour m'avoir proposé le sujet et accepté d'encadrer ce travail, mais surtout pour m'avoir insufflé le désir et la passion de la recherche, qu'il trouve dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements.*

*Je suis également très reconnaissant à mon co-encadrant Monsieur le Professeur **KRISHNAIAH D.**, qui a su m'apporter son aide et de m'avoir donné la possibilité de réaliser cette thèse au sein de l'Université Malaysia Sabah, Malaisie; qu'en a même financé la partie majeure des expériences.*

*Je voudrais aussi remercier Monsieur le Professeur **ELFEKI A.**, Professeur à l'Université de Sfax, Tunisie; pour m'avoir accueillie pour mon stage de courte durée dans son équipe, permis de développer ce sujet à l'interface entre les compétences chimiques et biologiques.*

*J'adresse mes vifs remerciements à tous les membres de mon jury. Merci à Monsieur le Professeur **MESAREH M.**, d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur **DJABRI B.** et Monsieur le Professeur **LALAOUI K.** pour avoir bien voulu juger ce manuscrit. Je vous suis très reconnaissant du temps que vous y avez consacré.*

*Je souhaite également remercier Monsieur le Professeur **LAOUAR A.**, directeur du laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles à l'Université de Sétif, pour m'avoir aidé à identifier les deux espèces végétales étudiées.*

*Merci au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (**MESRS**) de m'avoir accordé une bourse de thèse.*

*Enfin, je voudrais remercier ma famille, plus particulièrement ma femme pour leur soutien moral et bien plus encore. Un grand merci aussi à mes fils pour la joie qu'ils nous procurent.*

# RÉSUMÉS



## Résumé

Les nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO NPs) ont attiré une attention croissante en raison de leur capacité potentielle à pénétrer dans plusieurs systèmes cellulaires humains en suscitant un effet toxique. D'autre part, l'utilisation des plantes médicinales comme source intéressante de composés chimiques naturelles est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Cette étude vise à évaluer l'activité antioxydante et cytoprotectrice d'huiles essentielles de *Mentha spicata* (HEMS) et *Pistacia lentiscus* (HEPL) vis-à-vis de la cytotoxicité et le stress oxydatif induits par les NiO NPs dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549).

Les résultats obtenus, dans la première partie de cette étude, montrent que le rendement d'extraction était de l'ordre de  $0.42 \pm 0.02\%$  et  $2.16 \pm 0.07\%$ , dont les deux composés majeurs étant Carvone (71.02 %), Limonène (17.43 %) et Terpinen-4-ol (11.49%), Germacrène D (8.64%); HEMS et HEPL respectivement. L'évaluation de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles nous amène à déduire que les deux extraits présentent des propriétés antioxydantes à piéger les radicaux DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•</sup> et à réduire le fer. En ce qui concerne la caractérisation morphologique et le comportement en solution de NiO NPs, l'analyse des clichés de MET révèle des NPs multiformes avec une taille moyenne de 25 nm. En outre, la DH et le potentiel Zêta de NiO NPs étant  $293,86 \pm 9.51$  /  $288,1 \pm 7.04$  nm et -14/-18 mV; dans de l'eau déminéralisée et le milieu de culture (DMEM), respectivement.

Nos résultats indiquent, dans la deuxième partie, que les nanoparticules de NiO ont réduit la viabilité cellulaire ( $CL_{50} = 79.83$  µg/ml) et provoqué également une rupture de l'équilibre RedOx. Par contre, la pré-incubation des cellules A549 en présence d'huiles essentielles des deux plantes a amélioré la viabilité cellulaire et l'activité du système antioxydant endogène, ce qui, par conséquent a diminué la production d'ERO.

En conclusion, la présente étude a révélé pour la première fois, l'activité protectrice de HEMS et HEPL face aux dommages oxydatifs cellulaires induits par le NiO NPs. Donc, Il est suggéré que ces huiles essentielles pourraient être utilisées comme un protecteur de cellules.

**Mots clés:** Nanoparticules de Nickel oxide; *Mentha spicata*; *Pistacia lentiscus*; huiles essentielles; antioxydant; cytotoxicité, cellules A549.

## المخلص

تجذب جسيمات أوكسيد النيكل النانوية اهتماما متزايدا نظرا لقدرتها على اختراق العديد من الأنظمة الخلوية لجسم الإنسان وبالتالي التسبب لها في تأثيرات سامة. من جانب آخر، يعد استخدام النباتات الطبية، كمصدر هام للمواد الكيميائية الطبيعية، الظاهرة الأكثر انتشارا للطب في جميع أنحاء العالم.

لذلك أجريت هذه الدراسة للكشف عن التأثير المضاد للأكسدة وكذا الواقي للخلايا للزيوت الأساسية للنعناع و الضرو في مواجهة جسيمات أوكسيد النيكل النانوية المتسببة في الإجهاد التأكسدي والتسمم الخلوي للخلايا الظهارية الرئوية للإنسان (A549).

أظهرت النتائج المتحصل عليها، في الجزء الأول من الدراسة الحالية، أن مردودية استخلاص الزيوت الأساسية قدرت بـ  $0,42 \pm 0,02$  % و  $2,16 \pm 0,07$  %؛ حيث كان المكونان الرئيسيان Carvone (71,02%)، Limonene (17,43%) و Terpinen-4-ol (11,49%)، Germacrene D (8,64%) لكل من النعناع و الضرو على التوالي. أبانت الزيوت الأساسية المستعملة من جهة أخرى عن نشاط مضاد للأكسدة وذلك بمحاصرة الجذور الحرة DPPH•، ABTS+•، O<sub>2</sub>•- وكذا إرجاع الحديد. بالإضافة إلى ذلك، بينت صور المجهر الإلكتروني عن وجود أشكال مختلفة من جسيمات أوكسيد النيكل النانوية مع متوسط حجم 25 nm. من جانب آخر، كان حجم DH و قيمة الجهد Zeta لجسيمات أوكسيد النيكل النانوية  $293,86 \pm 9,51$  nm /  $288,1 \pm 7,04$  nm و  $-18/-14$  mV؛ في الماء المنزوع الأيونات والوسط الخلوي على التوالي.

أشارت نتائج الجزء الثاني من هذه الدراسة، أن جسيمات أوكسيد النيكل النانوية خفضت من قدرة الخلايا على البقاء حية (  $CL_{50} = 79.83 \mu g/ml$  ) وأحدثت خلا على مستوى توازن الأكسدة/الاختزال للجرعة المعتمدة والتي عملت على الحث في تكون الجذور الحرة للأوكسجين وانخفاض في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة. على العكس من ذلك، حضن الخلايا في تواجد الزيوت الأساسية لكلى النبلتين حسن من قابلية الخلايا على البقاء حية وكذا من نشاط الجهاز المضاد للأكسدة الداخلي مما أدى إلى تراجع إنتاج الجذور الحرة للأوكسجين .

خلاصة، إن الدراسة الحالية كشفت لأول مرة على النشاط الواقي للخلايا ل كل من زيت النعناع الضرو ضد الإجهاد التأكسدي الخلوي المحفز والنتائج من قبل جسيمات أوكسيد النيكل النانوية. لذلك تقترح هذه الدراسة إمكانية استعمال هذه الزيوت كواقي للخلايا.

**الكلمات المفتاحية :** جسيمات أكسيد النيكل النانوية؛ النعناع ؛ الضرو ؛ الزيوت الأساسية؛ مضاد للأكسدة؛ التسمم الخلوي؛ الخلايا A549.

## Abstract

Nickel oxide nanoparticles (NiO NPs) have attracted increasing attention owing to its potential capacity to penetrate to several human cell systems and exert a toxic effect. On the other hand, the use of medicinal plants as interesting source of natural chemical substances is today the form of the most widespread medicine worldwide. Thus this study was carried out to investigate the antioxidant and cytoprotective effects of essential oil of *M. spicata* (MSEO) and *P. lentiscus* (PLEO) on NiO NPs induced cytotoxicity and oxidative stress in human lung epithelial cells (A549).

The obtained results, in the first part of the present work, showed that the yield of extraction was  $0.42 \pm 0.02\%$  and  $2.16 \pm 0.07\%$ , where the two major's components were Carvone (71.02 %), Limonene (17.43 %) and Terpinen-4-ol (11.49%), Germacrene D (8.64%) for MSEO and PLEO respectively. The two essential oils exhibited also a potent antioxidant activity by DPPH•, ABTS•+, O<sub>2</sub>•- radicals scavenging and iron reducing capacity. Furthermore, the transmission electron microscopy images characterized a multiform of NPs with average size of 25 nm. Besides, the hydrodynamic size and Zeta potential of the NiO NPs were  $293,86 \pm 9.51$  /  $288,1 \pm 7.04$  nm and -14/-18 mV, in demineralized water and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) respectively.

In addition, the findings demonstrated in the second part, that cell viability was reduced by NiO NPs ( $LC_{50} = 79.83 \mu\text{g/ml}$ ). Meanwhile, NiO induced oxidative stress in dose-dependent manner which was indicated by induction of reactive oxygen species and reduction of antioxidant enzymes activities. However, MSEO and PLEO exhibited a potent antioxidant capacity by cell viability improving, ROS scavenging and enhancing the endogenous antioxidant system against NiO NPs in this model of cells.

In conclusion, this investigation revealed for the first time, the protective activity of MSEO and PLEO against cell oxidative damage induced by NiO NPs. So, it is suggested that these essential oils could be used as a cell protector.

**Key words:** Nickel oxide nanoparticles; *Mentha spicata*; *Pistacia lentiscus*; essential oils; antioxidant; cytotoxicity, A549 cells.

# SOMMAIRE

# Sommaire

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>                   | <b>3</b>  |
| <b>1. Généralités sur le Nickel</b>                            | <b>3</b>  |
| 1.1. Définition  | 3         |
| 1.2. Propriétés  | 3         |
| 1.3. Utilisations  | 4         |
| 1.4. Les sources d'exposition                                  | 5         |
| 1.4.1. Sources industrielles                                   | 5         |
| 1.4.2. Sources environnementales                               | 5         |
| 1.5. Devenir du nickel   | 6         |
| 1.5.1. L'absorption  | 6         |
| 1.5.2. La distribution   | 7         |
| 1.5.3. L'excrétion   | 7         |
| 1.6. Le mécanisme d'action                                     | 7         |
| 1.7. Effets toxiques   | 9         |
| 1.7.1. Toxicité aiguë  | 9         |
| 1.7.2. Toxicité chronique                                      | 11        |
| 1.7.2.1. Effets sur les organes                                | 11        |
| 1.7.2.2. Effets cancérogènes                                   | 14        |
| 1.7.2.3. Mutagénicité et génotoxicité du nickel                | 15        |
| 1.8. Effets sur la reproduction et de développement            | 16        |
| 1.9. Généralités sur les nanoparticules                        | 16        |
| 1.9.1. Définition  | 16        |
| 1.9.2. Origine des nanoparticules                              | 17        |
| 1.9.3. Localisation dans l'environnement                       | 17        |
| 1.9.4. Les nanoparticules d'oxyde de nickel                    | 17        |
| <b>2. Le Stress Oxydant</b>                                    | <b>19</b> |
| 2.1. Définition  | 19        |
| 2.2. Les causes du stress oxydant                              | 19        |
| 2.3. Les dérivés actifs de l'oxygène                           | 20        |
| 2.3.1. Définition de radical libre                             | 20        |
| 2.3.2. Les principaux radicaux libres oxygénés et leur origine | 20        |
| 2.3.3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène              | 22        |
| 2.3.3.1. Les cibles lipidiques                                 | 22        |
| 2.3.3.2. Les cibles non lipidiques                             | 23        |
| 2.4. Les conséquences du stress oxydant                        | 24        |
| <b>3. Le Système Antioxydant</b>                               | <b>26</b> |
| 3.1. Définition  | 26        |
| 3.2. Les antioxydants enzymatiques                             | 26        |
| 3.2.1. La superoxyde dismutase (SOD)                           | 26        |

---

---

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2. La catalase   | 26        |
| 3.2.3. Les peroxydases   | 27        |
| 3.2.4. La thiorédoxine (TRX)   | 28        |
| 3.3. Les antioxydants non enzymatiques                               | 29        |
| 3.3.1. Les antioxydants liposolubles                                 | 29        |
| 3.3.2. Les antioxydants hydrosolubles                                | 30        |
| 3.4. Les polyphénols   | 32        |
| <b>4. Les Huiles Essentielles</b>                                    | <b>33</b> |
| 4.1. Définition  | 33        |
| 4.2. Répartition botanique   | 33        |
| 4.3. Localisation et lieu de synthèse                                | 33        |
| 4.4. Origine   | 34        |
| 4.5. Propriétés physico-chimiques                                    | 35        |
| 4.6. Domaines d'applications   | 36        |
| 4.7. Les principes chimiques   | 36        |
| 4.8. Activités biologiques   | 39        |
| 4.8.1. Activité antibactérienne                                      | 39        |
| 4.8.2. Activité antifongique   | 39        |
| 4.8.3. Activité antivirale   | 40        |
| 4.8.4. Activité antioxydante   | 40        |
| 4.9. Méthodes d'extraction   | 41        |
| 4.9.1. La distillation   | 41        |
| 4.9.2. Expression à froid  | 42        |
| 4.9.3. Extraction par solvants                                       | 43        |
| 4.9.4. Extraction par les corps gras                                 | 43        |
| 4.9.5. Extraction par micro- ondes                                   | 43        |
| 4.9.6. Extraction par fluides supercritiques                         | 44        |
| 4.10. Analyse de composition   | 44        |
| 4.10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)                    | 44        |
| 4.10.2. Le couplage CG/MS  | 45        |
| <b>5. Les Plantes Médicinales</b>                                    | <b>47</b> |
| 5.1. Historique  | 47        |
| 5.2. Définition  | 47        |
| 5.3. L'importance d'utilisation                                      | 48        |
| 5.4. La phytothérapie  | 48        |
| 5.4.1. Parties des plantes utilisées en phytothérapie                | 48        |
| 5.4.2. Les modes de préparation en phytothérapie                     | 49        |
| 5.4.3. Différents types de la phytothérapie                          | 49        |
| 5.4.4. Les avantages de la phytothérapie                             | 50        |
| 5.4.5. La phytothérapie en Algérie                                   | 50        |
| 5.5. Généralités sur les plantes investiguées                        | 50        |
| 5.5.1. Description morphologique de la famille des Anacardiaceae     | 50        |
| 5.5.1.1. Systématique des Anacardiaceae                              | 51        |
| 5.5.1.2. Description botanique de l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i> | 51        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 5.5.2. Description morphologique de la famille des Lamiacées   | 55        |
| 5.5.2.1. Description botanique du genre Menthe   | 55        |
| 5.5.2.2. Les différentes espèces de la menthe en Algérie   | 57        |
| 5.5.2.3. L'utilité de la menthe  | 57        |
| 5.5.2.4. Description botanique du <i>Mentha spicata</i>  | 59        |
| <b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>  | <b>61</b> |
| 1. Matériel végétal  | 61        |
| 1.1. Screening phytochimique   | 62        |
| 1.1.1. Recherche des principes actifs dans l'infusé  | 62        |
| 1.1.2. Recherche des principes actifs dans la poudre   | 63        |
| 1.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation  | 64        |
| 1.2.1. Rendement d'extraction  | 65        |
| 1.2.2. Analyse des huiles essentielles par chromatographie CPG-SM  | 65        |
| 2. Evaluation de l'activité antioxydante   | 66        |
| 2.1. Test au DPPH  | 66        |
| 2.2. Test de réduction du radical-cation ABTS  | 67        |
| 2.3. Le pouvoir réducteur  | 68        |
| 2.3. Test antiradicalaire (NBT/Riboflavine)  | 68        |
| 3. Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de nickel  | 69        |
| 3.1. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission | 69        |
| 3.2. Comportement des nanoparticules en solution   | 69        |
| 3.2.1. Détermination du potentiel Zêta   | 69        |
| 3.2.2. Evaluation du diamètre hydrodynamique   | 70        |
| 4. Cultures cellulaires et protocoles d'exposition aux NiO NPs et aux huiles essentielles                                  | 71        |
| 4.1. Cultures stocks des pneumocytes A549  | 71        |
| 4.2. Numération cellulaire en présence de bleu trypan  | 71        |
| 4.3. Traitement des cultures   | 72        |
| 5. Méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT   | 72        |
| 6. Evaluation de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote par coloration avec H <sub>2</sub> DCFDA  | 73        |
| 7. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) selon la fiche technique Bio-Vision Inc.                          | 75        |
| 8. Dosage de l'activité SOD selon la fiche technique Bio-Vision Inc.   | 77        |
| 9. Exploitation statistiques des résultats   | 79        |
| <b>Chapitre III : Résultats</b>  | <b>80</b> |
| 1. Analyse phytochimique   | 80        |
| 2. Résultat d'extraction des huiles essentielles   | 80        |
| 2.1. Caractères organoleptiques  | 81        |
| 2.2. La composition chimique des huiles essentielles   | 81        |
| 3. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles   | 85        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.1. Piégeage du radical libre DPPH et de l'anion $O_2^{\bullet-}$   | 85         |
| 3.2. Test TEAC et FRAP   | 86         |
| 4. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission | 88         |
| 4.1. Comportement des nanoparticules en solution: Mesures de potentiel Zêta  | 90         |
| 4.2. Mesures de diamètre hydrodynamique  | 90         |
| 5. Caractérisation morphologique de la lignée utilisée   | 93         |
| 6. Evaluation de l'activité mitochondriale et la viabilité cellulaire  | 93         |
| 7. Evaluation de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène   | 96         |
| 8. Evaluation de l'activité superoxyde dismutase (SOD)   | 99         |
| 9. Evaluation de l'activité catalase   | 100        |
| <b>Chapitre IV : Discussion des résultats</b>  | <b>102</b> |
| 1. Rendement et composition en huile essentielle   | 103        |
| 2. Activité antioxydante   | 104        |
| 3. Protocole de dispersion des NPs   | 104        |
| 4. Effets de NiO NPs et des huiles essentielles sur l'activité mitochondriale et la viabilité cellulaire                 | 105        |
| 5. Effets sur le stress oxydant  | 106        |
| <b>Conclusion et perspectives</b>  | <b>109</b> |
| <b>Références bibliographiques</b>   | <b>111</b> |



## Liste des Tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 01</b> : Propriétés physico-chimiques du nickel selon David.   | 3  |
| <b>Tableau 02</b> : Propriétés physico-chimiques des dérivés de nickel.   | 4  |
| <b>Tableau 03</b> : Les différentes valeurs de DL <sub>50</sub> des composés du nickel.   | 10 |
| <b>Tableau 04</b> : Différents espèces de la menthe en Algérie.   | 57 |
| <b>Tableau 05</b> : Caractéristiques géographiques et bioclimatiques des deux régions de récolte.   | 61 |
| <b>Tableau 06</b> : Screening phytochimique des feuilles des deux plantes.  | 80 |
| <b>Tableau 07</b> : Propriétés organoleptiques des deux plantes.  | 81 |
| <b>Tableau 08</b> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> identifiée par CG-SM.  | 82 |
| <b>Tableau 09</b> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> identifiée par CG-SM.  | 83 |
| <b>Tableau 10</b> : Effets scavenger et réducteur des huiles essentielles de <i>M. spicata</i> et <i>P. lentiscus</i> vis-à-vis des différents radicaux utilisés. | 86 |
| <b>Tableau 11</b> : Mesures de diamètre hydrodynamique, potentiel Zêta et de diffusion de NiO NPs dans des différentes solutions.                                 | 90 |

## Liste des Figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1:</b> Modèle proposé de l'absorption et la distribution intracellulaire des nanoparticules de NiO.  | 8  |
| <b>Figure 2:</b> Représentation schématique de l'absorption et les interactions cellulaires majeures des dérivés de Ni (II) insolubles dans l'eau (exp., Ni <sub>3</sub> S <sub>2</sub> et la poussière de NiO) et solubles (exp., NiSO <sub>4</sub> , NiCl <sub>2</sub> , acetate de Ni(II)). | 15 |
| <b>Figure 3:</b> Mécanisme de toxicité des nanoparticules de nickel.   | 18 |
| <b>Figure 4:</b> Le stress oxydant.  | 19 |
| <b>Figure 5:</b> Origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie.  | 21 |
| <b>Figure 6:</b> Réduction mono-électrique de l'oxygène moléculaire en eau.  | 21 |
| <b>Figure 7 :</b> Les trois étapes de la peroxydation lipidique.   | 22 |
| <b>Figure 8:</b> Les radicaux libres médiatisant le dommage cellulaire.  | 24 |
| <b>Figure 9:</b> ERO et leur impact biologique.  | 28 |
| <b>Figure 10:</b> Le système de défense antioxydant.   | 31 |
| <b>Figure 11:</b> Glande simple entièrement chargée, le calice d'une huile en forme de dôme.   | 34 |
| <b>Figure 12:</b> Les pols épidermiques, fleur d'un origan.  | 34 |
| <b>Figure 13:</b> Usine végétale.  | 35 |
| <b>Figure 14:</b> Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles.   | 37 |
| <b>Figure 15:</b> Les différents composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles.   | 38 |
| <b>Figure 16 :</b> Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.   | 42 |
| <b>Figure 17:</b> Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.  | 42 |
| <b>Figure 18:</b> Image de <i>Pistacia lentiscus</i> .   | 52 |
| <b>Figure 19:</b> Distribution géographique de genre <i>Pistacia</i> .   | 53 |
| <b>Figure 20:</b> <i>Mentha pulegium</i>   | 56 |
| <b>Figure 21:</b> <i>Mentha suaveolens</i>   | 56 |
| <b>Figure 22:</b> <i>Mentha spicata</i>  | 56 |
| <b>Figure 23:</b> <i>Mentha aquatica</i>   | 56 |
| <b>Figure 24:</b> <i>Mentha piperita</i>   | 57 |
| <b>Figure 25:</b> Situation géographique des deux stations d'étude.  | 61 |
| <b>Figure 26:</b> Montage de l'hydrodistillation type Clevenger.   | 65 |
| <b>Figure 27:</b> Schéma de transformation du DPPH <sup>•</sup> de sa forme active à celle inactive.   | 66 |
| <b>Figure 28:</b> Description du diamètre hydrodynamique et principe de la DLS.  | 70 |
| <b>Figure 29:</b> Etapes et principe du test MTT.  | 73 |
| <b>Figure 30:</b> Formation de la molécule fluorescente DCF par les ERO.   | 74 |
| <b>Figure 31:</b> Principe de dosage de l'activité SOD.  | 77 |
| <b>Figure 32:</b> Huile essentielle des deux plantes.  | 80 |
| <b>Figure 33:</b> Chromatogramme CPG-SM de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> .  | 81 |
| <b>Figure 34:</b> Chromatogramme CPG-SM de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .  | 83 |
| <b>Figure 35:</b> Activité antioxydante d'huiles essentielles de <i>M. spicata</i> et <i>P. lentiscus</i> mesurée par les tests DPPH (A) et NBT/Riboflavine (B). Acide Ascorbique (AA) et BHT étant des contrôles positives.   | 86 |
| <b>Figure 36:</b> Droite d'étalonnage du Trolox.   | 87 |
| <b>Figure 37:</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique.   | 87 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figure 38:</b> Clichés de MET de NiO NPs dans de l'eau déminéralisée à des différents grossissements (à gauche 50 nm et à droite 20 nm).   | <b>88</b>  |
| <b>Figure 39:</b> Clichés de MET de NiO NPs dans DMEM à des différents grossissements (en haut 200 puis 100 nm et en bas 50 nm).  | <b>89</b>  |
| <b>Figure 40:</b> Fréquence relative du diamètre de NiO NPs.  | <b>89</b>  |
| <b>Figure 41:</b> Distribution de la taille hydrodynamique des NiO NPs.   | <b>91</b>  |
| <b>Figure 42:</b> distribution de la diffusion des NiO NPs.   | <b>92</b>  |
| <b>Figure 43 :</b> Observation des cellules A549 par microscopie en contraste de phase.   | <b>93</b>  |
| <b>Figure 44:</b> Effets-doses de 24 h d'exposition aux (A) NiO NPs, (B) et (C) huile essentielle de <i>M. spicata</i> et de <i>P. lentiscus</i> , respectivement, sur la viabilité des cellules A549.                              | <b>94</b>  |
| <b>Figure 45:</b> Effets-doses de 24 h de pré-exposition des cellules A549 à l'huile essentielle de <i>M. spicata</i> et de <i>P. lentiscus</i> suivie par une exposition aux NiO NPs ((A) 80 µg/mL ou (B) 100 µg/mL) pendant 24 h. | <b>95</b>  |
| <b>Figure 46:</b> (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de <i>M. spicata</i> et de <i>P. lentiscus</i> sur la production des ERO dans les cellules A549 après 24 h d'exposition.   | <b>97</b>  |
| <b>Figure 47:</b> Production intracellulaire des ERO dans les cellules A549.  | <b>98</b>  |
| <b>Figure 48:</b> Taux d'inhibition (%) d'activité de la SOD, (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de <i>M. spicata</i> et de <i>P. lentiscus</i> dans les cellules A549 pendant 24 h.  | <b>99</b>  |
| <b>Figure 49:</b> Variation de l'activité CAT, (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de <i>M. spicata</i> et de <i>P. lentiscus</i> dans les cellules A549 pendant 24 h.   | <b>101</b> |
| <b>Figure 50:</b> Principaux modes d'internalisation des nanomatériaux dans les cellules en fonction de leur taille primaire ou de celle de leurs agrégats / agglomérats.   | <b>105</b> |

---

## Liste des Abréviations

| Abréviation                  | Signification   |
|------------------------------|---|
| ABTS                         | Acide 2,2'-azinobis 3-ethylbenzo-triazoline-6-sulphonate  |
| AFNOR                        | Association Française de Normalisation est d'Organisation Française   |
| AFssaps                      | Agence Française de sécurité sanitaire des produits de santé  |
| ATSDR                        | Agency for Toxic Substances and Disease Registry  |
| BHT                          | Butylhydroxy Toluène  |
| B-ME                         | Beta-Mercaptoéthanolamine   |
| DCF                          | 2',7'- Dichlorofluoresceine   |
| DMEM                         | Dulbecco's Modified Eagle's Medium  |
| DPPH                         | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle  |
| EAG                          | Equivalent d'acide Gallique   |
| EPA                          | Environmental Protection Agency   |
| ERN                          | Espèces Reactives de l'Azote  |
| ERO                          | Espèces Réactives de l'Oxygène  |
| FID                          | Détecteur à Ionisation de Flamme  |
| FRAP                         | Ferric Reducing Antioxidant Power   |
| HBSS                         | Solution Saline Equilibrée de Hank  |
| H <sub>2</sub> DCFDA         | 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceine Diacétate   |
| IARC                         | International Agency for Research on Cancer   |
| INRS-IAF                     | Institut National se la Recherche Scientifique (Armand-Frappier, Quebec)  |
| IPCS                         | International programme of chemical safety  |
| ISO                          | Organisation Internationale de Normalisation  |
| IC <sub>50</sub>             | Concentration inhibitrice à 50 %  |
| IR                           | Infrarouge  |
| MTT                          | 3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure  |
| NAS                          | National Academy of Sciences (USA)  |
| NP                           | Nanoparticules  |
| NTP                          | National Toxicology Program (USA)   |
| OMS                          | Organisation Mondiale de la Santé   |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | Anion superoxyde  |
| PBS                          | Slution Phosphate Saline  |
| PMSF                         | Fluorure de Phénylméthyl sulfonyle  |
| RMN                          | Résonance Magnétique Nucléaire  |
| SVP                          | Serum de Veau Foetal  |
| TEAC                         | Capacité Antioxydante Equivalente de Trolox   |
| Tris                         | Trishydroxyméthylaminométhane   |
| Triton-X                     | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ) <sub>9-10</sub> OH |
| Trolox                       | Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, amidinopropane   |
| UV                           | Ultraviolet   |
| WHO                          | World Health organization   |

# INTRODUCTION

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais en faible quantité. Le plomb, le mercure, le fer, le cadmium, le chrome et le nickel sont les principaux métaux émis dans l'air par les activités humaines; ces polluants peuvent s'avérer fortement toxiques et détériorer les sols, les eaux, les forêts et les cultures en plus de leurs effets sur l'homme (Chen & Seaton, 1998; Crump, 1999). Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires (Harber *et al.*, 2000).

Le nickel, suite à son affinité pour les protéines, les amino-acides et l'ADN, manifeste des effets cytotoxiques, parce qu'il augmente la concentration des oxydants dans les cellules (Klein *et al.*, 1994). Sa toxicité se manifeste aussi par l'amplification de la mort cellulaire programmée dite « apoptose » qui consiste à des modifications morphologiques et biochimiques notamment un rétrécissement cellulaire, une concentration de la chromatine et une fragmentation typique inter-nucléosomique de l'ADN.

Les effets biologiques des polluants peuvent être assimilés à des indicateurs biologiques (ou biomarqueurs) de polluant dans le règne animal et végétal. La caractérisation de ces biomarqueurs peut permettre la mise en évidence précoce de l'effet polluant avant l'altération de la structure des organismes, et surtout avant que toute la population ou l'écosystème ne soient perturbés.

L'approche « biomarqueurs » peut donc être une technique efficace pour prévenir, évaluer et réparer les effets intégrés précoces et réversibles du stress sur les organismes. Ainsi, on peut définir le stress comme un phénomène universel entraînant des réponses physiologiques, psychologiques, somatiques, et neuroendocriniennes qui assurent le maintien de l'homéostasie.

Diverses études ont montré que certains dommages oxydants peuvent être utilisés comme marqueurs biochimiques. Le stress oxydant est un ensemble d'effets néfastes liés à des formes actives de l'oxygène ou radicaux libres d'oxygène (ERO). La conséquence majeure de ce stress oxydant est la peroxydation lipidique qui est évaluée par le taux de malonedialdehyde (MDA), ce qui renseigne sur l'état physiologique des organismes. Parmi les stress oxydants on peut citer les polluants environnementaux tels que, le plomb, le cadmium, le vanadium, le nickel.etc. (Hfaiedh, 2002).

Le monde prend de plus en plus conscience du potentiel médical et économique de ressources naturelles qui fournissent les matières premières nécessaires à la fabrication des médicaments à base de plantes et d'autres produits de santé naturels. L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale: Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botanique. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977). Ce qui a donnée à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Les huiles essentielles, par leurs propriétés nombreuses et variées, sont utilisées dans différents secteurs : en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie, en pâtisserie, dans la fabrication des mastics, des insecticides et dans les industries pharmaceutiques. Ceci a été prouvé par plusieurs études (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, nous avons mis en lumière les huiles essentielles de deux espèces très répandues en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle, *Mentha spicata L* et *Pistacia lentiscus L*. Elles sont douées de propriétés curatives potentielles intéressantes.

Le choix ciblé concernant ces deux espèces est dictée par :

- Large distribution et répartition en Algérie.
- Leur disponibilité.
- Leur emploi large en médecine traditionnelle par les populations locales.

Notre objectif consiste, dans la première partie de ce travail, à valoriser les deux espèces choisies, *M. spicata* et *P. lentiscus*. Dans ce contexte, cette valorisation portera sur l'extraction des huiles essentielles ainsi qu'en évaluation de la composition chimique et de l'activité antioxydante. La deuxième partie portera sur l'étude de l'effet toxique des nanoparticules de NiO et de l'activité cytoprotective des huiles essentielles extraites, sur des cellules alvéolaires pulmonaires (A549).

# CHAPITRE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



## I. Généralités sur le Nickel

### 1. Définition

Le nickel est une substance que l'on retrouve dans le milieu naturel, essentiellement dans les minerais sulfurés extraits des sous-sols et dans les minéraux silicatés se trouvant en surface. Dans l'environnement, le nickel est surtout combiné à l'oxygène (oxydes) et au soufre (sulfures). La croûte terrestre contient environ 0,009% de nickel dans les minerais sulfurés, arséniurés, antimoniurés, oxydés et silicatés. De plus, le nickel est présent dans l'air, dans les particules en suspension, après avoir été rejeté par des activités humaines ou des phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques, les incendies de forêts et les météorites provenant de la haute atmosphère (Duke, 1980).

### 2. Propriétés

Le nickel est un métal blanc bleuâtre ou poudre grise, de forte masse atomique (58,69), de numéro atomique 28 et de masse volumique de 8.9 g/cm<sup>3</sup>. C'est un élément dur, malléable et bon conducteur de chaleur et d'électricité. Il est le cinquième élément le plus abondant en poids après le fer, l'oxygène, le magnésium et le silicium et est le 28<sup>ème</sup> élément le plus abondant dans la croûte terrestre (WHO, 1991).

**Tableau 01:** Propriétés physico-chimiques du Nickel selon David (2009).

|                           |                                |
|---------------------------|--------------------------------|
| Symbole                   | Ni                             |
| Série chimique            | métaux de transition           |
| Numéro atomique           | 28                             |
| Masse atomique            | 58,70 g/mol                    |
| Densité (à 20°C)          | 8,902 g/cm <sup>3</sup>        |
| Etat d'oxydation          | 2, 3                           |
| Etat ordinaire            | Solide                         |
| Couleur                   | Blanc argenté, reflet gris     |
| Point de fusion           | 1455°C                         |
| Point d'ébullition        | 2913°C                         |
| Isotopes les plus stables | 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 |

Le nickel est utilisé couramment pour fabriquer des alliages de métaux solides et durables. On retrouve ce métal dans de nombreux objets courants comme les casseroles inoxydables, les pièces de monnaie et les piles rechargeables. Les propriétés annoncées par ATSDR de ces dérivés sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 02** : Propriétés physico-chimiques des dérivés de nickel (ATSDR, 2005).

| Propriétés         | Sulfate de nickel      | Acétate de nickel                                  | Chlorure de nickel     | Nitrate de nickel                  | Oxyde de nickel       |
|--------------------|------------------------|--|------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| Formule chimique   | NiSO <sub>4</sub>      | Ni (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | NiCl <sub>2</sub>      | Ni (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | NiO                   |
| Poids moléculaire  | 154,75                 | 176,80   | 129,60                 | 182,72                             | 74.69                 |
| Couleur            | Jaune verdâtre         | Vert   | Jaune doré             | Vert                               | Vert                  |
| Etat physique      | Solide                 | Solide   | Solide                 | Solide                             | Solide                |
| Point de fusion    | 840 °C                 | /  | 1001 °C                | 56,7 °C                            | 1984°C                |
| Point d'ébullition | Dissocié à 840 °C      | 16,6 °C  | 973 °C                 | 136,7 °C                           | -                     |
| Densité            | 4,01 g/cm <sup>3</sup> | 1,798 g/cm <sup>3</sup>                            | 3,55 g/cm <sup>3</sup> | 2,05g/cm <sup>3</sup>              | 6.67g/cm <sup>3</sup> |

### 3. Utilisations

Comme de nombreux autres métaux, les applications du nickel à l'état pur sont beaucoup moins importantes que celles sous forme d'alliage avec d'autres composants. Ainsi, le nickel est employé dans la production d'aciers inoxydables et d'aciers spéciaux. Il est également employé dans la production d'alliages non ferreux utilisés par exemple dans la fabrication de pièces de monnaie, d'outils et d'ustensiles de cuisine. Cet élément est utilisé dans les batteries alcalines nickel-cadmium, dans la fabrication de pigments minéraux pour les métaux et les céramiques et comme catalyseur en chimie organique.

De plus le nickel et ses principaux composés sont utilisés dans une vaste gamme d'applications industrielles. Le nickel tétracarbonyle est employé dans la fabrication

de poudre de nickel de haute pureté, il est également utilisé comme catalyseur en synthèse organique. L'acétate de nickel est utilisé comme mordant pour les textiles, comme intermédiaire dans la fabrication d'autres composés de nickel et comme catalyseur. Le chlorure de nickel est employé pour le nickelage, pour fabriquer des encres et comme réactif de laboratoire, il sert également à piéger l'ammoniac dans les masques à gaz.

Le nitrate de nickel entre dans la composition de bains de nickelage et est utilisé comme colorant pour les porcelaines, il est également employé dans les batteries cadmium-nickel. L'oxyde de nickel est utilisé dans la fabrication de sels de nickel, dans la fabrication de ferrites utilisées dans l'industrie électronique, dans la production de catalyseurs et pour le nickelage, il est également employé comme colorant pour le verre et utilisé dans les peintures sur porcelaine. Le sulfate de nickel est utilisé dans les bains de nickelage, comme intermédiaire dans la fabrication de carbonate de nickel et de sulfate d'ammonium et de nickel. C'est le principal intermédiaire pour la fabrication de sels de nickel. Il sert à produire des catalyseurs et est employé comme mordant pour les textiles, il est également employé pour le noircissement du zinc et du bronze. Le sulfure de nickel est utilisé dans la production de catalyseurs et dans l'hydrogénation des composés de soufre en pétrochimie (Pichard *et al.*, 2006).

#### **4. Les sources d'exposition**

##### **4.1. Sources industrielles**

L'importance des risques liés au nickel serait limitée essentiellement à l'exposition professionnelle (Bruaux & Lafontaine, 1978; Haguenoer *et al.*, 1982). En fait les risques professionnels sont importants dans la métallurgie du nickel mais aussi chez les Nickeleurs. Il ne faut pas oublier la présence du Ni dans les ciments, les liquides de coupe, les détergents, les charbons bitumineux, les peintures et les talcs. Une exposition importante au Ni concerne les garagistes, les soudeurs, les fondeurs et raffineurs de nickel et des ouvriers de l'industrie chimique (Clemmenson *et al.*, 1981).

##### **4.2. Sources environnementales**

En dehors de l'exposition professionnelle, il existe un grand nombre de sources de contact avec le nickel.

**a. Air**

Le nickel fait partie des éléments pouvant contaminer l'air, mais aussi les sols et la végétation autour des fonderies de plomb (Ragaini *et al.*, 1977). Aux USA, les valeurs moyennes sont voisines de 6 mg/m<sup>3</sup> à la campagne et de 17 à 25 mg/m<sup>3</sup> en ville selon la saison. Dans les zones industrielles, les taux sont plus élevés (NAS, 1975).

**b. Eau**

Dans l'eau de mer, les concentration du nickel varient de 0.1 à 0.5 µg/l présent dans les rejet industriels, le nickel est toxique pour les poissons et il peut provoquer une leucopénie et une polyglobulie comme chez *Colisa fasciatus* (Agrawal *et al.*, 1979).

**c. Aliment**

L'alimentation apporte environ 0.3 à 0.6 µg de Ni par jour (Schroeder *et al.*, 1963). Les aliments les plus riches en nickel sont le cacao et le chocolat, le soja, les légumes secs, les noix et les céréales (Chantal, 2000).

**d. Divers**

La plupart des prothèse métalliques sont en acier inoxydable, lequel contient plus de 10 à 14% de nickel ou en alliage chrome-cobalt-nickel (Accominotti *et al.*, 1998). Quelques objets tels que bijoux, montre, bracelet, pièce de monnaie, sacs à main renferment du nickel (Menne & Solggaard, 1979).

**5. Devenir du Nickel**

**5.1. L'absorption**

Le nickel et ses composés sont absorbés par les voies respiratoires et dans une moindre mesure par le tube digestif. Environ 20 à 35% du nickel inhalé (sous forme de composés peu solubles) sont absorbés dans le sang à partir des voies respiratoires (ATSDR, 2005). L'absorption du nickel est directement corrélée avec la solubilité des composés, les plus solubles étant les mieux absorbés. Les composés solubles du nickel (chlorure, sulfate) sont plus facilement absorbés par le tractus respiratoire. Par voie orale, quarante fois plus de nickel sont absorbées par le tractus gastro-intestinal, lorsque le sulfate de nickel est administré dans l'eau de boisson ( $27 \pm 17\%$ ) par rapport à son administration par la nourriture ( $0,7 \pm 0,4\%$ ) (Sunderman *et al.*, 1989). Chez des rats exposés par gavage à une dose unique de différents composés du nickel (10 mg de nickel) dans une solution saline, le pourcentage de la dose absorbée varie de 0,01 % pour le monoxyde de nickel, 0,47 % pour le sulfure de nickel, 11,12 %

pour le sulfate, 9,8 % pour le chlorure et 33,8 % pour le nitrate (Ishimatsu *et al.*, 1995). L'absorption du nickel existe également par voie cutanée. Cette voie est peu significative quantitativement mais importante cliniquement dans la pathogénie de la dermatite de contact (OMS IPCS, 1991). Il n'existe pas de différence d'absorption du nickel par voie cutanée entre les sujets hypersensibles et les autres (Tiesjema & Baars, 2009).

### 5.2. La distribution

Dans le sérum, le nickel est lié à l'albumine, la L-histidine et l' $\alpha_2$ - macroglobuline. Chez les humains, les rats et les bovins, la fixation du nickel à l'albumine sérique se réalise au niveau d'un résidu histidine (Sarkar, 1984). La distribution du nickel varie selon la voie d'exposition. Des travailleurs exposés par inhalation au nickel présentent des taux pulmonaires plus élevés que la population générale. 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 (ATSDR, 2005). Une étude de Dostal *et al.* (1989) chez le rat suggère que le nickel peut s'accumuler dans le lait maternel. Dans le sérum et le placenta, le nickel est lié aux protéines spécifiques et/ou acides aminés. Ces ligands sont instrumentaux dans le transport et la distribution de nickel dans le corps (Pichard *et al.*, 2006).

### 5.3. L'excrétion

L'excrétion est principalement rénale ; elle est assez rapide. Le nickel ingéré (non absorbé) est excrété dans les fèces. La demi-vie plasmatique est de 12 à 24 heures et la demi-vie urinaire chez les travailleurs exposés est comprise entre 17 et 53 heures, selon l'hydrosolubilité des composés (Chantal, 2000). Après administration intratrachéale, la voie d'élimination du nickel chez les rats dépend de la solubilité des composés. Pour les composés solubles (chlorure, sulfate), environ 70 % de la dose administrée est excrétée dans l'urine en 3 jours. Pour les composés moins solubles (oxyde, sulfure de nickel), une grande partie de la dose est excrétée dans les fèces (ATSDR, 2005). Après administration par voie orale de chlorure de nickel à des rats, de 94 à 97 % est excrété dans les fèces et de 3 à 6 % dans les urines (Ho & Furst, 1973).

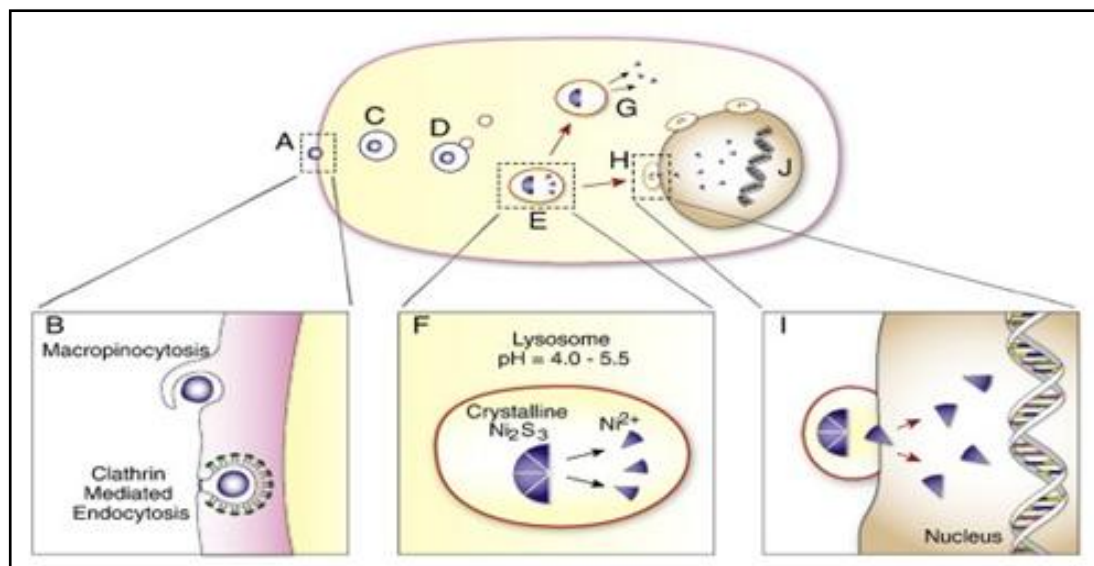
## 6. Le mécanisme d'action

Le nickel pénètre dans les cellules par l'intermédiaire de 3 différents

mécanismes à savoir,

- La capture via les systèmes de transport des ions métalliques.
- Par diffusion des composés du nickel lipophile à travers la membrane.
- Par phagocytose, alors que les solubles ne sont pas phagocytés mais pénètre dans la cellule par les systèmes de transport ou par diffusion membranaire.

Une fois entré dans la cellule, les effets du nickel dépendent de sa solubilisation et des doses présentes d'ions  $\text{Ni}^{2+}$ . La capacité de captage par les cellules est directement corrélée à la capacité des dérivés du nickel à élever les taux intracellulaires. Les structures cristallines de  $\text{NiS}_2$  sont accumulées dans les vacuoles cytoplasmiques en périphérie du noyau où il se produit une acidification progressive avec dissolution puis relargage de  $\text{Ni}^{2+}$  à la périphérie du noyau où ont lieu des interactions préférentielles avec les régions hétérochromatiques. Il se forme alors des complexes ADN-protéines et des cassures de brins (Mouffok, 2008).



**Figure 1:** Proposed Model of particulate nickel uptake and intracellular distribution. The nickel particle, crystalline  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  affixes at the cell surface (A). We hypothesize that the particle enters via macropinocytosis and/or clathrin mediated endocytosis — where the different forms of uptake may be related to the size of the particle (B). In macropinocytosis the membrane exhibits ruffling prior to uptake, a feature that was frequently observed during  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  endocytosis. In clathrin-mediated endocytosis the membrane undergoes a morphological change via invagination and forms a membrane pit. A number of proteins are involved in CME, pictured here are the clathrin proteins that stabilize the pit curvature and the dynamin that aggregates at the neck prior to scission. The endocytized particle moves via saltatory motion towards the nucleus inside some form of vesicle (the specific form will vary in accordance with the form of endocytosis — macropinosome or clathrin coated vesicle) (C). Lysosomes then interact with the vesicle in a process of lysosomal attack (D). These interactions often lead to lysosomal fusion (E). Once fused, the pH of the vesicle may be altered through proton pumps leading to acidification of the vesicle and the dissolution of the crystalline  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  particle. This process produces high concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  (F). In some cases the  $\text{Ni}^{2+}$  may exit the vesicle into the cytoplasm where they can interact with biomolecules (G); while in other cases the vesicles will continue to travel towards the nucleus where they will aggregate at the nuclear membrane (H). Those aggregated at the membrane will promote the transfer of  $\text{Ni}^{2+}$  ions into the nucleus (I). The presence of  $\text{Ni}^{2+}$  can lead to multiple effects including DNA condensation and the modification of epigenetic marks including increased DNA methylation and loss of histone acetylation (Munoz & Costa, 2012).

## 7. Effets toxiques

### 7.1. Toxicité aiguë

#### a. Études chez l'homme

Le composé du nickel ayant la plus forte toxicité aiguë est le tétracarbylnickel (OMS IPCS, 1991). Une étude de 179 cas d'intoxications par inhalation survenus en Chine depuis 1961 a été publiée par Shi (1986). Les concentrations dans l'air étaient supérieures à 50 mg de tétracarbylnickel/m<sup>3</sup>, avec des périodes d'exposition variant de 30 minutes à plus de 2 heures. Le temps de récupération varie de 7 à 40 jours selon la sévérité des symptômes.

La toxicité aiguë se déverse en deux phases : immédiate et retardée. La symptomatologie immédiate se manifeste par des maux de tête, des vertiges, des nausées, des vomissements, de l'insomnie et de l'irritabilité. Elle est suivie d'une période asymptomatique avant le début de la phase retardée. Celle-ci est essentiellement pulmonaire avec des douleurs constrictives dans la poitrine, une toux sèche, une dyspnée, une cyanose, une tachycardie, des symptômes gastro-intestinaux occasionnels, une sudation, des perturbations visuelles et une débilité. La symptomatologie ressemble à une pneumonie virale (Pichard *et al.*, 2006).

Un décès par syndrome de détresse respiratoire a été observé chez une personne qui pulvérisait du nickel lors d'un procédé de soudure sans porter d'équipement de protection (Rendall *et al.*, 1994). La mort est survenue 13 jours après l'exposition de 90 minutes à une concentration estimée de nickel métallique de 382 mg/m<sup>3</sup>. Le décès d'un enfant de 2 ans a été observé après ingestion accidentelle de 570 mg de nickel/kg (sous forme de sulfate de nickel). Un arrêt cardiaque est survenu 4 heures après l'ingestion et l'enfant est décédé 8 heures après l'exposition (Daldrup *et al.*, 1983). Des effets toxiques ont été observés chez 35 travailleurs d'installation de galvanisation ayant bu accidentellement de l'eau contaminée par du sulfate et du chlorure de nickel, et de l'acide borique (Sunderman *et al.*, 1988). L'exposition a été estimée entre 7,1 et 35,7 mg de nickel par kg. Les symptômes incluent des nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, maux de tête, sensations d'ébriété et une augmentation transitoire des érythrocytes (7 travailleurs), de la bilirubine sérique (3 travailleurs) et de l'albumine urinaire (3 travailleurs).

**b. Études chez l'animal**

Chez 28 rats soumis par inhalation à une exposition unique de 36,5mg de nickel/m<sup>3</sup> (sous forme de sulfate) pendant 2 heures, quatre morts ont été observés dans les deux jours suivant l'exposition (Hirano *et al.*, 1994).

Des hémorragies sévères des poumons ont été observées chez les rats décédés. Une augmentation de la susceptibilité aux infections à streptocoques a été observée chez des souris exposées à 0,46 mg de nickel/m<sup>3</sup> (sous forme de chlorure ou de sulfate) pendant 2 heures (Adkins *et al.*, 1979). Après un test de provocation avec des streptocoques, le taux de mortalité était environ 20% supérieur chez les souris exposées au nickel par rapport aux témoins. Chez l'animal, l'ingestion de sels de nickel est suivie d'un syndrome dysentérique, d'une atteinte tubulaire rénale, d'une hypothermie et de convulsions (Sunderman *et al.*, 1988).

Les données de la toxicité aiguë du nickel par voie orale, citées dans le tableau2, indiquent que les composés solubles du nickel (acétate, sulfate) sont plus toxiques que les moins solubles (oxyde et sous sulfure de nickel).

**Tableau 03:** Les différentes valeurs de DL<sub>50</sub> des composés du nickel (Pichard *et al.*, 2006).

| Voie d'exposition | Composé                | DL <sub>50</sub> (mg/kg). | Espèce               |
|-------------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| Inhalation        | Tétracarboynickel      | 0,100                     | Rats, 20 minutes     |
|                   | Tétracarboynickel      | 0,240                     | Rats, 30 minutes     |
|                   | Tétracarboynickel      | 0,067                     | Souris, 30 minutes   |
| Voie orale        | Sulfate de nickel      | 39                        | Rats Sprague-Dawley  |
|                   | Acétate de nickel      | 116                       | Rats Fischer 344     |
|                   | Acétate de nickel      | 136                       | Souris Swiss-Webster |
|                   | Oxyde de nickel        | > 3930                    | Rats Sprague-Dawley  |
|                   | Sous-sulfure de nickel | > 3665                    | Rats Sprague-Dawley  |



## 7.2. Toxicité chronique

### 7.2.1. Effets sur les organes

#### a. Effets respiratoires

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel par inhalation. Une augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire a été trouvée chez des travailleurs exposés chroniquement à des concentrations supérieures à 0,04 mg de nickel/m<sup>3</sup>, sous forme de monoxyde ou de métal (Cornell & Landis, 1984). Les effets respiratoires étaient de type bronchite chronique, emphysème et diminution de la capacité vitale. Des cas d'asthme ont été décrits à la suite d'une exposition professionnelle au nickel (Novey *et al.*, 1983; Dolovich *et al.*, 1984; Shirakawa *et al.*, 1990).

Des rats et des souris ont été exposés par inhalation au sous sulfure de nickel par inhalation 6 heures par jour et 5 jours par semaine, pendant 90 jours à des concentrations de 0,1 à 1,8 mg de nickel/m<sup>3</sup> (Dunnick *et al.*, 1989; Benson *et al.*, 1990). Une hyperplasie des macrophages alvéolaires a été notée chez les rats à toutes les concentrations et chez les souris à partir de 0,2 mg/m<sup>3</sup>. Pour les plus fortes concentrations, une inflammation chronique active et une fibrose interstitielle focale chez certaines souris ont été observées.

L'exposition chronique (6 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 78 semaines) à des poussières de sous sulfure de nickel (0,97 mg de nickel/m<sup>3</sup>, soit une concentration de nickel d'environ 0,7 mg/m<sup>3</sup>) a entraîné une augmentation des lésions pulmonaires chez des rats Fisher 344 (Ottolenghi *et al.*, 1974). Les lésions étaient de type pneumonie, atélectasie, bronchite, bronchectasie, emphysème. L'exposition chronique pendant deux ans de rats et de souris à l'oxyde (0 - 0,5 - 1 - 2 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 0 - 1 - 2 - 3,9 mg/m<sup>3</sup> pour les souris), au sous sulfure (0 - 0,11 - 0,73 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 0 - 0,44 - 0,88 mg/m<sup>3</sup> pour les souris) et au sulfate de nickel (0 - 0,03 - 0,06 - 0,11 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 0 - 0,06 - 0,11 - 0,22 mg/m<sup>3</sup> pour les souris) a entraîné des lésions respiratoires (NTP, 1996). Les lésions incluaient une augmentation du poids des poumons, une inflammation et/ou une fibrose des poumons.

### **b. Effets rénaux**

L'intoxication chronique au nickel est responsable d'une altération des cellules épithéliales des glomérules, d'une nécrose tubulaire focalisée (Grititz, 1975) et aussi une dégénérescence granulaire des tubules (Weischer *et al.*, 1980). Chez des travailleurs exposés à des composés solubles du nickel (sulfate et chlorure) à une concentration moyenne de 0,75 mg de nickel/m<sup>3</sup>, une élévation des taux urinaires de protéines totales, de  $\beta_2$ -microglobuline, de retinol binding protein et de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) chez 12 femmes, de lysozyme urinaire et de NAG chez 14 hommes a été observée (Vyskocil *et al.*, 1994). Ces observations témoignent d'une dysfonction tubulaire.

### **c. Effets hépatiques**

Chez le rat, l'intoxication par le nickel témoigne d'une dégénérescence des hépatocytes. Ainsi, le sulfate de nickel administré par voie cutanée ou orale provoque chez le rat des effets hépatiques qui se traduisent par un gonflement des hépatocytes, une nécrose focale et une vacuolisation; accompagnés d'une augmentation de l'activité enzymatique du foie notamment de la catalase, l'alanine aminotransférase (ALAT), l'aspartate aminotransférase (AST) et une augmentation du taux de lipides peroxydases et de la bilirubine. De plus, chez les rats mâles et chez les souris, le sulfate de nickel administré dans l'eau de boisson provoque une chute du poids du foie, alors que par gavage il n'en provoque pas chez les rats. Le hamster traité par le nickel par voie sous-cutanée montre une augmentation de l'ATPase-Mg<sup>2+</sup>, de la phosphatase acide et du glucose 6-phosphate. Alors qu'une augmentation du poids du foie est observée chez des chiens exposés pendant deux ans au sulfate de nickel (Mouffok, 2008).

### **d. Effets cutanés**

La dermatite de contact, qui résulte d'une exposition cutanée au nickel, est l'effet le plus fréquent dans la population générale. Des études suggèrent que l'exposition à long terme au nickel par voie orale peut être tolérée par quelques individus sensibilisés, et peut même servir de traitement désensibilisant (ATSDR, 2005). Van Hoogstraten *et al.* (1991) a étudié chez 2159 personnes la relation entre l'exposition orale au nickel lors de traitement orthodontique et la survenue d'une sensibilisation après perçage des oreilles et port de boucles d'oreilles contenant du nickel. L'administration de sulfate de nickel à dose croissante (0,01 -

0,03 mg/kg/j) jusque 178 jours chez huit femmes sensibilisées a entraîné une amélioration clinique significative chez toutes les femmes de l'eczéma des mains après un mois (Santucci *et al.*, 1994). Par la suite, une guérison de toutes les lésions cutanées, à l'exception de celles des mains, a été observée.

Par voie cutanée, l'allergie au nickel est l'allergie de contact la plus fréquente chez les femmes. L'exposition sensibilisante se produit le plus souvent par les produits de consommation, et plus particulièrement par les bijoux, plutôt que par une exposition professionnelle (ATSDR, 2005). Une association a été observée entre le perçage des oreilles et la sensibilité au nickel. Une étude chez des écolières âgées de 7 à 12 ans a montré que la fréquence de l'allergie au nickel était de 30,8 % chez les filles ayant les oreilles percées et de 16,3 % chez les filles n'ayant pas les oreilles percées (Dotterud & Falk, 1994).

#### **e. Effets immunologiques**

Chez 38 travailleurs exposés au nickel (composé non précisé), une augmentation significative des IgG, IgA et IgM et une diminution significative des IgE a été observée (Bencko *et al.*, 1986). Par ailleurs, une augmentation significative d'autres protéines sériques pouvant être impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire ( $\alpha_1$ -antitrypsine,  $\alpha_2$ -macroglobuline, céruloplasmine) a été observée. Ces modifications suggèrent que le système immunitaire a été stimulé par l'exposition au nickel. De plus, une hyperplasie des ganglions lymphatiques bronchiques a été notée avec le monoxyde de nickel (0,5 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 1 mg/m<sup>3</sup> pour les souris), le sous sulfure de nickel (0,11 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 0,44 mg/m<sup>3</sup> pour les souris) et le sulfate de nickel (0,11 mg/m<sup>3</sup> pour les rats, 0,22 mg/m<sup>3</sup> pour les souris). Des rats Wistar exposés de façon continue pendant quatre mois par inhalation à 0,025 mg de nickel/m<sup>3</sup> (sous forme de monoxyde de nickel) ont présenté une diminution du nombre de macrophages alvéolaires et de la réponse humorale (Spiegelberg *et al.*, 1984).

#### **f. Effets endocriniens**

Des effets sur la régulation de la glycémie ont été observés, comme une hyperglycémie due à l'augmentation du taux de glucagon. L'administration du chlorure ou du sulfate de nickel à des lapins ou chiens, les composés de nickel antagonisent l'action de l'insuline. Par ailleurs, l'injection de nickel à des lapins, des rats ou des

poulets provoque une augmentation rapide des concentrations en glucose plasmatique. De plus, Clemons et Garcia (1981) montrent une diminution significative du taux de prolactine et par voie orale une inhibition de l'absorption de l'iode par la thyroïde. Dormer et al. (1974) ont démontré que le nickel inhibe la sécrétion de l'amylase par la glande parotide, l'insuline par les îlots de Langerhans et la GH (growth hormone) par la glande pituitaire. Après l'administration du nickel à des rats ils ont remarqué une concentration élevée du métal au niveau de la glande pituitaire et l'hypothalamus et l'inhibition de la sécrétion de prolactine (Mouffok, 2008).

#### **g. Effets cardiovasculaires**

Chez le rat, l'administration de  $\text{NiCl}_2$  par injection induit une augmentation de la pression artérielle (Wang *et al.*, 2002). Une diminution du poids du cœur est observée chez des rats exposés au sulfate de nickel pendant deux ans (Ambrose *et al.*, 1976). Aucun changement histologique n'a été observé au niveau du cœur soit après l'administration de chlorures de nickel dans l'eau de boisson, soit chez les rats exposés au sulfate de nickel dans leurs diètes pendant deux ans (Obone *et al.*, 1999).

#### **h. Effets érythropoïétiques**

Le nickel induit une diminution du taux d'hémoglobine, d'hématocrite et du nombre de globules rouges chez des rats et le chien et une augmentation du nombre de plaquettes sanguines (Ambrose *et al.*, 1976).

#### **7.2.2. Effets cancérigènes**

Les particules de nickel sont connues comme cancérigènes chez de nombreux animaux ; elles peuvent induire des transformations dans des systèmes cellulaires et des aberrations chromosomiques (Lin & Costa, 1994). Les sels de nickel comme les particules de nickel peuvent être allergènes et cancérigènes chez l'homme en formant des radicaux oxygénés (Huang *et al.*, 1994). Cette cytotoxicité est vérifiée chez certains microorganismes (Wu *et al.*, 1994). L'intoxication à long terme par les dérivés du nickel provoque un redoutable pouvoir carcinogène. En effet, le  $\text{NiS}_2$  est le plus carcinogène. Il provoque une augmentation très significative des cancers pulmonaires (Ottolenghi *et al.*, 1975). De même, l'inhalation du nickel carbonyle peut induire facilement des sarcomes. Les dérivés du Ni ont une action synergique avec les hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes (Maenza *et al.*, 1971). Citons

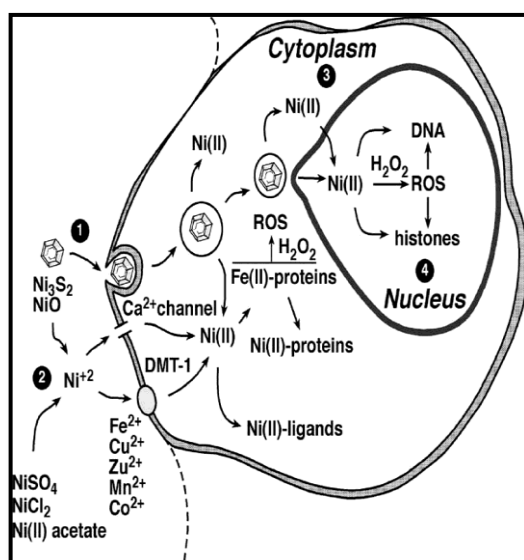
l'exemple de l'oxyde de carbone de la fumée de cigarette, une fois combiné avec le nickel forme le nickel-carbonyle cancérigène.

La conséquence la plus grave de l'exposition à long terme au nickel est l'apparition du cancer pulmonaire au niveau du sinus et du larynx; et un cancer des cellules épithéliales le plus souvent des tubes proximaux des reins. Le cancer de l'estomac augmente aussi significativement chez les nickeleurs et chez les fondateurs de nickel. En fait, le risque d'attente par le cancer est trois fois supérieur chez les travailleurs que chez les sujets non-exposés, encore grave, chez les fumeurs 22 fois par rapport aux non fumeurs. La plupart des cancers observés ont été détectés chez les travailleurs dans les usines de raffinage où les poussières cancérigènes sont le nickel métallique, NiS<sub>2</sub> et NiO (Hekmat, 2001).

### 7.2.3. Mutagénicité et génotoxicité du nickel

L'effet mutagène et cytotoxique des sels et des particules de nickel est bien vérifié (Fletcher *et al.*, 1994). Plusieurs études expérimentales et épidémiologiques ont montré que le nickel (Ni<sup>2+</sup>) est génotoxique en produit des espèces réactives de l'oxygène tel que le radical hydroxyle (Costa *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Les mécanismes de cette génotoxicité sont multiples soit par cassures mono brins et double brins de l'ADN pour des très faibles concentrations avec activation de la Poly ADP-ribose polymérase qui est normalement induite en présence de lésions dans l'ADN (Lei *et al.*, 2001), ou par inhibition (à des concentrations non cytotoxiques de Ni<sup>2+</sup>) des processus de réparation des lésions de l'ADN causées entre autres par les UV (Hu *et al.*, 2004; Wozniak & Blasiak, 2004).

**Figure 2:** Schematic representation of the uptake and major cellular interactions of Ni (II) derived from water-insoluble (e.g., Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> and NiO dust particles) and soluble (e.g., NiSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Ni(II) acetate) nickel compounds: **(1)** The insoluble particles enter the cell via phagocytosis; Ni(II) is released from the phagocytic vesicles into the cytoplasm and nucleus. **(2)** Soluble Ni<sup>2+</sup> is transported into the cell via the Ca<sup>2+</sup> channels, the divalent cation transporter system DMT-1 (Nramp 2), and by diffusion. **(3)** The cytoplasmic Ni (II) forms a variety of complexes with different ligands, such as amino acids, peptides, proteins, and glutathione, some of which are redox active and catalyze ROS production; the major effect is hypoxic stress due to Ni (II) interference with iron transport and iron-dependent hydroxylases. **(4)** The nuclear Ni (II) and Ni (II)-generated ROS interact with DNA and histones, causing promutagenic DNA damage (aggravated through inhibition by Ni(II) of DNA repair enzymes), and epigenetic alterations (stemming from Ni(II)-induced DNA hypermethylation, histone hypoacetylation and structural damage, and transcription factors activation) (Kasprzak *et al.*, 2003).



## 8. Effets sur la reproduction et le développement

Il n'existe pas des études chez l'homme quant aux effets sur la reproduction et le développement du nickel par voie orale ou cutanée (OMS IPCS, 1991). Chez 356 femmes employées dans une raffinerie de nickel, exposées par inhalation à des concentrations de 0,084 à 0,196 mg de nickel/m<sup>3</sup> (sous forme de sulfate de nickel), le taux d'avortement spontané était de 15,9% contre 8,5% chez des femmes non exposées (Chashschin *et al.*, 1994).

Les études chez l'animal avaient montré que l'administration de sulfate de nickel a produit une nécrose des tubes séminifères, chez le rat. Les sels de nickel sont tératogènes chez la souris (anencéphalie, exencéphalie, fente palatine et autres malformations squelettiques) (IARC, 1990). D'autre part, une diminution du poids foetal a été signalé chez des nouveau-nés de rats exposés 23,6 heures/jour à 1,6 mg de nickel/m<sup>3</sup> (sous forme de monoxyde de nickel) du jour 1 au jour 21 de la gestation (Weischer *et al.*, 1980). De plus, une dégénérescence tubulaire des testicules a été observée chez des rats exposés par voie cutanée avec du sulfate de nickel à la dose de 60 mg de nickel/kg/jour pendant 30 jours (Mathur *et al.*, 1977). L'administration intrapirétoniale de nitrate de nickel (12 mg Ni/kg P.C) chez les souris mâles a entraînée une réduction de la capacité fertilisante des spermatozoïdes, tandis que ceux qu'ont exposés au 8 mgNi/kg P.C ne présente pas des effets. L'injection intramusculaire de subsulfide de nickel (80 mg/Ni/kg P.C) chez les rats induit une réduction de poids corporel du fœtus (ATSDR, 2005).

## 9. Généralités sur les nanoparticules

### 9.1. Définition

Le préfixe « nano » représente dans le système international un milliardième (10<sup>-9</sup>) d'une unité de base. D'après la norme en vigueur, un objet possédant une dimension comprise entre 1 et 100 nm est appelé nanoparticule (NPs) (Krug & Wick, 2011). La découverte de l'intérêt de ces objets associée à l'évolution des techniques de synthèse a permis un essor rapide des NPs qui sont aujourd'hui retrouvées dans bien des domaines tels que la cosmétologie, l'industrie alimentaire ou encore l'industrie pharmaceutique. La production mondiale est estimée à plusieurs dizaines de milliers de tonnes répartie dans plus de 1500 produits (EPA, 2007).

## 9.2. Origine des nanoparticules

Les NPs sont produites par des procédés naturels tels que des éruptions volcaniques, les tempêtes de sables sahariennes, des feux de forêts ou simplement l'érosion des sols. La proportion de ces particules naturelles avoisine 90%. La présence de NPs dans l'environnement est également imputée à l'homme qui en produit des milliards avec notamment les rejets industriels. Les moteurs des automobiles, en particulier diesel, sont par ailleurs la première source de particules atmosphériques en milieux urbains. Les moteurs d'avion, les pneus, les cigarettes, la destruction des bâtiments sont également des générateurs de NPs (Buzea *et al.*, 2007).

## 9.3. Localisation dans l'environnement

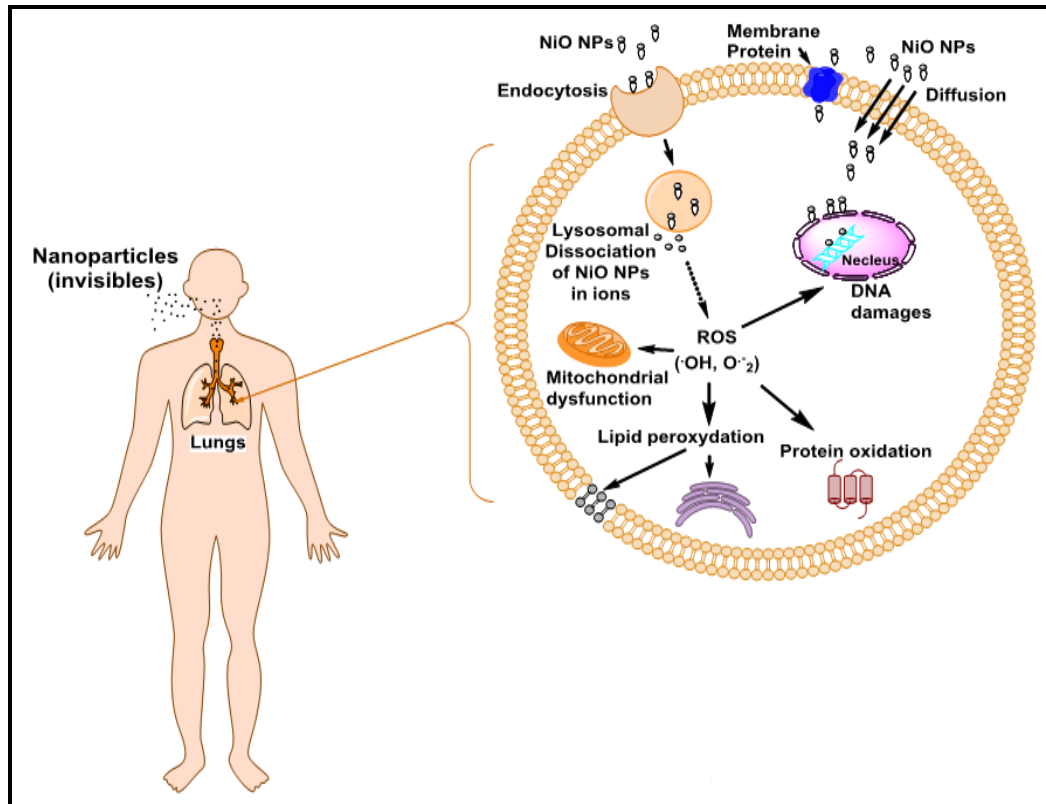
Une fois libérées dans l'environnement, les NPs peuvent connaître des destins différents. En milieu marin, les NPs peuvent aussi bien sédimenter, rester en suspension ou bien flotter à la surface. Selon leur localisation, les particules se rendent disponibles pour différents types d'organismes. Elles peuvent être par exemple retrouvées dans les algues marines, dans les invertébrés comme le plancton ou encore dans les poissons (Menard *et al.*, 2011). En milieu terrestre, les NPs peuvent être retrouvées dans les sols ou bien en suspension dans l'air et donc potentiellement dans n'importe-quel organisme vivant. A terme, les NPs pourraient envahir l'ensemble de la chaîne alimentaire pour devenir omniprésentes (Nowack & Mueller, 2008).

## 9.4. Les nanoparticules d'oxyde de nickel

Le NiO NPs est largement utilisé dans diverses applications telles que les catalyseurs, les cellules solaires, les diodes électroluminescentes, les batteries au lithium, les RRAM en informatique, les capteurs électrochimiques et les biosenseurs (Rao & Sunandana, 2008). L'utilisation variée des NPs de NiO multipliant les risques de contact aux animaux voire l'être humain (Ahamed *et al.*, 2013).

L'étude de la toxicité de NPs de NiO en utilisant plusieurs types de lignées cellulaires a fait l'objet de nombreuses publications. Les effets observés sont divers : (i) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules est toujours rapportée. Dans la cellule, les ERO sont naturellement fabriquées lors des processus métaboliques, cependant leur présence en quantités anormalement élevées peut entraîner des dommages parfois irréversibles (Yin *et al.*, 2012). (ii) Les NPs sont capables d'induire une peroxydation des membranes phospholipidiques. (iii) La

présence de NPs dans les cellules peut pareillement causer des dommages de l'ADN en altérant les fonctions cellulaires (Fig.3). (iv) La mort cellulaire, des ralentissements de prolifération et également des modifications dans les cycles cellulaires sont aussi des conséquences rapportées (Siddiqui *et al.*, 2012; Ahamed *et al.*, 2013; Capasso *et al.*, 2014).



**Figure 3 :** Mécanisme de toxicité des nanoparticules de nickle (Khiari *et al.*, 2018)



## II. Le Stress Oxydant

Dans les conditions physiologiques normales, l'oxygène bien qu'il soit indispensable à la vie il produit en permanence au niveau de la mitochondrie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques pour l'intégrité cellulaires en dépassant certains seuils. Les ERO sont également générées sous l'effet d'oxydant environnementaux, à savoir la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil et au tabagisme (Phung et *al.*, 1999) qui provoquent une surproduction des EOA dans notre organisme, un déséquilibre de la balance oxydante et par conséquent l'apparition des dégâts cellulaires.

### 1. Définition

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Fig. 4) (Cooke & Davidge, 2003; Davies, 2003).

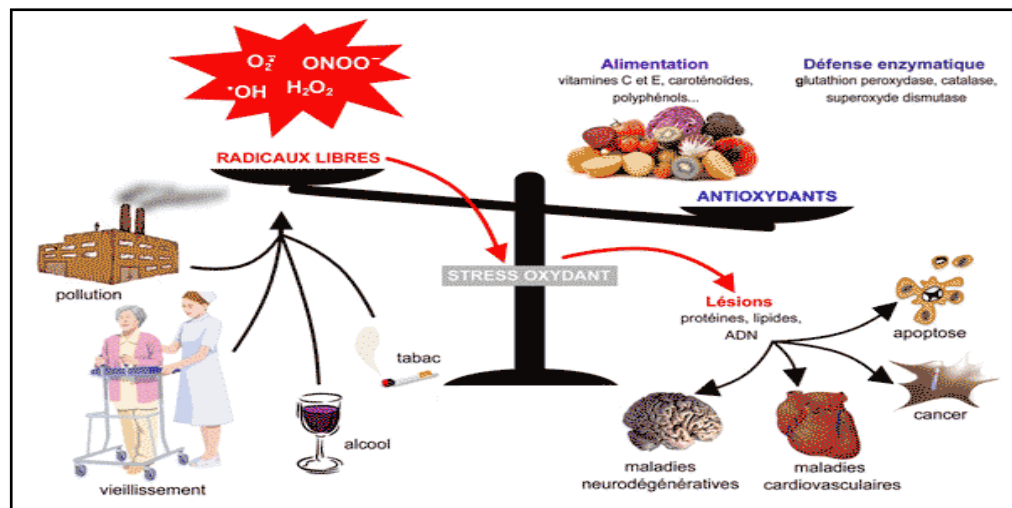


Figure 4 : Le stress oxydant (Sandrine, 2013).

### 2. Les causes du stress oxydant

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive à la suite de phénomènes toxiques exogènes. Ainsi l'organisme doit se

protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans ces circonstances anormales, la production de radicaux libres est beaucoup trop forte et elle ne peut pas être maîtrisée par l'organisme.

La rupture de cet équilibre peut provenir dans des cas :

- ✚ D'irradiations UV, intoxication par des polluants métalliques ou gazeux, ou encore une exposition à des xénobiotiques (Scandalios, 2005; Fetoui *et al.*, 2008)
- ✚ De changements brutaux d'environnement comme une surexposition à O<sub>2</sub>, une élévation de la température.
- ✚ D'ischémies / reperfusions suivant des thromboses.
- ✚ De défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par l'alimentation comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantités limitées.
- ✚ D'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit de nature enzymatique antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme le gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion).

Généralement, le stress oxydant est la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produit dans un tissu ou un type cellulaire bien précis ou objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme (Fetoui *et al.*, 2008).

### 3. Les dérivés actifs de l'oxygène

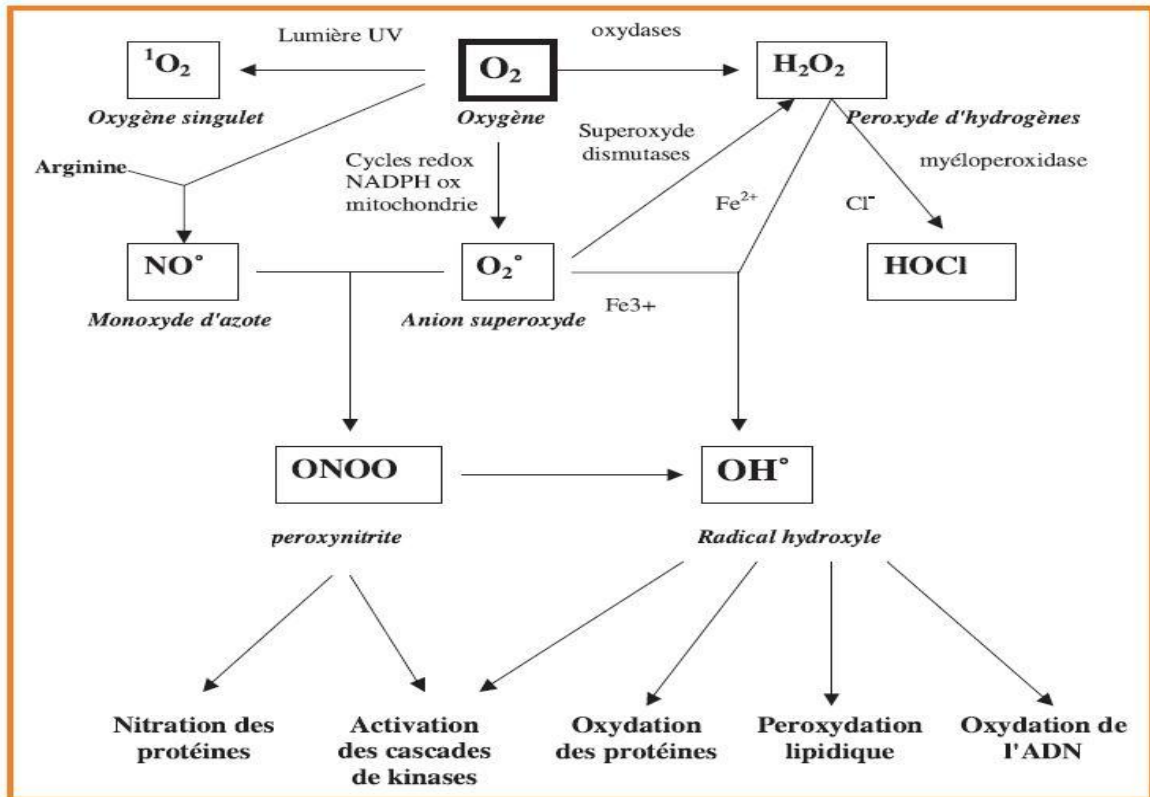
#### 3.1. Définition de radical libre

Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non paire(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) (Wassmann *et al.*, 2004; Wolin *et al.*, 2005; Angelos *et al.*, 2006).

#### 3.2. Les principaux radicaux libres oxygénés et leur origine

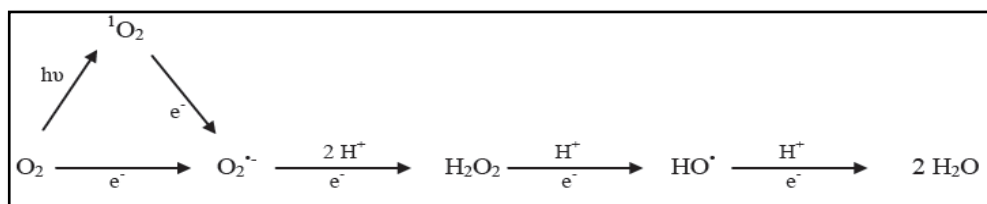
Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal, cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (Gauche & Hausswirth, 2006). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être des radicaux libres (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : anion superoxyde, HO<sup>•</sup> : radical

hydroxyle) ou des molécules non radicalaires mais néanmoins hautement instables ( $O_2$  singulet). La plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire, du NADPH et de l'activité de la xanthine oxydase. Alors que les espèces réactives du NO sont essentiellement produites par la NO-synthase (Fig. 5).



**Figure 5 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés impliqués en biologie (Favier, 2003)

Les radicaux libres sont très instables, leur durée de vie est généralement très courte ( $10^{-4}$  secondes). Leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin d'apparier leur électron célibataire, cela conduit souvent à la formation de nouveaux radicaux initiant ainsi une réaction en chaînes. Dans les milieux vivants, la diffusion du processus est limitée par la compartimentation tissulaire.



**Figure 6:** Réduction mono-électronique de l'oxygène moléculaire en eau (Cette réduction s'accompagne de la formation d'espèces partiellement réduites et réactives de l'oxygène).

### 3.3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

#### 3.3.1. Les cibles lipidiques

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

##### a. La peroxydation non enzymatique

Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell & Gutteridge, 1999). La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras  $R\cdot$  à partir d'un acide gras  $RH$  par soustraction d'un atome d'hydrogène ( $H\cdot$ ). Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que  $HO\cdot$  ou  $HOO\cdot$ . Le radical lipidique  $R$  subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' $O_2$  et former un radical peroxyde ( $ROO\cdot$ ). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un  $H$  d'un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique ( $ROOH$ ) formé peut être oxydé en présence de  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes.

La réaction en chaînes peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Fig. 7).

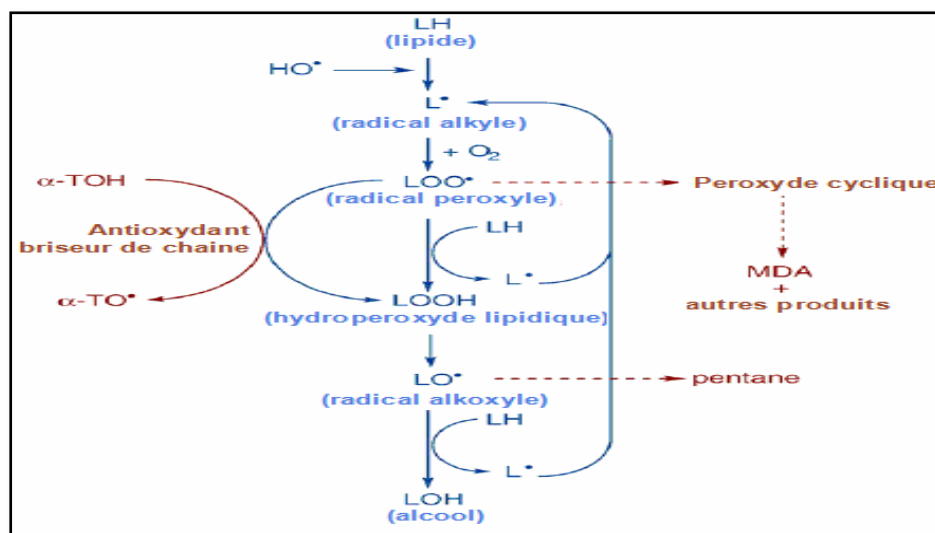


Figure 7 : Les trois étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev & Davies, 2008).

## **b. Les conséquences de la peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique spontanée s'avère toujours néfaste (Halliwell & Gutteridge, 1999; Kühn & Borchert, 2002). Dans les conditions physiologiques anormales, elle reflète la toxicité de l'oxygène et elle a plusieurs conséquences telles que :

- ✚ la présence d'un groupement peroxyde perturbe les interactions hydrophobes lipides/lipides et lipides/protéines, ceci conduit à des altérations structurales des membranes et des lipoprotéines.
- ✚ la fluidité des membranes est diminuée et la perméabilité est augmentée. Des enzymes et des récepteurs membranaires sont susceptibles d'être inactivés.
- ✚ les hydroperoxydes lipidiques sont à leur tour la source de radicaux libres qui peuvent induire des modifications secondaires des autres membranes et/ou des constituants des lipoprotéines.

Ceci met en péril l'intégrité des organites et/ou de la cellule et peut conduire à une lyse des organites et de la cellule.

### **3.3.2. Les cibles non lipidiques**

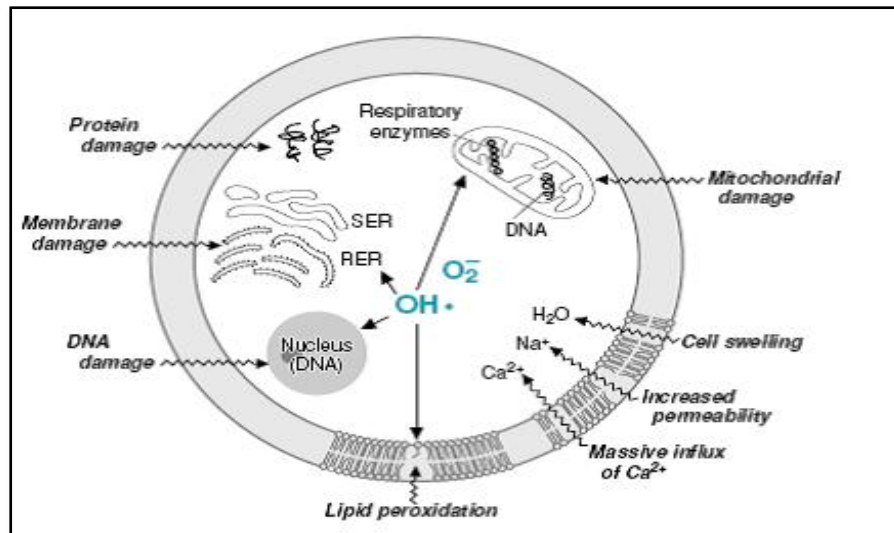
La production excessive de radicaux libres est responsable de lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides), mais aussi de lésions secondaires dues aux caractères cytotoxiques et mutagènes des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

Les acides aminés comme la méthionine, la lysine et les acides aminés aromatiques peuvent être oxydés de façon irréversible, ce qui modifie la structure des protéines et peut altérer leurs antigénicités ou leurs activités. Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du glutathion (GSH) ou de certaines protéines (Davies et *al.*, 1999).

Les ADN nucléaire et mitochondrial constituent une cible cellulaire importante. Les attaques radicalaires au niveau des désoxyriboses ou des bases puriques et pyrimidiques peuvent conduire à leur oxydation ainsi qu'à des coupures mono- ou double-brin de l'ADN, responsables éventuellement de mutations pouvant aboutir à la mort cellulaire (Imlay & Linn, 1988; Zastawny et *al.*, 1998). De puissants systèmes de

réparation (glycosylases, endonucléases) permettent d'assurer dans la plupart des cas la conservation du génome.

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de traces métalliques en libérant des cétoaldéhydes,  $H_2O_2$  et  $HO\cdot$ . Son oxydation entraîne la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde (Wolff *et al.*, 1989).



**Figure 8:** Free radical-mediated cellular injury. Superoxide and the hydroxyl radical initiate lipid peroxidation in the cellular, mitochondrial, nuclear, and endoplasmic reticulum membranes. The increase in cellular permeability results in an influx of  $Ca^{2+}$ , which causes further mitochondrial damage. The cysteine sulfhydryl groups and other amino acid residues on proteins are oxidized and degraded. Nuclear and mitochondrial DNA can be oxidized, resulting in strand breaks and other types of damage (Colleen *et al.*, 2005).

#### 4. Les conséquences du stress oxydant

Les concentrations physiologiques d'espèces réactives de l'oxygène ont un effet bénéfique sur la croissance cellulaire tandis que des taux élevés sont destructeurs (Remacle *et al.*, 1995). En effet, les ERO étant capables de réagir à différents niveaux dans les cellules, les conséquences liées à leur accumulation peuvent être très graves (Berlett & Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997) tel que le diabète, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier *et al.*, 1998); la cataracte, la sclérose, le syndrome de détresse respiratoire aigu (McGuire *et al.*, 1982); l'œdème pulmonaire ainsi que le vieillissement accéléré des tissus (Sohal *et al.*, 2002). De plus, le stress oxydant entraîne des complications diabétiques au niveau macro ou micro-vasculaire ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline (Sato *et al.*, 1979). Les ROS

seraient impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (Evans *et al.*, 1989; Perry *et al.*, 2002) où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres (Barus, 2008). Les dommages sur les lipides, principalement ciblés sur les acides gras de la bicouche membranaire, entraînent une cassure des parois cellulaires. L'oxydation d'un ou de plusieurs acides aminés des protéines peut conduire d'une part à une inactivation de celles-ci et d'autre part à des liaisons protéine ou ADN/protéine. Cette oxydation augmente alors la sensibilité à la protéolyse (Berlett & Stadtman, 1997; Dean *et al.*, 1997). Les dommages oxydatifs sur les acides nucléiques entraînent des mutations et des dégradations des bases pouvant provoquer le clivage d'un brin d'ADN. Les liaisons ADN/protéine générées par oxydation de l'ADN ou de la protéine peuvent provoquer un dérèglement de la machinerie répliquative (Beckman & Ames, 1997; Burrows & Muller, 1998). Toutes les réactions engendrées par ces dommages oxydatifs peuvent être la cause de mutations, de cancers engendrant la mort cellulaire.

### III. Le Système Antioxydant

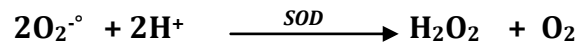
#### 1. Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont enzymatiques et non enzymatiques (Servais, 2004).

#### 2. Les antioxydants enzymatiques

##### 2.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme assure la première ligne de défense contre le stress oxydant, en éliminant l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) première espèce toxique générée à partir de l'oxygène.

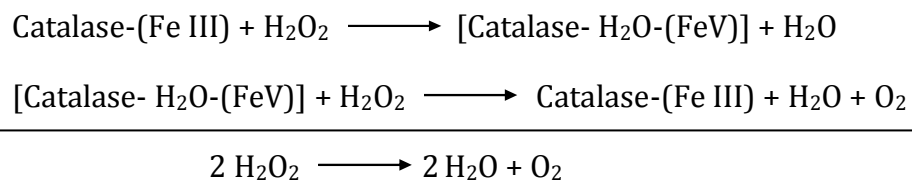


On distingue la SOD cytosolique qui peut être soit cuivre soit zinc dépendante et la SOD mitochondriale manganèse dépendante, il existe aussi une SOD extracellulaire. La SOD se comporte de deux manières différentes face à une condition de stress oxydant :

- Une surproduction de la SOD lors d'un stress oxydant modéré;
- Si le stress perdure et produit les dérivés réactifs de l'oxygène de façon excessive, la SOD sera détruite et sa concentration chutera (Mena et al., 1991).

##### 2.2. La catalase

La catalase est un groupe d'enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Cette enzyme prévient les molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. La catalase a donc pour rôle d'accélérer la réaction spontanée de dismutation de  $H_2O_2$  en oxygène et en eau selon le mécanisme suivant :





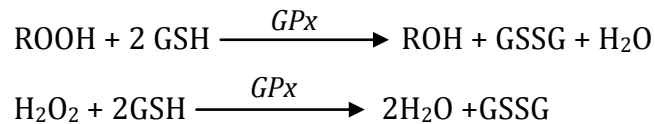
Tous les organismes aérobies possèdent la catalase qui est présente dans les érythrocytes, la moelle osseuse, le foie, les reins et la peau (Blondeau *et al.*, 1987).

### 2.3. Les peroxydases

Ces enzymes ont en commun une structure tétramériques. Chaque tétramère possédant un atome de sélénium dans son site actif, très fortement fixé à la chaîne peptidique, sous forme de sélélocystéine dans la séquence primaire. L'introduction du sélénium se faisant selon un mécanisme particulier dit péri-traductionnel.

- ***La glutathion peroxydase à sélénium (GPx)***

La GPx est inactivée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le terbutylhydroperoxyde, et HO· quand elle est incubée sans glutathion. L'enzyme natif n'est pas sensible à la trypsine ni à la chymotrypsine. Cet enzyme est de 80 kDa, sa sensibilité à la protéolyse augmente après traitement par des radicaux ou des peroxydes. Le rôle de la glutathion peroxydase à sélénium est très important dans la plupart des tissus où elle réalise la quasi-totalité de l'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme dans les globules rouges ou les plaquettes (Prohaska & Ganther, 1977).



- ***La glutathion peroxydase cytosolique***

Il s'agit d'un tétramère dont chaque sous unité porte une molécule de sélélocystéine sur son site actif. Le fonctionnement de l'enzyme nécessite un flux de glutathion recyclé par la coopération de plusieurs enzymes dont la glutathion réductase (GR) qui réduit le glutathion oxydé en consommant du NADPH, lui-même régénéré grâce à la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) alimentée par le shunt des pentose phosphates (Mates *et al.*, 1999).

- ***La glutathion peroxydase plasmatique***

La glutathion peroxydase présente dans le plasma et celle présente dans le cytosol sont différentes et proviennent des globules rouges ou des cellules endothéliales, les séquences et le poids moléculaire sont différents, 23 kDa pour la sous unité GPx plasmatique, contre 22 kDa pour la sous unité érythrocytaire. Le

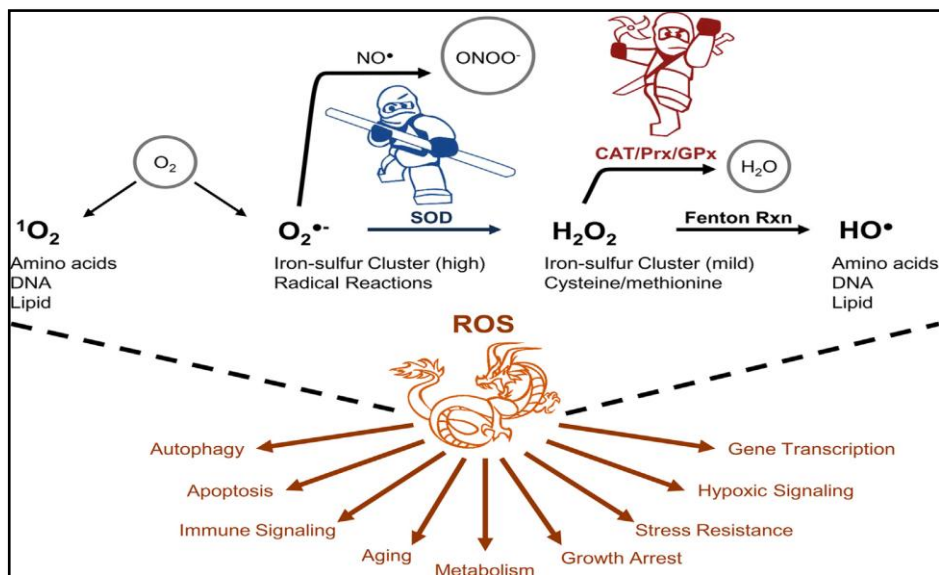
mécanisme d'action est identique, mais il y a un effet plus fort du zinc sur la GPx plasmatique (Soares, 2005).

- **La glutathion peroxydase membranaire (HPGPx)**

Cette glutathion peroxydase est capable de réduire les peroxydes membranaires, seulement, après action de la phospholipase A<sub>2</sub>. Elle agit sur les acides gras hydroperoxydés ; exp : la HPGPx réduit directement les hydroperoxydes du cholestérol, des cholestéryl-esters, et des phospholipides présents dans les membranes des globules rouges oxydés ou des lipoprotéines oxydées (Manel, 2008).

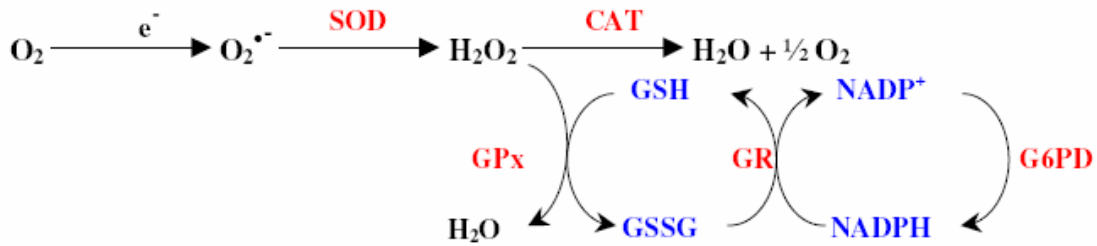
#### 2.4. La thiorédoxine (TRX)

Cet enzyme a une structure proche de celle de la glutathion réductase. Il consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement. Il joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatifs grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres. Des données biochimiques montrent que les thiorédoxines réduisent des protéines clefs pour le développement, la division cellulaire ou la réponse au stress oxydatif (Reichheld et al., 2005).



**Figure 9:** ROS and their biological impact. Each ROS has intrinsic chemical properties that will render it more likely to interact with a particular biological target. The exact target of a particular ROS will depend in part on the local environment in which it was produced. The cell presents a diverse range of environments and subsequent. physiologic responses to ROS production (Wojtovich & Foster, 2014).

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant:



### 3. Les antioxydants non enzymatiques

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives d'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires ( $\alpha$ -tocophérol, caroténoïdes).

#### 3.1. Les antioxydants liposolubles

Situés essentiellement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques circulantes, ces antioxydants sont capables grâce à leur structure chimique, de réagir directement avec les ERO et d'inhiber ainsi la peroxydation lipidique. Les principaux antioxydants liposolubles appartiennent à la famille des tocophérols ou des caroténoïdes.

- **La vitamine E**

C'est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , avec une activité antioxydante variable. L' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -ToCH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Il est admis que les radicaux tocophéryles sont régénérés par l'acide ascorbique et que, sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (Carr et *al.*, 2000). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' $\alpha$ -ToCH, connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical  $RO_2$ , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Khalil, 2002).

- **Les caroténoïdes**

Elles forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires (famille du carotène) dont la capacité antioxydante est similaire à celle des tocophérols. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en double liaison, elles sont d'excellentes piègeuses de radicaux peroxydes et de l'oxygène singulets. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être finalement détruite (Sthal & Sies, 1997).

### **3.2. Les antioxydants hydrosolubles**

- **La vitamine C**

La vitamine C (ou acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme et elle est située dans toutes les membranes cellulaires (Valk & Hornstra, 2000). Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Chen *et al.*, 2000).

- **Le glutathion**

Le glutathion ou L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine est un tripeptide dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de cosubstrat des GPx et des GSH-S-transférases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C, la vitamine E et les superoxyde dismutases (Caroline, 2003).

- **Les oligoéléments**

- a. Le sélénium**

Le sélénium est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant, voisin de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme

cellulaire. Cet effet de détoxification serait responsable des effets anticancéreux et anti-âge attribués au sélénium (Wolters *et al.*, 2006).

### b. Le zinc

Le Zinc est un oligo-élément et l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines antioxydantes comme les métallothionéines. Le zinc protège également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mezzetti *et al.*, 1998).

### c. Le Cuivre

Cet oligo-élément est aussi l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. Toutefois au même titre que le fer, le cuivre est considéré comme un métal de transition. Il joue un rôle important dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées. Une concentration trop élevée en cuivre par exemple en cas du processus de vieillissement pourra refléter la présence d'un stress oxydant (Del Corso, 2000).

### d. Le manganèse

Différents oligo-éléments jouent un rôle catalytique dans le fonctionnement de certaines enzymes antioxydantes. C'est le cas du manganèse pour les superoxydes dismutases. Le rôle biologique de la SOD-Manganèse est la protection de la mitochondrie (Fridovich, 1998).

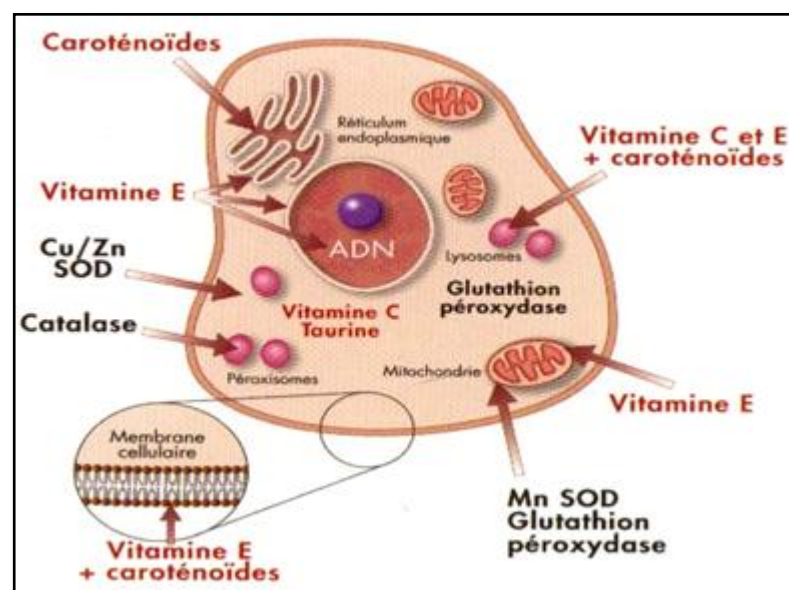


Figure 10: Le système de défense antioxydant (Opara, 2002).

#### 4. Les polyphénols

A l'instar d'autres micronutriments, les polyphénols présentent des rôles biologiques encore relativement inexplorés. Ces substances sont caractérisées par leur noyau aromatique porteur d'au moins deux fonctions phénol. Cela les rend particulièrement réactifs dans les processus d'oxydoréduction, ainsi que vis-à-vis de nombreux systèmes enzymatiques. On y distingue trois grandes familles : les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Surtout présents dans les parties aériennes des plantes (feuilles, fleurs, fruits et donc miel, tisanes.etc.), les flavonoïdes occupent une place privilégiée parmi les polyphénols alimentaires. Ils cumulent des propriétés antioxydantes antiradicalaires et anti-inflammatoires (Mogode, 2005).

## **IV. Les Huiles Essentielles**

### **1. Définition**

Les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc.; sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres et inflammables qui s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont liquides à température ordinaire, quelques unes sont solides ou en partie cristallisées et elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier. Les huiles essentielles se trouvent, pour la plus grande partie, élaborées par l'organisme végétal (Charabot *et al.*, 1899).

AFNOR et ISO ont défini l'huile essentielle comme « un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus ou bien par hydrodistillation. » (Laidani & Damir, 2008).

### **2. Répartition botanique**

Les huiles essentielles sont largement réparties dans le règne végétale; certaines familles en sont particulièrement riches (Conifères, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères et Labiées) (Paris & Hurabielle, 1981).

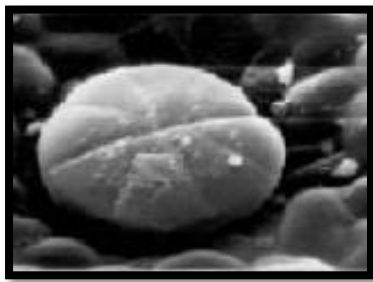
### **3. Localisation et lieu de synthèse**

Il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles, dans l'organisme végétal (Guignard *et al.*, 1985). Par contre, pour Garneau (2004), la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes (Fig.11 et Fig.12). Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voir dans un même organe (Lamarti *et al.*, 1994).

Les structures anatomiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des huiles essentielles sont très diverses (Bruneton, 1999) : cellules sécrétrices isolées (des

Lauracées ou des Zingibéracées) poils sécréteurs (des Lamiacées, des Astéracées, des Graminacées ou des Verbénacées), poches sécrétrices schizogènes ou schizolysigènes (des Myrtacées et des Rutacées) et des canaux sécréteurs (des Apiacées, des Asteracées et des Abitacées) (Guignard *et al.*, 1985).

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huiles essentielle, et les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces des monoterpènes. En conséquence, la dynamique du développement de ces structures ainsi que le procès sécréteur d'huile et le mécanisme ont une incidence directe avec la production de l'huile et le potentiel du système producteur (Sharm *et al.*, 2003).



**Figure 11:** Glande simple entièrement chargée, le calice d'une huile en forme de dôme (Sharm *et al.*, 2003).



**Figure 12:** Les poils épidermiques, fleur d'un origan (Kebissi, 2004).

#### 4. Origine

Les plantes vertes puisent l'eau du sol et utilise l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus est appelé photosynthèse. Il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferment la chlorophylle. Les glucides ainsi formés constituent une source d'énergie, ils contribuent à la génération de nouvelle cellules et ils sont à l'origine de composée secondaire tels que les lipides, les hétérosides et les essences. Ainsi les huiles essentielles font partie des résidus du métabolisme végétal (Fig. 13) (Kebissi, 2004).



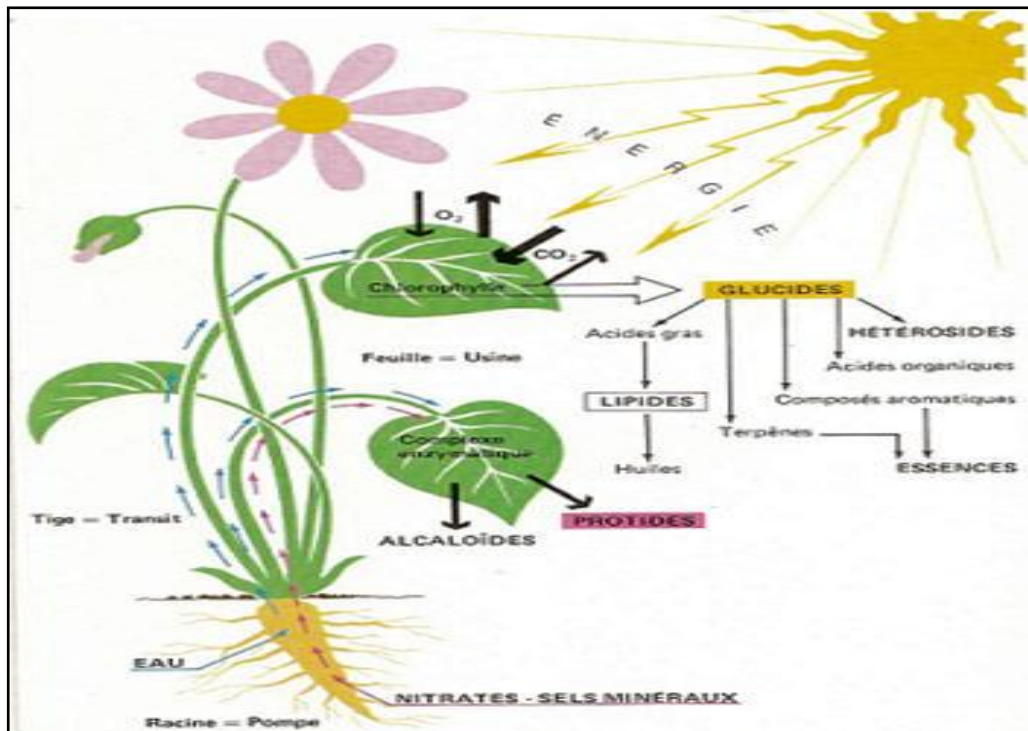


Figure 13: Usine végétale (Kebissi , 2004 ).

## 5. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bernard *et al.*, 1988; Bruneton, 1993). Les principales caractéristiques sont:

- ✚ Liquides à température ambiante ;
- ✚ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- ✚ Volatiles et très rarement colorées ;
- ✚ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- ✚ Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés ;
- ✚ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu soluble dans l'eau ;
- ✚ Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;

- ✚ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. Il convient alors de les conserver à l'abri de lumière et de l'air.

## 6. Domaines d'applications

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique, parfumerie technique (savons, détergents), alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles. Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents et elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange. Les huiles essentielles de *Citrus limon* par exemple, servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de pâtisseries et de confiseries. Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (Kehal, 2013).

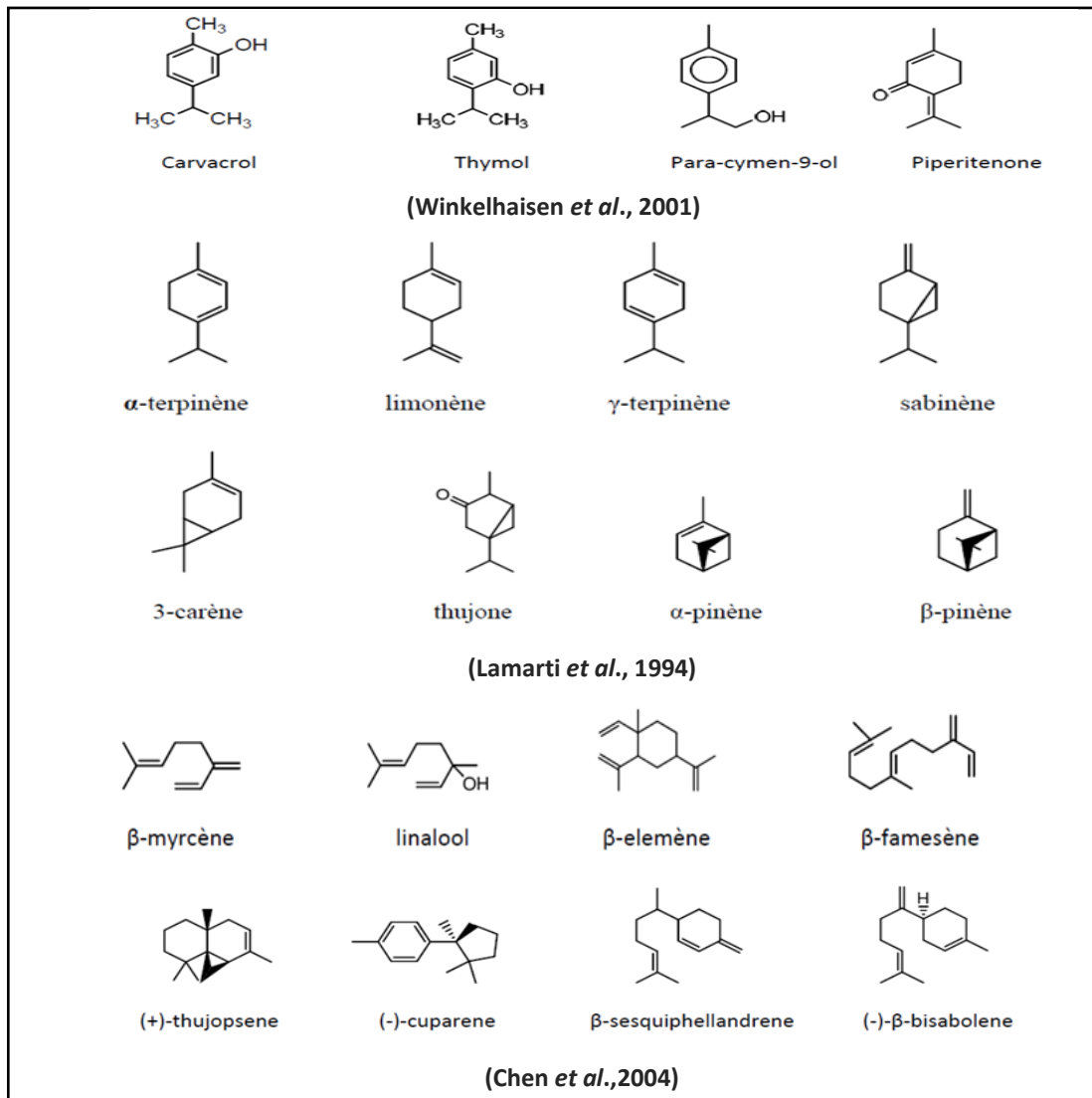
C'est en gastronomie que se fait le plus large emploi des plantes à essences sous forme d'épices. Celles-ci sont réparties en épices aromatiques (arômes amers et acres) comme dans le cas du faux poivrier, ou simplement en épice pour les desserts et pâtisseries (Himed *et al.*, 2016).

## 7. Les principes chimiques

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant, pour la grande majorité, à la famille des terpènes (Bakkali *et al.*, 2008). Seuls les terpènes les plus volatils (c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée) y sont rencontrés, les monoterpènes (myrcène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -terpinène, sabinene, etc.) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène, etc.). Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités «isopréniques» ( $C_5H_8$ ), soit deux unités pour les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ) et trois unités

pour les sesquiterpènes (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>). Ils ont la même origine métabolique. Ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles (Kaloustian *et al.*, 2008; Rota *et al.*, 2008).

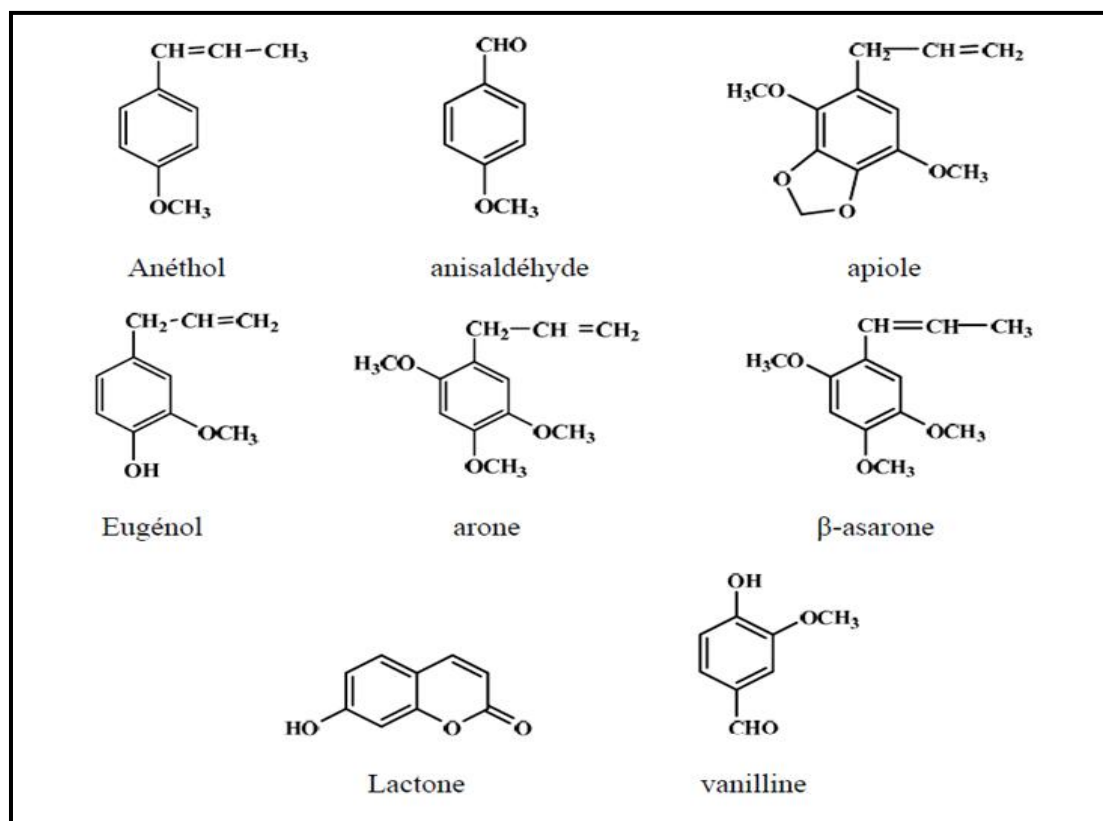
Exceptionnellement, quelques diterpènes (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Lahlou, 2004, Bakkali *et al.*, 2008). La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que les alcools (géraniol, α-bisabolol), les cétones (Méthone, β-vétivone), les aldéhydes (citronellal, sinensal), les esters (acétate d'α-terpinyle, acétate de cédryle) et les phénols (thymol). Plus de 22.000 composés isopréniques ont été répertoriés mais seul un petit pourcentage d'entre eux a été étudié dans la perspective d'évaluer leurs rôles fonctionnels (Fig. 14) (Vandermoten *et al.*, 2008).



**Figure 14:** Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles.

Une autre classe de composés volatiles fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques (Fig. 15) dérivés du phényl propane, qui empruntent une voie biosynthétique différente plus de celle des terpènes (Bakkali *et al.*, 2008). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugéno, l'anéthol, l'estragole et bien d'autres. Ils ont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille la cannelle, le basilic, l'estragon, etc (Bruneton, 1999). Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportion très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont bio-synthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Bakkali *et al.*, 2008).

Enfin il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation de terpènes non volatils, c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes et d'acides gras, comme par exemple le décanal qui est obtenu à partir de l'acide linoléique et  $\alpha$ -linoléique (Viaud, 1993).



**Figure 15:** Les différents composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).

## 8. Activités biologiques

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises (Bouguerra, 2012). De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités biologiques de ces huiles essentielles telles que l'activité antiseptique, l'activité antiradicalaire et l'activité inflammatoire (Nouioua, 2012).

### 8.1. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent à la famille des Labiatae. L'origan, le thym, la sauge, le romarin et le clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à huiles essentielles riches en composés phénoliques, comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol à forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et comme arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires (Djenane *et al.*, 2002; Bousbia, 2004; Kuda *et al.*, 2004; Djenane *et al.*, 2006). Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (Pauli, 2001).

Il a été démontré que les huiles essentielles de Citrus sont efficaces contre les bactéries pathogènes et les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infections alimentaires telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogene*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium*, et *Acrobacter butzleri* (Belletti *et al.*, 2004; Fisher *et al.*, 2007).

### 8.2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (De billerbeck *et al.*, 2002; Koba *et al.*, 2004; Oussou *et al.*, 2004; Ouraini *et al.*, 2005) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *aspergillus fumigatus* (Duarte *et al.*, 2005). Des travaux similaires ont été réalisés par Momammedi (2006) sur l'huile essentielle de *Cistus*

*ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus*; les résultats ont démontré que les huiles essentielles de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique «*in vitro*» vis-à-vis de l'*Aspergillus flavus* (Omidbeygi *et al.*, 2007). Les huiles essentielles d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (Dongmo *et al.*, 2008).

Les huiles essentielles de Citrus (d'orange douce, de citron, de mandarine et de pamplemousse) montrent une activité antifongique contre *Aspergillus Niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum* (Sharma & Tripathi, 2006; Fisher & Phillips, 2008; Viuda-Martos *et al.*, 2008). Généralement les champignons sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries (Cox *et al.*, 2008).

### 8.3. Activité antivirale

Les virus sont, généralement, fortement sensibles aux molécules aromatiques des huiles essentielles telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des huiles essentielles ont montrées des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'huile essentielle de *Mentha piperita* a été étudié «*in vitro*» contre les virus d'Herpès Simplex (HSV-1 et HSV-2), une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations de 0,002% à 0,008% (Schuhmacher & Reichling, 2003).

### 8.4. Activité antioxydante

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante des huiles essentielles, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne auto-catalytique de l'oxydation. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène.

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts, etc.) ou l'application par vaporisation en surface de

l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers, etc.) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Laib, 2011).

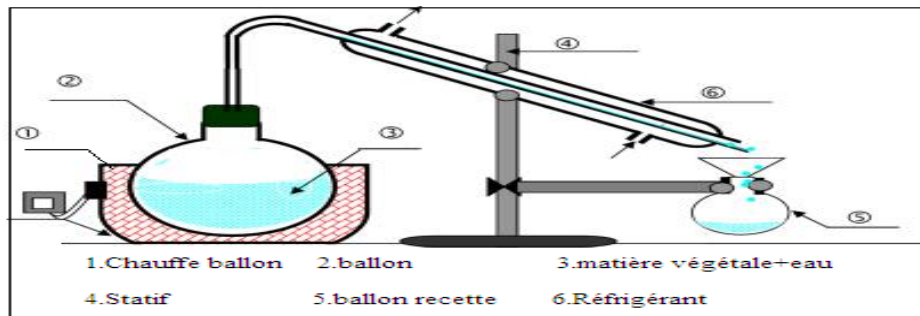
## 9. Méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, les caractéristiques physico-chimiques, de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (Samate-Abdoul, 2001).

### 9.1. La distillation

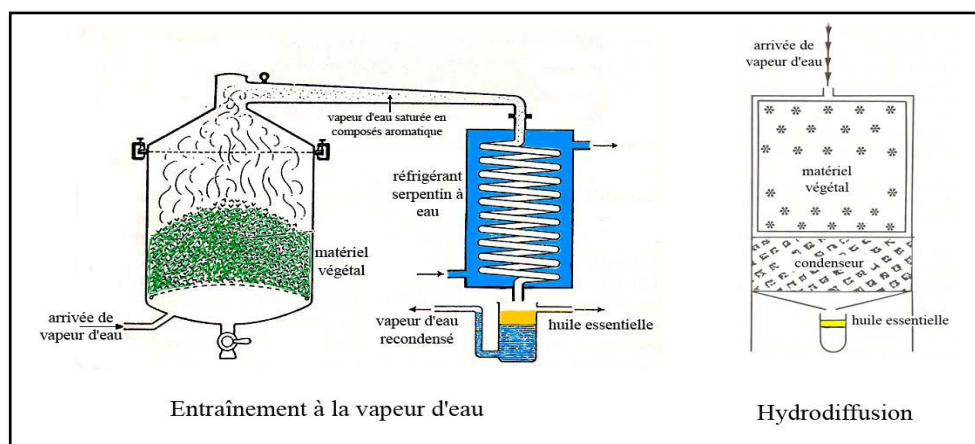
La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieur aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par leur vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Frachomme & Péroël, 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau (Silou *et al.*, 2004).

L'Hydrodistillation : il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur; le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Bruneton, 1999). Cette technique a été appliquée dans de nombreux travaux (Fig. 16) (Fellah *et al.*, 2006 ; Senhaji *et al.*, 2006).



**Figure 16 :** Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

Vient en suite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau : Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques : le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Fig. 17) (Frachomme & Péroël, 1990). Cette méthode, est industriellement, la plus utilisée pour l'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le but d'obtenir un bon rendement de l'essence et de réduire le temps d'extraction (Marzouk *et al.*, 2006).



**Figure 17:** Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Azzouz, 2005).

## 9.2. Expression à froid

L'extraction par expression à froid ou grattage est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des écorces d'agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, pamplemousse, bergamote, etc. Ces écorces qui renferment une quantité importante d'huile essentielle par des procédés mécaniques à température ambiante (Buronzo,



2008). Le principe de cette technique consiste à dilacérer les zestes et récupérer le contenu des poches sécrétrices rompues par un procédé physique. Le procédé classique repose à exercer sous un courant d'eau une action abrasive sur toute la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation (Afssaps, 2008).

### **9.3. Extraction par solvants**

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse due au prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction est le manque de sélectivité ; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Brian, 1995).

### **9.4. Extraction par les corps gras**

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud par immersion des organes végétaux dans le corps gras (Brian, 1995).

### **9.5. Extraction par micro- ondes**

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelées Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD), Consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un

rayonnement micro-ondes, d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis par la décantation des condensats. Cette technique est rapide et économique (eau et énergie) et donne un extrait dépourvu de solvant résiduel (Momponb, 1994).

### **9.6. Extraction par fluides supercritiques**

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit.

Toute fois, cette technique d'extraction présente un inconvénient est la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique, qui est le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ( $P = 73,8$  bars,  $T^\circ = 31,1^\circ\text{C}$ ), le  $\text{CO}_2$  possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Nicolas & Michaël, 1999).

## **10. Analyse de composition**

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituants présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile essentielle est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (France, 1998).

### **10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la

technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kovats) ou en programmation de température (indices de rétention). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes. Les indices de rétention sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature.

Les méthodes chromatographiques (chromatographies sur couche mince, sur colonne et d'exclusion sur gel) sont également utilisées, dans le but soit d'isoler un composant pur de l'huile essentielle, soit pour fractionner les constituants de celle-ci, par groupe: hydrocarbures, dérivés oxygénés, etc. À cet effet, on emploie des systèmes d'éluant peu polaires. Pour l'identification d'un composé pur, les méthodes chromatographiques, les procédés physiques et chimiques peuvent être complétés par les méthodes spectrales: IR, UV, RMN (Lahlou, 2004).

## **10.2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CG/SM)**

Les premiers appareils de routine CG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels parfumerie, cosmétique, médecine), etc. Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (De Maack & Sablier, 1994).

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux

utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge  $m/z$ . Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe.

## V. Les Plantes Médicinales

### 1. Historique

Depuis les temps les plus reculés, la préoccupation de l'homme a été la satisfaction de ces besoins alimentaires, il a développé ainsi intime avec le milieu qui l'entourait. Pour se soigner, il apprit à ses dépens discerner les ressources végétales et animales nécessaires à se servir (Barka & Ben Attallah, 2010).

C'est seulement à partir de 4000 ans avant Jésus Christ que l'on retrouve des documents écrits où sont mentionnés des drogues comme l'opium et la jusquiame. Tandis que les civilisations babyloniennes, sumériennes et égyptiennes accumulent les connaissances empiriques concernant les plantes médicinales, les arbres diffusent ce savoir autour de bassin méditerranéen (Benarous, 2009).

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles ont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne (Barka & Ben Attallah, 2010).

### 2. Définition

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces, peuvent avoir des actions très différentes suivant leur mode de préparation (Baba Arbi, 2010). Les plantes ont constitué, depuis toujours, la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (Bahaz & Rachdi, 2010).

Certaines plantes sont inoffensives, mais d'autres dite nombreuses (digitale, belladone, colchique, etc.), sont toxiques et ne sont utilisées que sous des formes bien contrôlées, exclusivement commercialisées en pharmacie. L'emploi inconsidéré de plantes cueillettes dans la nature peut aboutir à des intoxications graves, voir mortelles (Benarous, 2009).

### **3. L'importance d'utilisation**

Les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, ou d'en prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou affections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien (Bahaz & Rachdi, 2010).

### **4. La phytothérapie**

La phytothérapie est un mot composé de deux mots grec : phytos, plantes et trepia, traitement. Il désigne l'utilisation des plantes dans le traitement des maladies (Baba Arbi, 2010). Elle est la science des plantes médicinales et elle est basée sur l'étude de la composition et les effets des substances naturelles d'origine végétales (Barka & Ben Attallah, 2010). L'inventaire partiel établi dans divers pays par l'organisation mondiale de la santé répertoire environ 20 000 plantes médicinales. Parmi les 250 000 espèces de plantes que compte actuellement notre planète, moins de 10% ont fait l'objet d'analyses chimiques fines pour détecter d'éventuels principes actifs (Benarous, 2009).

#### **4.1. Parties des plantes utilisées en phytothérapie**

Les molécules actives utilisées en phytothérapie sont extraites et purifiées à partir des organes précis des plantes et non pas à partir de la plante entière (Barka & Ben Attallah, 2010). Les divers organes (Feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, bourgeons, graines) peuvent avoir des activités très différentes (alimentaire, médicinale ou toxique). Il faut donc toujours préciser l'organe qui est l'origine de l'activité (Baba Arbi, 2010).

Les substances contenues dans les plantes sont de nature chimique variée ; certaines sont solubles dans l'eau, d'autres dans l'alcool éthylique et d'autres encore dans l'huile. A partir des plantes médicinales, on peut obtenir différentes préparations : infusion, décoction, macération dans l'alcool (teinture) ou dans l'huile (extraction huileuse, plus rare), etc. Les plantes peuvent aussi être consommées entières, fraîches ou sèches, réduites en débris plus ou moins fins. Les sèves et sécrétions sont également utilisées dans certains cas. Il est enfin

possible d'en extraire chimiquement des principes actifs en vue de leur utilisation thérapeutique (Baba Arbi, 2010).

#### **4.2. Les modes de préparation en phytothérapie**

En fonction de l'effet thérapeutique recherché, l'usage traditionnel puis la recherche, ont au point des procédés de traitement des plantes qui permettent de ne garder que les molécules intéressantes, pour une utilisation locale, buvable ou injectable. Dans les préparations, la composition d'un remède peut réunir différentes plantes. La tisane, le cataplasme appliqué directement sur la peau, le sirop, les solutions alcoolisées ou aqueuses, les essences et les huiles sont les formes les plus courantes de remèdes (Sebai & Boulai, 2012).

#### **4.3. Différents types de la phytothérapie**

Les différents types connus de la phytothérapie sont les suivants :

##### **a. Aromathérapie**

Littéralement est le soigne par les odeurs, ce terme a été utilisé pour désigner la thérapie basée sur l'utilisation des huiles essentielles secrétées par de nombreuses familles de plantes; utilisées souvent à travers la peau (Alessandra, 2008)

##### **b. Gemmothérapie**

Le terme gemmothérapie se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules.

##### **c. Herboristerie**

L'herboristerie correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. Elle se sert de la plante fraîche ou séchée et utilise soit la plante entière ou une partie de celle-ci (écorce, fruits et fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion et macération. Ces préparations existent aussi sous forme, plus moderne, de gélule de la poudre sèche avalable.

##### **d. Phytothérapie pharmaceutique**

Utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils ont été présentés sous forme de sirop, gouttes, gélules et de lyophilisats (Zeghad, 2009).

#### 4.4. Les avantages de la phytothérapie

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne; la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes (rhume ou toux) ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques, considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves, décroît. Les bactéries et les virus sont peu à peu adaptés aux médicaments et les résistent de plus en plus. Aussi que l'organisme bien accepte les remèdes naturels, De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques.

En fin, Les phytothérapeutes prescrivent toute une variété de plantes purificatrices pour aider le corps à évacuer ses toxines. Le meilleur exemple est sans conteste la bardane comme (*Arctium lappa*), largement utilisée dans les médecines chinoise et occidentale (Halbaoui, 2012).

#### 4.5. La phytothérapie en Algérie

En Algérie les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle où elles sont largement employées dans divers domaines de la santé. Dans les dernières années la phytothérapie est très répandue, des herboristes sont partout vendant des plantes et de mélanges pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables. Des chiffres recueillis auprès du centre national du registre de commerce, montrent qu'à fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants. La capitale en abritait, à elle seule, le plus grand nombre avec 199 magasins, suivie de la wilaya de Sétif (107), Bechar (100) et El Oued avec 60 magasins (Sebai & Boudali, 2012).

### 5. Généralités sur les plantes investiguées

#### 5.1. Description morphologique de la famille des Anacardiaceae

La famille des Anacardiaceae sont des arbres, des arbustes (exceptionnellement plantes grimpantes), à canaux résinifères schizogènes, à feuilles composées pennées



ou trifoliolées, généralement alternes, dépourvues de glandes ponctiformes. Inflorescence en panicules.

Fleurs actinomorphes, hétérochlamydées, parfois apétales, 5-mères, (hétérosexées) et/ou unisexuées, généralement hypogynes, diplostémones ou haplostémones (à filets souvent concrescents, à la base), apocarpes ou syncarpes. Disque intrastaminal. Gynécée isomère ou réduit à 3-1 carpelle, mais généralement 1-loculaire par avortement, à placentation axile, chaque carpelle étant 1-ovules apotropes 2 (-1)-tegminés.

Le fruit est généralement une drupe souvent à mésocarpe résineux. Graine exalbuminée ou presque, à embryon courbe. Pollen divers, souvent 2-3-colporé, ou avec 3-8 ouvertures circulaires ou non. Cloisons des vaisseaux à perforation unique (sauf quelques cas) (Gaussen *et al.*, 1982).

#### **5.1.1. Systématique des Anacardiaceae**

La famille Anacardiaceae a été proposée pour la première fois par Lindley en 1830, les Anacardiaceae appartiennent à l'ordre des Sapindales, à la sous-classe des Rosidae ou Eudicots moyennes dialypétales (plus de 90 000 espèces connues), à la classe des Magnoliopsida ou Eudicots, au sous-embanchement des Magnoliophyta ou Angiospermes et à l'embanchement des Spermaphyte (Guignard & Dupont, 2004). Les espèces de cette famille sont des arbres, des arbustes ou des lianes à feuilles alternes, composées et imparipennées (Arbonnier, 2002) que l'on rencontre surtout dans les régions tropicales à subtropicales et dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord.

#### **5.1.2. Description botanique de l'espèce *Pistacia lentiscus***

Le lentisque est un arbuste sclérophylle à feuilles persistantes, à odeur de résine fortement âcre et à croissance très lente. D'une hauteur de 2m, il peut cependant atteindre la taille d'un arbre lorsqu'il est dans des sites humides et protégés (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003). Cette espèce est classée dans la section de *Eu-Lentiscus* à côté de *P. weinmannifolia* et *P. saportae* (Zohary, 1952). Les feuilles ont une durée de vie de 2 ans (Ain-Lhout *et al.*, 2004) à rachis ailé, paripennées, composées de 2-3 paires de folioles coriaces, vert sombre qui sont largement lancéolées, obtuses au sommet, brillantes au dessus et de taille de 1,5-3 cm.

Les fleurs sont sessiles, composées de 3-5 sépales. Les fleurs mâles étant pourvus de 5 étamines, produisant environ  $47.10^3$ - $61.10^3$  grains de pollen par fleur. Elles sont regroupées en inflorescences de 8-10 fleurs (Jordano, 1989). Les fleurs femelles possèdent un ovaire à trois carpelles uniloculaires, avec un ovule anatrophe uniovulé, surmonté d'un style court à 3 stigmates (Grundwag, 1976). Elles sont regroupées en inflorescences de 4-21 fleurs (Fig. 18).

Le fruit est une drupe de 3-4 mm de diamètre, de forme ovoïde-globuleux et peu comprimé (Grundwag, 1976). Il est de couleur rouge au début puis devient noirâtre à maturité à la fin de la saison hivernale (Verdū & Garcia-Fayo, 1998). Souvent, une part des fruits du lentisque, à l'instar de toutes autres espèces du genre *Pistacia* sont vide soit par avortement des embryons ou par parthénocarpie, variable en fonction des conditions climatiques (Grundwag, 1976).



**Figure 18:** Image de *Pistacia lentiscus* (Kusmenoglu *et al.*, 1995).

#### a. Systématique

La classification admise actuellement est rapportée par Judd *et al.* (2002)

- Règne : Plantae
- Sous Règne : Cormophytes.
- Embranchement : Spermaphytes.
- Sous embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida
- Ordre : Sapindales
- Famille : Anacardiaceae
- Genre : *Pistacia*
- Espèce : *Pistacia lentiscus*

Une étude monographique du pistachier a été réalisée par Zohary (1952) montrant que le genre *Pistacia* comprend 11 espèces à savoir:

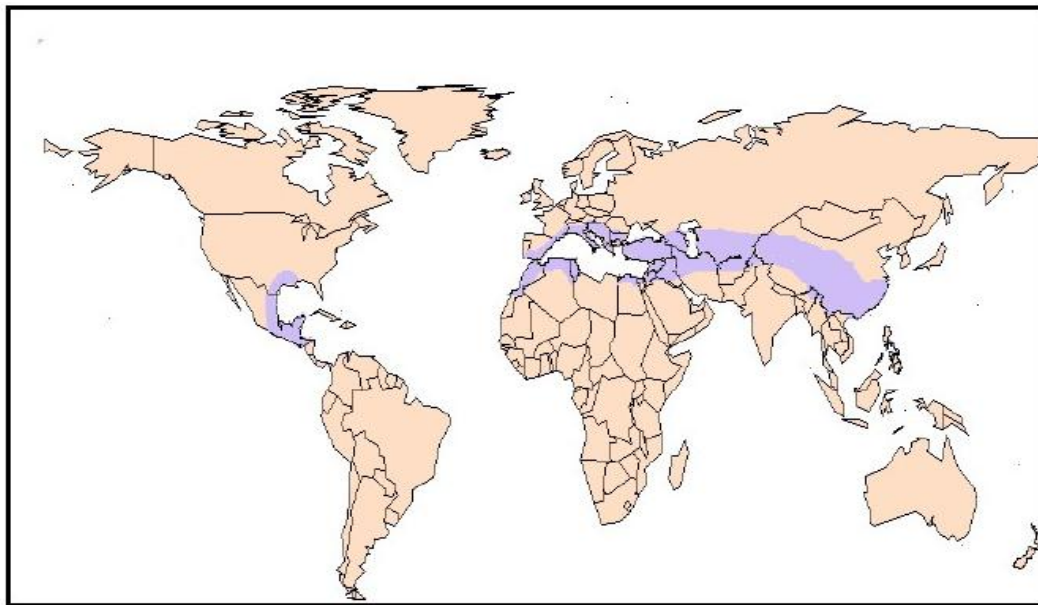
*P. atlantica*, *P. lentiscus*, *P. terebinthus*, *P. vera*, *P. afghanistania*, *P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. mexicana*, *P. palestina*, *P. wienmannifolia* et *P. intergerrima*.

**Nom vernaculaire** (selon Seidemann, 2005)

- Arabe : Darw ضرو
- Anglais : Chios mastic tree
- Français : Arbre au mastic, Lentisque

### b. Répartition géographique

*P. lentiscus* est un arbrisseau que l'on trouve couramment en sites arides d'Asie et la région méditerranéenne d'Europe et d'Afrique, jusqu'aux Canaries (Bellakhdar, 2003). Le pistachier pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. On le retrouve sur tout type de sol dans l'Algérie, subhumide et semi-aride (Smail-Saadoun, 2002), plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Fig.19) (Belhadj, 2000).



**Figure 19:** Distribution géographique de genre *Pistacia* (Mabberley, 1987).

### c. Aspects pharmacologiques et thérapeutiques

*P. lentiscus* est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et

d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Ouelmouhoub, 2005). La partie aérienne de *P. lentiscus* est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (Bentley & Trimen, 1980). Les feuilles ont pourvue d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante. Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, jaunisse, maux de tête, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires (Villar *et al.*, 1987).

La résine obtenue de *P. lentiscus* est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (Abdel-Rahman & Soad, 1975). Par conséquent, cliniquement, le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, diarrhée, infections bactériennes, ulcères gastroduodénaux et comme un agent antiseptique du système respiratoire (Baytop, 1984). En outre, la résine a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate et de l'utérus (Assimipoulou & Papageorgiou, 2005). Ces croyances traditionnelles sont en accord avec de récentes études montrant que mastic de Chios induit l'apoptose (Balan *et al.*, 2005) et dispose d'action anti-proliférateur contre les cellules cancéreuses du côlon (Balan *et al.*, 2007).

L'huile de lentisque est utilisée pour son intérêt médicinal et elle est conseillée pour les asthmatiques, les diabétiques, pour le traitement des douleurs d'estomac et en cas de circoncision (Hmimsa, 2004). En plus, elle est utilisée comme un remède d'application locale externe sous forme d'onguent pour soigner les brûlures (Bensegueni, 2007) ou les douleurs dorsales (Bellakhdar, 1997). En plus, l'huile essentielle de lentisque est connue pour ses vertus thérapeutiques vis-à-vis des problèmes lymphatiques et circulatoires. Des travaux précédents sur les huiles essentielles de *P. lentiscus* ont révélé la présence d'activité antalgique, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne (Giner-Larza *et al.*, 2000).

## 5.2. Description morphologique de la famille des Lamiacées

Plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à tiges généralement quadrangulaires, à feuilles simples, opposées (rarement verticillées). Fleurs en glomérules verticillées ou en épis, elles sont zygomorphes avec un calice à 5 dents ou à 2 lèvres, une corolle à 5 pièces formant 2 lèvres plus ou moins marquées : les lèvres supérieurs indivise parfois absente, l'inférieure en général à 3 lobes plus ou moins égaux, 4 étamines dépassant souvent les fleurs. L'ovaire bicarpellé, à la base duquel est inséré un style dit (gynobasique) comporte primitivement 2 loges, biovulée. Par suite de la formation de fausses cloisons, le fruit est tétrakène inclus dans le calice persistant : la graine est dépourvue d'albumen. Les 2500 espèces des labiées sont surtout répertoriées dans la région méditerranéenne.

Cette famille est très homogène, car au point de vue anatomique, on note la présence de paquets de collenchyme aux 4 angles de la tige, les labiées sont très riches en poils tecteurs et sécréteurs. Beaucoup d'espèces présentent des signes d'adaptation à la sécheresse ; feuilles velues, limbe replié en dessous, hypoderme collenchymateux, stomates enfoncés (ils comportent dans cette famille deux cellules annexes perpendiculaires à la grande dimension de l'ostiole).

Au point de vue biochimique, les labiées sont pour la plupart des plantes aromatiques à huiles essentielles renfermant des constituants variés et c'est à ce titre surtout qu'elles sont médicinales (Paris & Moyes, 1971).

### 5.2.1. Description botanique du genre *Mentha*

La menthe appartient au genre *Mentha* de la famille des Labiacées. On en connaît environ 20 espèces, dont les plus répandues sont la menthe aquatique, qui a pour nom scientifique *Mentha aquatica*, la menthe verte *Mentha spicata* et leur hybride *Mentha piperita*. Ces différentes espèces sont toutes caractérisées par une tige carrée et des feuilles opposées et dentées, très odoriférantes en raison de l'huile essentielle qu'elles contiennent. Cette huile essentielle est extraite par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur. En effet, seuls ces modes d'extraction respectent les composants très fragiles de la plante (Anonyme 1). Les principales espèces du genre *Mentha* sont les suivantes :

**a. *Mentha pulegium* L (flio)**

C'est une plante fertile dont la descendance semble assez homogène, se distingue des autres menthes par son port étiré, ses tiges en partie couchées sur le sol, ses fleurs rosées disposées au long de la tige et des rameaux, et son calice obturé. La plante peut atteindre 30 cm de hauteur (Anonyme 2).



**Figure 20:** *Mentha pulegium*

**b. *Mentha suaveolens* L (Merceta)**

La menthe à feuilles rondes ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes, épaisses. La tige, typique des labiées, est à section carrée. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtre qui la rendent douce au toucher. Les petites fleurs sont rassemblées en épis terminant les rameaux. La hauteur de la plante est de 25 à 80 cm, la fleur est de 5 mm de Long (Anonyme 2).



**Figure 21:** *Mentha suaveolens*

**c. *Mentha spicata* L**

La Menthe verte, encore appelée Menthe douce ou Menthe crépue, est une plante herbacée à feuilles de couleur vert clair, sessiles, lancéolées, dentées ; les fleurs sont disposées en épis allongés et leur coloration est blanche ou pourpre (Paris & Hurabielle, 1981).



**Figure 22:** *Mentha spicata*

**d. *Mentha aquatica* L**

Plante variable, pubescente, aux feuilles pétiolées, ovales, dentées et allongées. Fleurs en capitule terminal arrondi, de couleur rouge à violet clair, plante de 30-80cm (Poul & Ferdinand, 1977).



**Figure 23:** *Mentha aquatica*

**e. *Mentha piperita* L**

Hybride entre la menthe aquatique et la menthe en épi, elle est souvent cultivée (Poul & Ferdinand, 1977).



**Figure 24:** *Mentha piperita*

### 5.2.2. Les différentes espèces de la menthe en Algérie

La menthe comporte une vingtaine d'espèces réparties dans le monde entier, dont plusieurs sont cultivées. Les différentes d'espèces de menthe trouvées en Algérie sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau 04 :** Différents espèces de la menthe en Algérie (Baba Aissa, 1999)

| Variétés         | Espèces  | Appellation locale | Principal constituant |
|------------------|--|--------------------|-----------------------|
| Menthe poivrée   | <i>Mentha piperita</i> L                           | Nàna har           | Menthol               |
| Menthe verte     | <i>Mentha spicata</i> L<br><i>Mentha viridis</i> L | Nàna               | Carvone               |
| Menthe aquatique | <i>Mentha aquatica</i> L                           | H'baquelma         | Linalol               |
| Menthe pouliot   | <i>Mentha pulegium</i> L                           | Fliou              | Pulégone              |
| Menthe sylvestre | <i>Mentha longifolia</i> L                         | Nàna essahra       | -                     |

### 5.2.3. L'utilité de la menthe

La menthe a un effet thérapeutique selon les usages :

#### a. Usage médicinal

La menthe a été utilisée depuis fort longtemps en nature et pour son huile essentielle. C'est ainsi que des archéologues en ont trouvé des feuilles séchées dans des pyramides d'Égypte datant du premier millénaire avant notre ère. De leur côté, Hippocrate et Aristote l'employaient comme anaphrodisiaque (calmant, anesthésiant). La menthe est réputée pour ses propriétés aromatiques (fortifiantes) toniques et digestives (utilisée pour combattre les lourdeurs, les ballonnements, les gaz). L'effet

médicinal de la menthe diffère aussi en fonction des espèces. Ainsi, la menthe poivrée est la menthe médicinale par excellence ; elle stimule la sécrétion des sucs digestifs, limite les ballonnements et les diarrhées et stimule la sécrétion biliaire.

- ✚ En pharmacie, les propriétés stimulantes, toniques, antiseptiques et anesthésiques, sont valorisées en plus de l'action aromatique. Enfin, certains composants des essences de menthe sont utilisés dans des héli-synthèses pour la fabrication de dérivés apparemment plus sophistiqués.
- ✚ Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Elles fortifient tout le système des nerfs, donnant la vigueur aux uns pour l'acuité aux autres pour sentir, mais non pour souffrir, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible, la Menthe rend d'éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses (FAO, 2010).
- ✚ En thérapeutique, la menthe s'utilise contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, la mélancolie, les maladies de poitrines, l'hystérie, les troubles de la vue (Garnier et *al.*, 1961; Fournier, 1984), antiseptique, analgésique et vermifuge. On l'utilise aussi contre les parasites, les tiges et les fleurs de la menthe sont brûlés pour chasser les puces des matelas et des animaux domestiques, on peut aussi placer les sachets de menthe auprès des sacs de grains et de fromage pour chasser les rongeurs (Benayad, 2008).

### **b. Usage alimentaire**

Les menthes doivent leur odeur et leur activité à leurs huiles essentielles qui ont une place particulière dans l'ensemble des produits aromatiques d'origine végétale; grâce à certaines propriétés spécifiques, les besoins en produits de la menthe sont multiples, tant pour leur flaveur (aromatisation) que pour leur odeur (parfumerie), leur pouvoir rafraîchissant ou leurs propriétés médicinales. Leurs qualités sont strictement choisies en fonction de ces usages. Mais c'est en aromatisation que sont consommés les plus gros tonnages : gommes à mâcher, chewing-gum, boissons, confiseries, sirop, chocolats.etc. (FAO, 2010).

### **c. Usage cosmétique et parfumerie**

En parfumerie et cosmétique, les produits à base de menthe ont connu un développement spectaculaire avec les pâtes dentifrices, bain de bouche, crèmes, rouges à lèvres et mousses à raser et (FAO, 2010).



#### 5.2.4. Description botanique du *Mentha spicata*

*M. spicata* est une plante vivace herbacée (hémicryptophyte) très courante dans les jardins, elle peut atteindre 60 cm et même 1m de hauteur. Les tiges de section carrée, robustes sont glabres ou glabrescentes. La plante est pourvue de stolons qui assurent sa multiplication, ce qui peut la rendre envahissante. C'est une plante très aromatique, avec parfois une odeur de moisi.

Le feuillage est habituellement d'un vert profond mais les jeunes feuilles sont souvent plus claires. Ces feuilles opposées sont sessiles ou subsessiles, glabres, ovales-lancéolées et font 2-6 x 0,5-1,5 cm. Leurs bords sont en dents de scie (serretés). Elles portent des glandes (trichomes glandulaires) sécrétant une huile essentielle riche en carvone et pratiquement dépourvue de menthol, donnant une odeur carvonée et fraîche.

Les traits distinctifs sont une face inférieure des feuilles à poils simples majoritaires ou une plante glabre (cultivars parfois échappés) et des feuilles médianes sessiles à limbe ovale ( $L/l=1,5-3$ ) plus ou moins aigu. La pubescence est surtout localisée sur les nervures à la face inférieure et formée de poils simples, dressés, mêlés de poils crépus-laineux.

Les fleurs sont généralement rosées, voire blanches. Elles sont disposées en longs épis terminaux, denses de 4 à 10 cm, formés de verticilles de fleurs (à intervalles assez espacés à la base) sous-tendues par des bractées, linéaires-lancéolées. Le calice est en tube, glabre, pourvu de 5 dents linéaires, parfois ciliées. La corolle, glabre en dedans, est pourvue de 4 lobes presque égaux en forme d'entonnoir. La lèvre supérieure est formée par les 2 pétales dorsaux. La corolle enferme 4 étamines divergentes, presque égales et saillantes et 2 carpelles ovoïdes (anonyme 1).

##### a. Systématique

La classification admise actuellement est d'après Quézel et Santa (1963).

- Règne : Plantes.
- Sous Règne : Cormophytes.
- Embranchement : Spermaphytes.
- Sous embranchement : Angiospermes.
- Classe : Dicotylédones
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Mentha*

- Espèce : *Mentha spicata*

**Nom vernaculaire** (selon Seidemann, 2005).

- Arabe : naânaâ نَعْنَاع
- Anglais : spearmint
- Français : la Menthe en épi ou menthe verte

## **b. Usages**

### **i.Boissons**

Utilisée en tisane et en infusion, la feuille de menthe verte a une place de choix dans la culture du Maghreb. En effet, le fameux thé à la menthe est concocté en laissant infuser du thé vert avec environ 100 feuilles de menthe fraîche par litre et beaucoup de sucre. Le cultivar *Mentha spicata* est généralement utilisé ; il se caractérise par un arôme piquant mais doux. Cette appellation se retrouve dans le nom en arabe standard moderne du thé à la menthe. Les feuilles sont utilisées dans des boissons, comme le cocktail mojito de Cuba, fait de rhum, citron vert et menthe fraîche.

### **ii.Culinares**

Les feuilles de menthe en épi sont également utilisées dans de nombreuses applications culinaires, comme avec des plats à base de viande, des sauces pour le gigot ou le rôti de bœuf, des plats asiatiques (anonyme 3).

### **iii.Médicinaux**

En herboristerie, les menthes sont toniques, stimulantes et antispasmodiques. La menthe verte est traditionnellement utilisée pour ses propriétés aromatiques (toniques, fortifiantes), digestives (combat les lourdeurs, les ballonnements, les gaz) et antispasmodiques (nervosité, palpitations, crampes) (Lieutaghi, 1966).

### **iv.L'huile essentielle**

Est utilisée pour la fabrication de boissons, de confiserie, de glaces et pour aromatiser les chewing-gums ou les dentifrices (anonyme 4).

# CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Matériel végétal

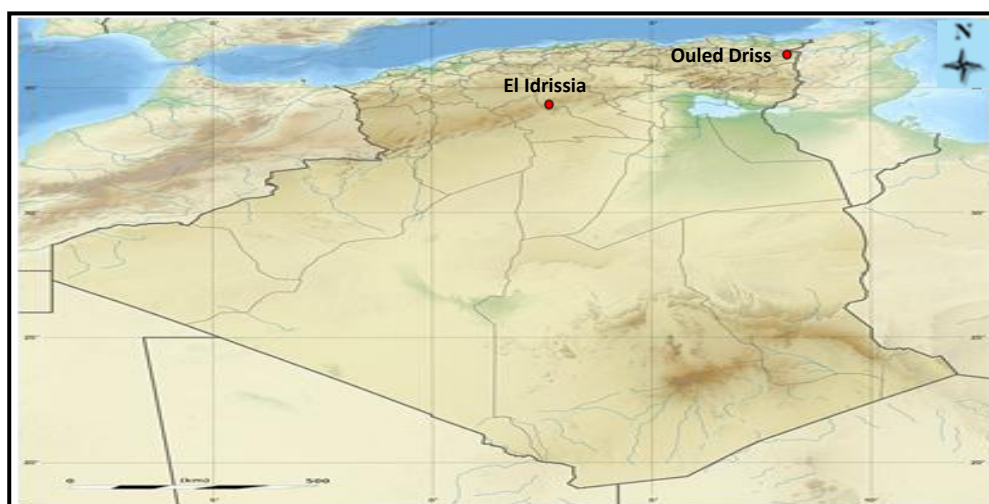
Les plantes qui ont fait l'objet de notre étude sont *M. spicata* connue par le nom Nanä et *P. lentiscus* connue sous le nom Darw, dont on a utilisé les parties aériennes. La récolte de nos échantillons a été effectuée durant le mois de mai de l'année 2013, Au niveau de la région d'El-idrissia (Djelfa) pour *Mentha spicata* et d'Ouled Driss (Souk ahras) pour *Pistacia lentiscus*.

Les deux espèces étudiées ont été identifiées par **Pr. Laouar A**, laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles, faculté des sciences; UFA - Sétif, Algérie. Après la récolte et le nettoyage des échantillons, ils ont été laissés sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré.

Les situations géographiques ainsi que les étages bioclimatiques des deux stations sont représentés dans le tableau 05 et la figure 25.

**Tableau 05:** Caractéristiques géographiques et bioclimatiques des deux régions de récolte (anonyme 5).

| Région      | Altitude | Latitude | Longitude | Etage bioclimatique  |
|-------------|----------|----------|-----------|--|
| Ouled Driss | 800 m    | 36.35° N | 8.01° E   | Un climat semi-humide se distingue par un été chaud et un hiver froid et humide; la pluviométrie atteint une moyenne de 800 mm/an. |
| El-Idrissia | 1140 m   | 34.26° N | 2.31° E   | Un climat semi-aride caractérisé par une faible précipitation (pluviométrie de 266 mm/an).   |



**Figure 25:** Situation géographique des deux stations d'étude (anonyme 5).

### 1.1. Screening phytochimique

Ce test a pour but d'identifier les différents groupes de composés présentés dans les deux plantes, un screening chimique a été réalisé. La colorimétrie et la gravimétrie ont été les deux principales voies d'identification de ces groupes de substances en solution. Les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanes, leucoanthocyanes, les tanins, les terpènes et stérols contenus dans la plante ont été mis en évidence selon les méthodes décrites par Harborne (1998).

Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration.

#### 1.1.1. Recherche des principes actifs dans l'infusé

##### a. Préparation de l'infusé

La préparation de l'infusé à 10% nécessite une quantité de 10 g de la partie aérienne de la plante (feuilles) séchée et broyée en poudre. Celle-ci est versée dans 100 ml d'eau bouillante et mélangée puis on passe à la filtration juste après 15 min d'attente.

##### b. Les tanins

Les tannins catéchiques, non hydrolysables, sont identifiés à l'aide du réactif de Stiasny (Formol 30%/HCl concentré : 3-1). 5 ml de l'infusé ont été évaporés à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité orange caractérise les tanins catéchiques.

Les tannins galliques, hydrolysables, sont mis en évidence par ajout de  $\text{FeCl}_3$ . En effet, nous avons filtré la solution précédente puis la saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 2% provoque l'apparition d'une teinte bleu-noire intense dénotant la présence de tanins galliques.

##### c. Les anthocyanes

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10%. Si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification (après ajout d'HCl pur) puis vire au bleu en milieu basique par addition de 3 gouttes de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 50%, on peut conclure la présence des anthocyanes.

#### d. Les leuco-anthocyanes

Les leuco-anthocyanes sont révélés par ajout à 05 ml d'infusé de 04 ml d'alcool chlorhydrique (Ethanol/HCl pur : 3-1). Après quelques minutes de chauffage au bain-marie à 50°C, L'apparition d'une coloration rouge (rouge cerise) est caractéristique de leur présence.

#### e. Les saponosides

La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse ; degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Un décocté à 2 % est préparé avec 2 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante et maintenir une ébullition pendant 30 minutes.

A partir de cette solution mère on prépare 10 tubes de 1-10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min en position verticale. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides. L'indice de mousse (I) est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } X^{\text{ème}} \times 5 / 0,0X$$

**X** : Numéro du tube renfermant la mousse la plus haute

La présence des saponines dans la plante est confirmée par un indice supérieur à 100.

### 1.1.2. Recherche des principes actifs dans la poudre

#### a. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, pigments quasiment universels des végétaux, constituent une grande famille de composés très souvent abondamment présents dans les plantes. Plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence ce groupe de substances.

10 g de feuilles pulvérisées ont été macérées dans 150 ml d'HCl à 1% pendant 24 h. Ajouter le NH<sub>4</sub>OH au 10 ml du filtrat pour rendre la solution basique. L'apparition d'une couleur jaune claire après 3h dans la partie supérieure du tube montre la présence des flavonoïdes.

#### b. Les alcaloïdes

La présence des alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du réactif du de Mayer (5g de KI + 1,358g de HgCl<sub>2</sub> solubilisés dans 100 ml

d'eau distillé). A 5 g de poudre ajouter 50 ml d'HCl à 1%. Après 3 heures de macération à température ambiante, le macéré a été filtré. Prélever 1 ml de filtrat y ajouter 5 gouttes de réactif. La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité blanc.

### **c. Terpènes et stérols**

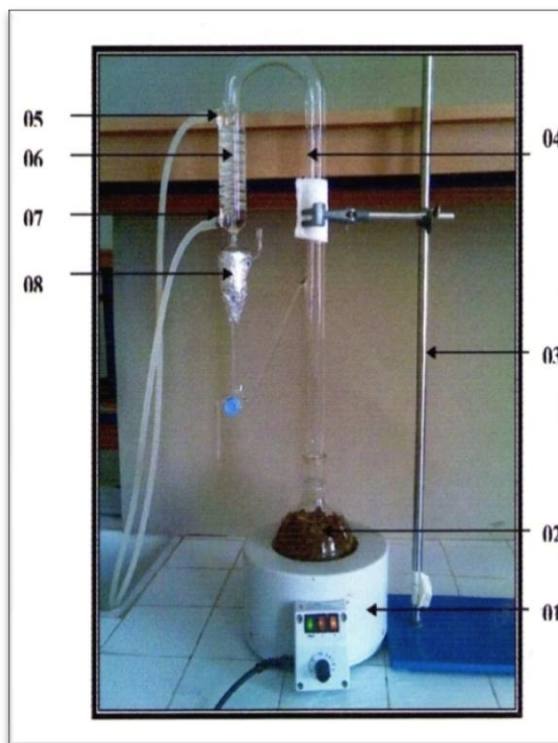
Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, nous avons utilisé le réactif de Liebermann. En effet, 5 g de poudre des feuilles ont été macérés dans 20 ml d'éther de pétrole, filtrés puis évaporés à sec dans un bain de sable à 90°C. Le résidu est trituré à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique. Nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

## **1.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation**

La figure 26 montre l'hydrodistillateur de type Clevenger employé dans l'extraction des huiles essentielles.

La matière végétale (50 g), constituée des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries) d'espèces étudiées, est introduite dans un ballon de 1 L rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de sa capacité. Ce dernier est ensuite mis à ébullition pendant 3 heures. Sous l'action de la chaleur, les cellules sécrétrices de l'huile essentielle éclatent et libèrent des composés organiques volatils. La vapeur d'eau formée entraîne avec elle les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant où ils se condensent sous forme de gouttelettes. A fin de séparer les deux phases organique et aqueuse, le distillat a été mis dans une ampoule à décanter et un solvant organique (éther di-éthylique) a été ajouté. Après que les deux phases soient bien distinctes l'une de l'autre, la phase organique a été récupérée pour passer à l'évaporation rotative. L'huile essentielle, séparée du solvant organique par évaporateur rotatif, a été déshydratée par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhydre, puis conservée à 4°C dans un flacon stérile, hermétiquement fermé et à l'abri de la lumière.

- 01- Chauffe ballon
- 02- Ballon à fond rond
- 03- Support de fixation
- 04- Colonne en verre
- 05- Sortie de l'eau
- 06- Refrigerant
- 07- Entrée de l'eau
- 08- Distillat (eau + huile essentielle)



**Figure 26:** Montage de l'hydrodistillation type Clevenger

### 1.2.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction d'huile essentielle (HE) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée ( $M_{HE}$ ) et la masse de la matière végétale ( $M_v$ ) séchée à l'air libre, exprimées dans la même unité de masse. Le rendement en HE exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante:

$$R\% = (M_{HE} / M_v) \times 100$$

### 1.2.2. Analyse des huiles essentielles par chromatographie CPG-SM

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée par un chromatographe de type Agilent 6890N couplée à un spectromètre de masse Agilent 5975B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La séparation a été réalisée sur une colonne HP-5MS pour *Mentha* et HP-INNOWax pour *Pistacia*, de diamètre 30 m x 0,25 mm et 0,25  $\mu$ m d'épaisseur de film. Le gaz vecteur était le Helium utilisant un mode d'injection splitless et le volume injecté était 1  $\mu$ l dilué dans hexane à 1%. La température du four était programmée de 60°C pour 8 min, puis progressée jusqu' à 270°C à 2°C/min. Le chromatographe était couplé à un détecteur de masse à simple quadripôle MSD 5975.



La température de l'interface était de 280°C, celle du quadripôle de 150°C et celle de la source de 230°C.

L'identification des constituants a été faite sur la base de comparaison de leurs Indices Arithmétique (IA) obtenu à partir d'une série de n-alcanes (C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>) en utilisant l'équation de Van den Dool and Kratz (1963) ; et le spectre de masse avec ceux des composés de référence selon la littérature (Dob *et al.*, 2006; Adams, 2007; anonyme 6) et ceux figurant dans la banque de donnée (Wiley/NBS library).

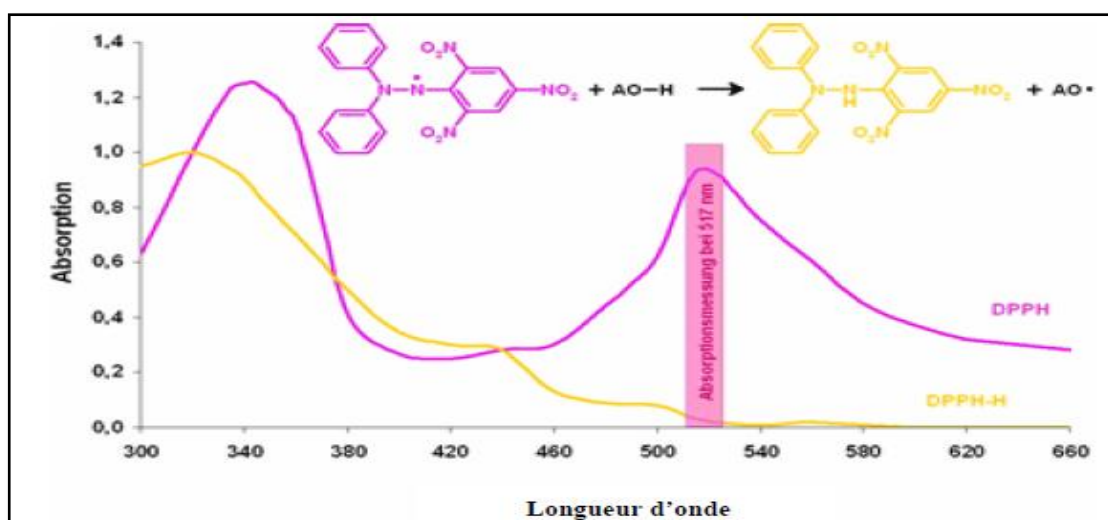
## 2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par quatre techniques chimiques (le piégeage du radical libre DPPH•, le piégeage du radical superoxyde, la réduction du fer et du radical ABTS). Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec deux contrôles positifs (BHT et Vit C).

### 2.1 Test au DPPH•

- Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH• (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2-Diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (Fig. 27).



**Figure 27:** Schéma de transformation du DPPH• de sa forme active à celle inactive (Matkowski, 2008).

- **Mode opératoire**

L'activité antiradicalaire des huiles essentielles a été mesurée par la méthode décrite par Dung et al. (2008). 100 µl de différentes dilutions (62.5, 125, 250, 500 and 1000 µg/ml) d'huiles essentielles sont mélangés avec 2.9 ml de la solution de méthanol de DPPH• à concentration 0.004% (p/v) dans des tubes à essai secs. Après 30 min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517nm.

Les contrôles positifs sont représentés et mesurés dans les mêmes conditions et par la même méthode que celle de l'huile essentielle. Selon Dung et al. (2008), les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où inhibition des radicaux libres en pourcentages (PI%) en utilisant la formule suivante:

$$PI\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle, de la vitamine C et du BHT, nous permet de calculer le paramètre CI<sub>50</sub>. La CI<sub>50</sub> «Concentration Inhibitrice» est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (de la vitamine C ou de BHT) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Plus la valeur de CI<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antiradicalaire est élevée (Gramza *et al.*, 2005; Qian & Nihorimbere, 2004). Les valeurs de la CI<sub>50</sub> ont été déterminées graphiquement.

## 2.2. Test de réduction du radical-cation ABTS<sup>+</sup>

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS<sup>+</sup>, acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de 7 mM de solution ABTS incolore avec 2.45 mM de solution persulfate de potassium. Le mélange doit être conservé à l'obscurité pendant 12<sup>h</sup>-16<sup>h</sup> et dilué pendant la manipulation avec l'éthanol pour avoir une absorbance de 0.70 ± 0.02 à 734 nm. 200 µl de l'huile à tester à concentration de 1 mg/ml sont ajoutés à 2 ml de radical pré-formé et, 6 minutes après, l'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>+</sup> est mesurée à 734 nm. L'activité d'huile essentielle est alors exprimée par la Capacité

Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (Re *et al.*, 1999).

### 2.3. Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'une solution comme les huiles essentielles est déterminé par le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). 1.0 ml d'extrait à concentration de 1 mg/ml est mélangé avec 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [ $K_3Fe(CN)_6$ ] à 1%. Après incubation à 50°C pendant 20 min, la réaction est arrêtée par l'ajout de 2.5 ml d'acide trichloroacétique (10%). Ensuite, la mixture est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant sont mélangés avec 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de  $FeCl_3$  (0.1%). Après incubation de 10 min, l'absorbance est lue à 700 nm. Le pouvoir réducteur est calculé à partir de la gamme étalon de l'acide gallique et exprimé en  $\mu g$  équivalent acide gallique/g d'extrait sec (Oyaizu, 1986).

### 2.4 Test antiradicalaire (NBT/Riboflavine)

L'effet scavenger du radical superoxyde a été mesuré par la méthode décrite par Beyer et Fridovich (1987) avec quelques modifications. 100  $\mu l$  de différentes dilutions d'huiles essentielles sont ajoutés à 1 ml de mixture contenant un tampon phosphate (67 mM  $KH_2PO_4$ , 0.1 M EDTA, pH 7.4), 0.12 mM Riboflavine (RF) et 1.5 mM Nitrobleu de Tétrazolium (NBT). Laisser les échantillons 10 min sous une lampe de bureau puis lire immédiatement l'absorbance à 560 nm.

Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé selon l'équation suivante:

$$PI\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc.

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration nous permet de calculer le paramètre  $CI_{50}$ .

Tous les essais précédents ont été effectués en triple où l'acide ascorbique et le BHT ont été servis comme contrôles positifs.

### 3. Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO NPs)

#### 3.1. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission

La forme et la taille de NiO NPs ont été caractérisées par un microscope électronique à transmission (MET, JEM-2100F, JEOL Inc., Japon) disposant d'une tension d'accélération de 120 kV et une résolution de l'ordre du nanomètre. L'appareil est enfin équipé d'une caméra haute résolution. En effet, La poudre noire de NPs a été mise en suspension dans l'eau déminéralisée à une concentration de 1 mg/ml. La solution subit ensuite une sonification (40 W) dans un bain à ultrasons pendant 15 min à température ambiante. 10 µl d'une solution diluée de particules à 1/10, dans l'eau déminéralisée ou dans le milieu de culture, sont déposés sur une grille de cuivre recouverte d'un film de formvar (Mesh 200) puis laissés sécher à l'air pour permettre leur observation par microscopie électronique en transmission.

#### 3.2. Comportement des nanoparticules en solution

La toxicité des NPs vis-à-vis de cellules ou d'organismes vivants est le plus souvent testée en milieu humide. Dans le cas des cellules, les expositions sont réalisées via le milieu de culture dans lequel les cellules baignent. Il est donc fondamental d'avoir une idée du comportement de ces objets non seulement en solution mais aussi dans ce milieu spécifique. C'est ce que nous allons aborder dans les deux sous-titres suivants.

##### 3.2.1. Détermination du potentiel Zêta

- **Principe**

Une particule chargée se déplace à vitesse fixe dans un liquide lorsqu'un champ électrique est appliqué. Le déplacement des particules appelé « mobilité » peut être quantifié par la technique de micro-électrophorèse c'est-à-dire le couplage entre observation directe (microscopie) et déplacement de particules en suspension sous un champ électrique (électrophorèse). La technique consiste à suivre le déplacement de particules induit par un courant électrique grâce à une caméra numérique.

- **Mesures de potentiel Zêta**

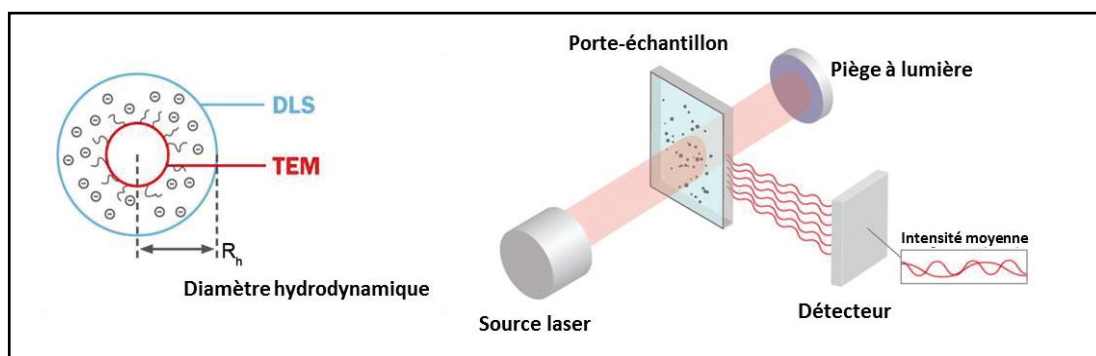
Le potentiel Zêta a été estimé à l'aide d'un Nano-ZetaSizer (Nano-ZetaSizer-ZS, Malvern Instruments, RU). Les particules sont dispersées dans l'eau déminéralisée avec une concentration de 100 µg/ml. La solution subit ensuite une ultra-sonification

et analyser dans le Nano-ZetaSizer. Dans le cas de l'analyse du potentiel Zêta en milieu de culture, l'eau a simplement été remplacée par le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).

### 3.2.2 Evaluation du diamètre hydrodynamique

- **Principe de la diffusion dynamique de la lumière**

La technique de diffusion dynamique de la lumière « Dynamic Light Scattering » (DLS) mesure le mouvement Brownien d'une particule et remonte mathématiquement à son diamètre hydrodynamique. Le diamètre hydrodynamique correspond au diamètre de la particule ainsi que de la bicouche électronique qui adhère à sa surface. Cette mesure est effectuée en illuminant les particules avec un laser et en analysant les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée (Fig. 28).



**Figure 28:** Description du diamètre hydrodynamique et principe de la DLS (Le Trequesser, 2014).

Les mesures de diamètre hydrodynamiques (DH) en solution renseignent sur les états d'agrégation des NPs. Généralement, la distribution en taille de particules est donnée en intensité, en volume et en nombre. Les mesures en volume dépendent naturellement du volume des particules et les mesures en intensité dépendent de la surface exposée par celles-ci. Dans notre cas, la mesure en nombre est donc la mieux adaptée et sera utilisée pour évaluer les états d'agrégation.

- **Mesures de diamètre hydrodynamique**

Les NPs ont été dispersées dans l'eau déminéralisée ou dans le milieu de culture avec une concentration de l'ordre de 100 µg/ml. Quelques gouttes sont ensuite déposées sur la cuve d'un analyseur de taille de particule de type Nano-ZetaSizer et 3 mesures de 30 secondes sont effectuées. Le résultat « en nombre » est enfin conservé.

## 4. Cultures cellulaires et protocoles d'exposition aux NiO NPs et aux huiles essentielles

### 4.1. Cultures stocks des pneumocytes A549

Nous avons utilisé dans cette étude une lignée cellulaire de pneumocytes II: A549 provenant d'un adénocarcinome pulmonaire humain. Tous les produits chimiques ont été obtenus de Sigma-Aldrich.

Le milieu employé est du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Ce milieu de base contient des nutriments indispensables à la survie cellulaire, des ions minéraux, des cofacteurs, des vitamines, des acides aminés et surtout du glucose (substrat énergétique essentiel). Il est supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) qui apporte les facteurs de croissance indispensables et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine 100 U/ml) pour éviter d'éventuelles proliférations bactériennes. Cela constitue le milieu de culture complet.

Les subcultures ont été réalisées deux fois par semaine pour cette lignée qui proliférait rapidement. A confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS sans calcium ni magnésium ce qui permet de supprimer toute trace d'inhibiteurs de trypsine. Le détachement des cellules en vue de leur passage est réalisé en utilisant l'action conjuguée de trypsine (0,5 mg/ml) et d'EDTA (0,2 mg/ml) à 37°C pendant 5 min. Des aliquotes de cette suspension cellulaire, contenant  $10^6$  cellules comptées sur Malassez, étaient prélevés et remis en culture dans de nouveaux flacons de culture puis incubés à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> à 5%. Les cultures cellulaires ont été observées chaque jour, car il était important de suivre l'évolution de la culture jusqu'à la confluence afin de déterminer le moment du repiquage.

### 4.2. Numération cellulaire en présence de trypan bleu

Le nombre total de cellules mortes et vivantes a été déterminé par comptage après coloration au trypan bleu. Ce dernier est un réactif chromophore de couleur bleu chargé négativement qui a tendance à pénétrer dans les cellules. Une fois dans la cellule, la molécule va être rejetée dans le milieu extérieur. Ce mécanisme d'exclusion nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant de l'ATP peuvent le réaliser. Ainsi, une cellule vivante exclura la molécule de trypan bleu et restera réfringente au microscope alors qu'une cellule morte sera colorée en bleu.

La coloration au trypan bleu a été réalisée en prélevant 25 $\mu$ l de suspension cellulaire mis en présence de 25  $\mu$ l de la solution de trypan bleu. Le comptage a été réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez.

#### 4.3. Traitement des cultures

Des concentrations croissantes de NiO NPs (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g/ml dans le milieu de culture) ont été testées afin de définir les concentrations seuils cytotoxiques qui induisaient une inhibition de la prolifération cellulaire. Les dilutions étaient ensuite soumises à une sonication en utilisant un bain à ultrasons à température ambiante pendant 10 min à 40W pour éviter l'agglomération de nanoparticules avant les administrer aux cellules. NiO NPs ont été ajouté à la culture 24 heures après l'ensemencement, afin de permettre aux cellules de s'attacher sur le fond du flacon.

D'autre par, les cellules ont été aussi traitées avec les huiles essentielles à concentration de 10, 40 et 60, 80  $\mu$ g/ml, la menthe et le pistachier respectivement, 24 heures avant l'exposition aux NiO NPs. Les huiles essentielles ont été dissoutes dans le DMSO et diluées dans le milieu de culture (la concentration finale de DMSO dans le milieu était < 0,3 %).

#### 5. Méthode d'évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT

Le test MTT donne une indication sur l'activité mitochondriale et la densité cellulaire. Le principe de ce test consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT (3 [4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromure), de couleur jaune, en cristaux de formazan de couleur pourpre et insoluble. La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan causant ainsi leur accumulation intracellulaire. L'addition d'un détergent solubilise les cristaux de formazan. L'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale permet d'apprécier la toxicité cellulaire mitochondriale qui est directement corrélée avec la viabilité cellulaire mais aussi avec la densité cellulaire (Fig.29).

1 $\times$ 10<sup>4</sup> cellules/puits ont étéensemencées dans des microplaques de 96 puits et exposées au NiO NPs ou/avec les huiles essentielles à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. Après 24h

d'incubation, le milieu de culture a été enlevé de chaque puits pour éviter toute interférence des nanoparticules et remplacé par un nouveau milieu et la solution MTT (5mg/ml). En suite, il suffit après l'incubation des cellules en présence ou non des composés à tester avec du MTT pendant 3h à 37 °C de dissoudre les cellules, leurs mitochondries et donc les précipités de Formazan violets dans du DMSO. Un simple dosage de la densité optique à 570 nm (et éventuellement soustraire l'absorbance du bruit de fond mesurée à 690 nm) par spectrophotométrie en utilisant un lecteur de microplaque (Thermo scientifique) permet de connaître la quantité de cellules vivantes (Mossman, 1983). L'activité succinate déshydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles:

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

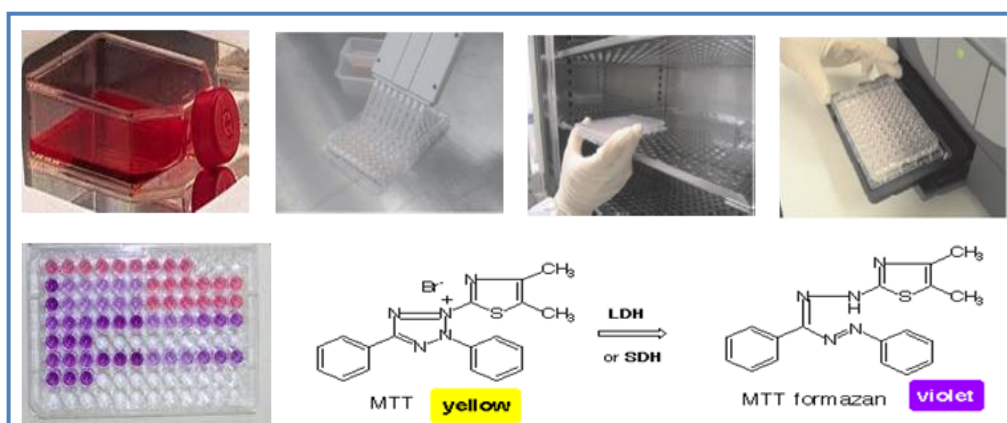


Figure 29: Etapes et principe du test MTT

## 6. Evaluation de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène et de l'azote par coloration avec H<sub>2</sub>DCFDA

La production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERN) a été quantifiée selon le protocole décrit par Wang (1999). Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H<sub>2</sub>DCFDA) est utilisé pour doser *in situ* les ERO tel OH<sup>•</sup> et ROO<sup>•</sup> et les ERN tel que NO<sup>•</sup> et ONOO<sup>•</sup>. Cette sonde pénètre dans la cellule où elle sera clivée par les estérases intracellulaires en 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine (H<sub>2</sub>DCF) qui une fois oxydé par une variété des ERO et des ERN donne naissance à la molécule fluorescente 2',7'- dichlorofluorescein (DCF) (Fig.30).

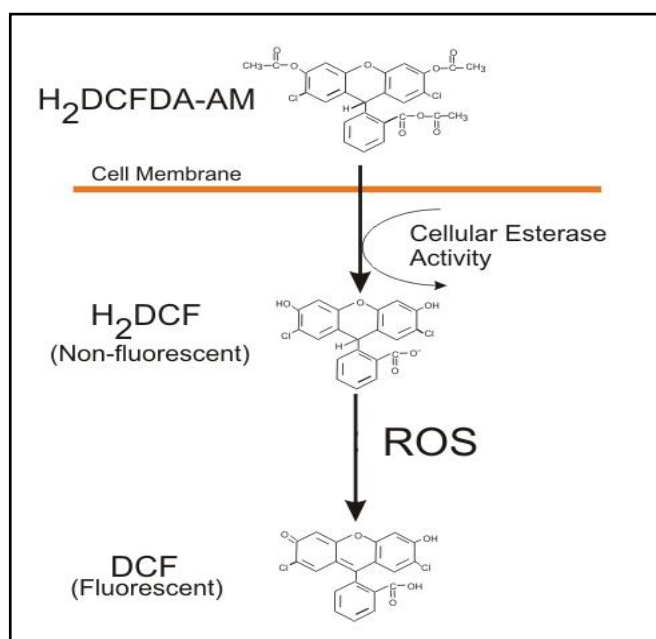


Une solution mère de DHFC-DA à 10 mM (5 mg dans 1 ml de méthanol) a été diluée dans un tampon HBSS pour obtenir une solution de 40 µM. Après 24 h d'exposition des cellules aux NiO NPs ou/avec les huiles essentielles dans des microplaques noires de 96 puits, les cellules ont été lavées deux fois avec HBSS puis incubées à l'obscurité en 200 µl de la solution de travail (DHFC-DA/milieu de culture : 1-1) à 37° C pendant 30 min. À la fin de la période d'incubation, les cellules sont lavées avec le tampon HBSS et y laissées.

La fluorescence a été mesurée par un lecteur de microplaque (Thermo scientifique), sachant que le DCF s'excite à 494 nm et émet dans le vert à 517 nm. Des cellules exposées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant une demi-heure ont été servies comme contrôle positif. Les valeurs ont été exprimées en pourcentage d'intensité de fluorescence par rapport aux puits témoins.

$$\text{Intensité de fluorescence (\%)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO contrôle}} \times 100$$

Pour l'imagerie fluorescence, les cellules ont été cultivées dans des microplaques de 12 puits et les images ont été prises par un microscope à fluorescence (Olympus IX73).

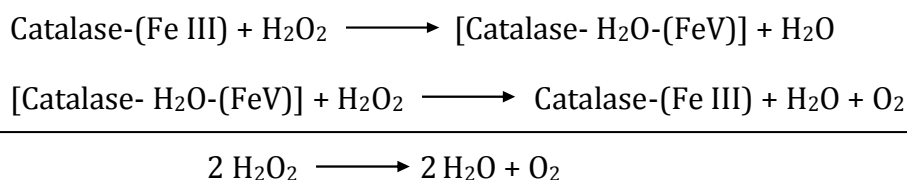


**Figure 30:** formation de la molécule fluorescente DCF par les ERO (Held & Newick, 2009)

## 7. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

- **Principe**

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



Le principe du dosage de l'activité catalase repose sur la réaction du réactif OxiRed avec  $H_2O_2$  n'ayant pas réagi en présence de peroxydase du raifort noir (HRP) pour produire un produit d'oxydation fortement fluorescent, la résorufine. Une forte activité catalase se traduit donc par une petite quantité de résorufine formée (fiche technique Bio-Vision Inc).

- **Les réactifs utilisés**

| Composants                   | Volume | Code       |
|------------------------------|--------|------------|
| Tampon du test catalase      | 25 ml  | K773-100-1 |
| OxiRed™ sonde (dans le DMSO) | 200 µl | K773-100-2 |
| HRP (lyophilisé)             | 1      | K773-100-4 |
| $H_2O_2$ (0.88M)             | 25 µl  | K773-100-5 |
| Solution d'arrêt             | 1 ml   | K773-100-6 |
| Contrôle positif de catalase | 2 µl   | K773-100-7 |

### Reconstitution de réactifs

**OxiRed™ sonde** : chauffer rapidement pour dissoudre complètement la solution de DMSO. Conserver à 4° C à l'abri de la lumière. Utiliser dans les deux mois.

**HRP** : Dissoudre dans 220 µl de tampon.

**Contrôle positif** : Ajouter 500 µl de tampon au contrôle positif.

**NB**: garder les échantillons, HRP et la Catalase dans la glace pendant la manipulation.

- **Mode opératoire**

### **Échantillon et préparation de contrôle positif**

Homogénéiser  $10^6$  cellules dans 0,2 ml de tampon froid ; centrifuger à 10 000 x g pendant 15 min à 4° C ; recueillir le surnageant de dosage, garder le dans la glace.

Ajoutez de 2-78  $\mu$ l d'échantillons ou de 1-5  $\mu$ l de contrôle positif dans chaque puits et ajuster le volume à 78  $\mu$ l avec le tampon.

Préparer le haut contrôle (HC) avec le même volume d'échantillon dans des puits séparés puis porter le volume total à 78  $\mu$ l avec du tampon.

Ajouter 10  $\mu$ l de la solution d'arrêt dans le HC, mélanger et incubé à 25° C pendant 5 min pour inhiber complètement l'activité de la catalase dans les échantillons HC.

### **La courbe d'étalonnage d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Diluer 5  $\mu$ l de 0,88 M d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans 215  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O pour générer 20 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ensuite prenez 50  $\mu$ l de 20 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la diluer dans 0,95 ml d'H<sub>2</sub>O pour générer 1 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ajouter 0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ l de la solution 1 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans une microplaque de 96 puits pour générer de 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/puits d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Compléter le volume final à 90  $\mu$ l avec le tampon. Ajouter 10  $\mu$ l de la solution d'arrêt dans chaque puits.

**NB**: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluée est instable, préparer chaque fois des dilutions fraîches.

### **Réaction catalase**

Ajouter 12  $\mu$ l de frais 1 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans chaque puits (échantillons, contrôle positif et le HC) pour démarrer la réaction, incubé à 25° C pendant 30 min, puis ajouter 10  $\mu$ l de la solution d'arrêt dans chaque échantillon (échantillons, contrôle positif ; ne pas au HC) pour arrêter la réaction (NB : le HC et les échantillons de la courbe d'étalonnage renfermant déjà la solution d'arrêt).

### **Révéléteur**

Pour chaque puits, préparer un révélateur de 50  $\mu$ l contenant : 46  $\mu$ l du tampon + 2  $\mu$ l de sonde OxiRed™ + 2  $\mu$ l de la solution HRP.

Ajouter 50  $\mu$ l de révélateur aux échantillons, contrôles et aux standards. Bien mélanger puis incubé à 25° C pendant 10 min. Lire l'absorbance à 570 nm dans un lecteur de microplaque.

- **Calcul**

Le changement du signal par la catalase dans l'échantillon est :

$$\Delta A = AHC - AEcht.$$

AHC est l'absorbance de l'échantillon de haut contrôle, AEcht est l'absorbance de l'échantillon dans 30 min. Tracer la courbe d'étalonnage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Appliquer le  $\Delta A$  à la courbe pour obtenir B (nmol) d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposée par la catalase en 30 min. L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité catalase} = \frac{B}{30 \times V} \times \text{facteur de dilution (nmol/min/ml = mU/mL)}$$

B : la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposée (en nmol)

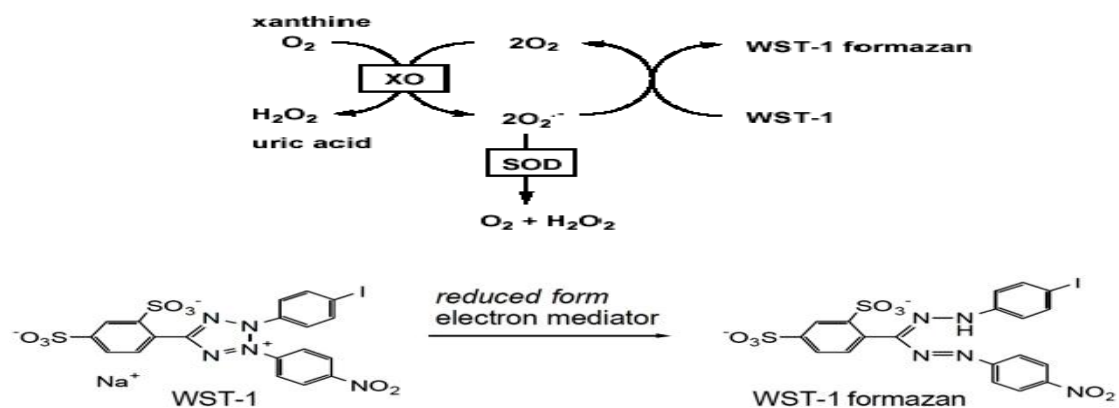
V : le volume prétraité d'échantillon ajouté dans chaque puits (en ml).

30 : le temps de réaction 30 min.

## 8. Détermination de l'activité SOD

- **Principe**

La superoxyde dismutase (SOD) est l'une des plus importantes antioxydantes enzymes. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en eau oxygénée et en oxygène moléculaire. Le principe de dosage repose sur l'utilisation du sel de tetrazolium WST-1, hautement soluble dans l'eau, et qui produit un colorant formazan hydrosoluble suite à sa réduction avec les anions superoxydes. Le taux de la réduction de WST-1 avec O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est lié à l'activité de la xanthine oxydase (XO) qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique et génère des O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans le milieu. La réduction de WST-1 est inhibée par la SOD ce qui permet de doser l'activité de celle-ci par méthode colorimétrique (fiche technique Bio-Vision Inc).



**Figure 31:** principe de dosage de l'activité SOD

• Les réactifs utilisés

| Composants             | Volume | Code       |
|------------------------|--------|------------|
| WST solution           | 1 ml   | K335-100-1 |
| Solution d'enzyme SOD  | 20 µl  | K335-100-2 |
| Tampon du test SOD     | 20 ml  | K335-100-3 |
| Tampon de dilution SOD | 10 ml  | K335-100-4 |

**Réactifs de travail**

**Solution de travail WST:** diluer 1 ml de la solution WST en 19 ml de tampon du test.

**Solution de travail d'enzyme :** centrifuger pendant 5 seconds l'enzyme, bien mélanger par pipetage. Diluer 15 µl avec 2.5 ml du tampon de dilution.

**Préparation d'échantillon**

Lyser, à froid pendant 20 min, les cellules dans un 1 ml de tampon froid Tris/HCL (0.1 M, pH 7.4) contenant 0.5% Triton-X, 0.5 mM β-ME et 0.1 mg/ml PMSF. Centrifuger le lysat des cellules à 14000×g pendant 5 min à 4°C, éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contient l'activité totale de SOD cytosolique et mitochondriale.

• **Mode opératoire**

|  | Echantillon | Blanc 1 | Blanc 2 | Blanc 3 |
|--|-------------|---------|---------|---------|
| <b>Solution d'échantillon</b>          | 20 µl       |         | 20 µl   |         |
| <b>H<sub>2</sub>O double distillée</b> |             | 20 µl   |         | 20 µl   |
| <b>Solution de travail WST</b>         | 200 µL      | 200 µL  | 200 µl  | 220 µl  |
| <b>Solution de travail d'enzyme</b>    | 20 µl       | 20 µL   |         |         |
| <b>Tampon de dilution</b>              |             |         | 20 µL   | 20 µL   |

- Mélanger et Incuber la microplaque à 37°C pendant 20 min.
- Lire l'absorbance à 450 nm dans un lecteur de microplaque.
- Calculer l'activité SOD (taux d'inhibition %) par la formule suivante:

$$\text{Activité SOD (\%)} = \frac{(\text{Ablanc1} - \text{Ablanc3}) - (\text{AEcht} - \text{Ablanc2})}{(\text{Ablanc1} - \text{Ablanc3})} \times 100$$

## **9. Exploitation statistique des résultats**

Les résultats sont représentés sous forme de Moyenne  $\pm$  SEM et ils ont été effectués à l'aide d'analyse de la variance suivis par le test « t » de Student grâce au logiciel MINITAB (version 13.31). Les différences sont considérées comme significatives si  $p \leq 0.05$ .

## CHAPITRE III : RÉSULTATS

### 1. Analyse phytochimique

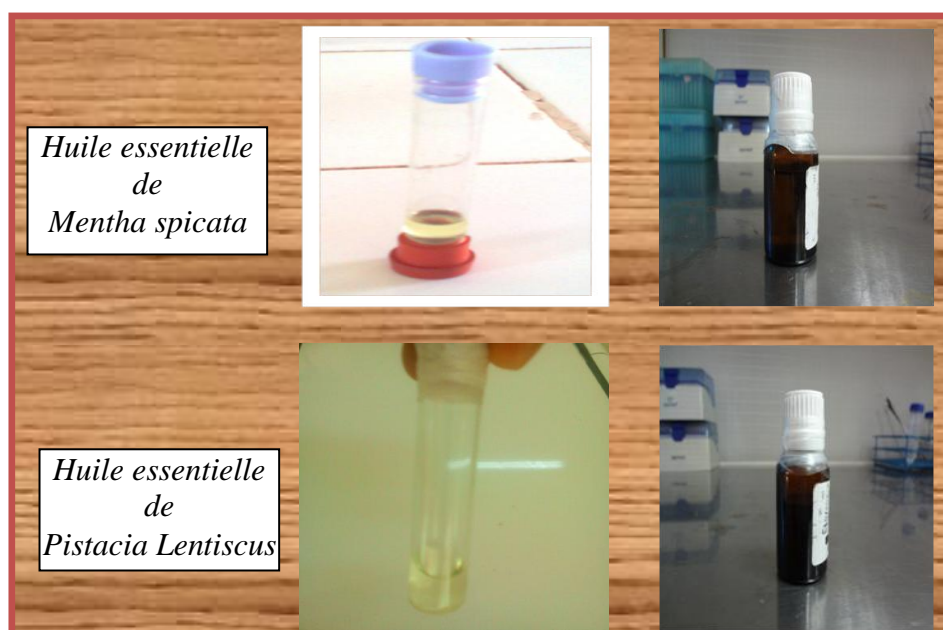
Les résultats de l'analyse phytochimique sont présentés dans le tableau 6. Le signe "+" traduit la présence du groupe de composés chimiques et le signe "-" une réaction négative. Les résultats indiquent que les deux plantes renferment des anthocyanes, des leuco-anthocyanes, des flavonoïdes, des tanins, des terpènes et stéroïdes. Par contre, aucune plante ne contient des alcaloïdes ni des saponosides.

**Tableau 06 :** Screening phytochimique des feuilles des deux plantes.

| Groupe Chimique       | <i>M. spicata</i> | <i>P. lentiscus</i> |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| Anthocyanes           | +                 | +                   |
| Leuco-Anthocyanes     | +                 | +                   |
| Alcaloïdes            | -                 | -                   |
| Flavonoïdes           | +                 | +                   |
| Tanins                | +                 | +                   |
| Terpènes et stéroïdes | +                 | +                   |
| Saponosides           | -                 | -                   |

### 2. Résultat d'extraction des huiles essentielles

Dans cette technique le critère de détection de la présence d'huile essentielle dans les feuilles de la plante est le changement de la couleur dans l'extrait ainsi que l'odeur piquante (Fig.32).



**Figure 32 :** Huiles essentielles des deux plantes.



## 2.1. Caractères organoleptiques

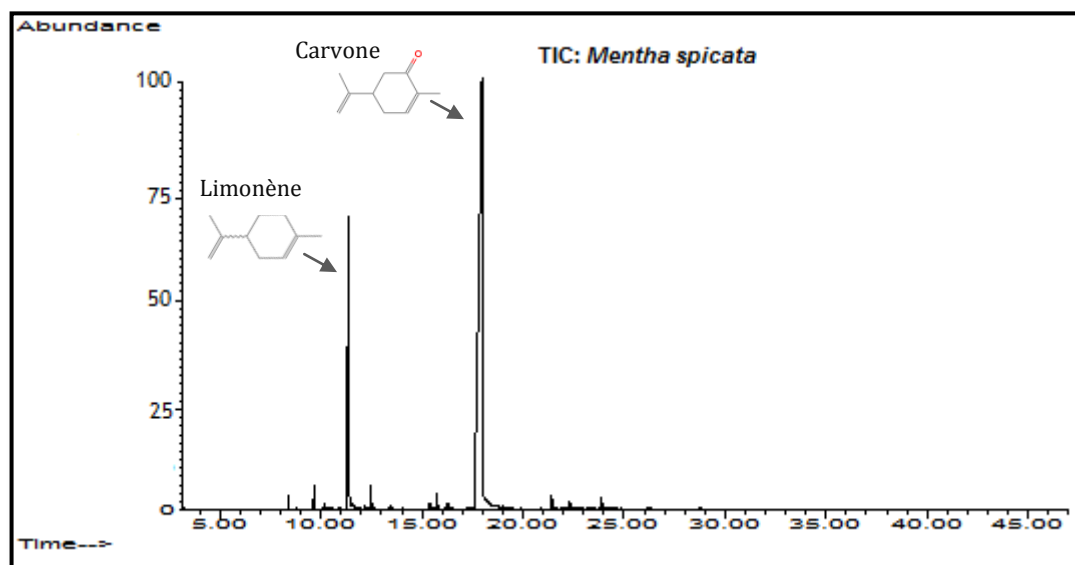
Les huiles essentielles renferment plusieurs composés : les phénols, les cétones et les hydrocarbures terpéniques qui leurs confèrent divers caractères. Parmi eux ceux qui font impression sur les organes de sens, plus particulièrement sur le goût, l'odorat et la couleur : ils ont été groupés sous la qualification d'organoleptiques. Nous avons donc noté l'aspect, l'odeur et la couleur des huiles essentielles de la menthe et du pistachier, les constatations sont récapitulées dans le tableau 7.

**Tableau 07:** Propriétés organoleptiques des deux plantes

|                           | Aspect                    | Couleur                         | Odeur                                   |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|
| <i>Mentha spicata</i>     | liquide très fluide.      | incolore à jaune verdâtre pâle. | herbacée, fraîche, carvonée, puissante. |
| <i>Pistacia lentiscus</i> | liquide, mobile, limpide. | incolore à jaune pâle.          | intense, herbacée.                      |

## 2.3. La composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha spicata* par CG-SM a permis d'identifier 24 composés terpéniques cités dans le tableau 8 par ordre d'élution (Fig.33).



**Figure 33 :** Chromatogramme CPG-SM de l'huile essentielle de *Mentha spicata*.

Le rendement d'extraction de cette huile était  $2.16 \pm 0.07$  % dont en est caractérisée par un taux élevé de Carvone (71.02 %) et de Limonène (17.43 %).

**Tableau 08** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* identifiée par CG-SM.

| No.                                 | Composants             | Temps de rétention (min) | IA   | Pourcentage (%) |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|------|-----------------|
| 1                                   | $\alpha$ -Pinene       | 8.39                     | 932  | 0.53            |
| 2                                   | Camphene               | 8.81                     | 949  | 0.07            |
| 3                                   | Sabinene               | 9.58                     | 971  | 0.38            |
| 4                                   | $\beta$ -Pinene        | 9.65                     | 982  | 0.89            |
| 5                                   | $\beta$ -Myrcene       | 10.15                    | 990  | 0.43            |
| 6                                   | $\alpha$ -Terpinene    | 10.89                    | 1012 | 0.13            |
| 7                                   | Limonene               | 11.34                    | 1029 | <b>17.43</b>    |
| 8                                   | Z-Ocimene              | 11.58                    | 1033 | 0.45            |
| 9                                   | $\gamma$ -Terpinene    | 12.19                    | 1053 | 0.22            |
| 10                                  | cis-Sabinene hydrate   | 12.45                    | 1057 | 1.43            |
| 11                                  | trans-Sabinene hydrate | 13.37                    | 1062 | 0.09            |
| 12                                  | $\alpha$ -Terpinolene  | 13.46                    | 1083 | 0.38            |
| 13                                  | Borneol                | 15.37                    | 1164 | 0.64            |
| 14                                  | Terpinen-4-ol          | 15.72                    | 1200 | 0.90            |
| 15                                  | Trans-Dihydrocarvone   | 16.28                    | 1217 | 1.00            |
| 16                                  | Pulegone               | 17.49                    | 1236 | 0.06            |
| 17                                  | Carvone                | 17.95                    | 1245 | <b>71.02</b>    |
| 18                                  | $\beta$ -Bourbonene    | 21.41                    | 1381 | 0.72            |
| 19                                  | $\beta$ -Caryophyllene | 22.30                    | 1405 | 0.53            |
| 20                                  | Germacrene D           | 23.87                    | 1480 | 1.15            |
| 21                                  | Germacrene B           | 24.23                    | 1536 | 0.23            |
| 22                                  | Butyl Hydroxy Toluene  | 24.59                    | 1541 | 0.12            |
| 23                                  | Spathulenol            | 26.20                    | 1577 | 0.12            |
| <b>Total</b>                        |                        |                          |      | <b>98.92</b>    |
| <b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>   |                        |                          |      | <b>20.91</b>    |
| <b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b> |                        |                          |      | <b>2.63</b>     |
| <b>Monoterpènes oxygénés</b>        |                        |                          |      | <b>75.14</b>    |
| <b>Sesquiterpènes oxygénés</b>      |                        |                          |      | <b>0.24</b>     |
| IA : Indice Arithmétique            |                        |                          |      |                 |

Quant à celle de *Pistacia lentiscus*, son huile essentielle est composée d'un mélange où les pourcentages sont très proches. Les composants majeurs sont : terpinen-4-ol (11.89%), germacrene D (8.27%), sabinene (6.92%),  $\alpha$ -Pinene (5.97%) et caryophyllene (5.1%). Par sa composition, cette huile est différente de celle obtenue des feuilles de *Mentha* et les valeurs sont illustrées dans la figure 34 et le tableau 9. Le rendement d'extraction était  $0.42 \pm 0.02$  %.

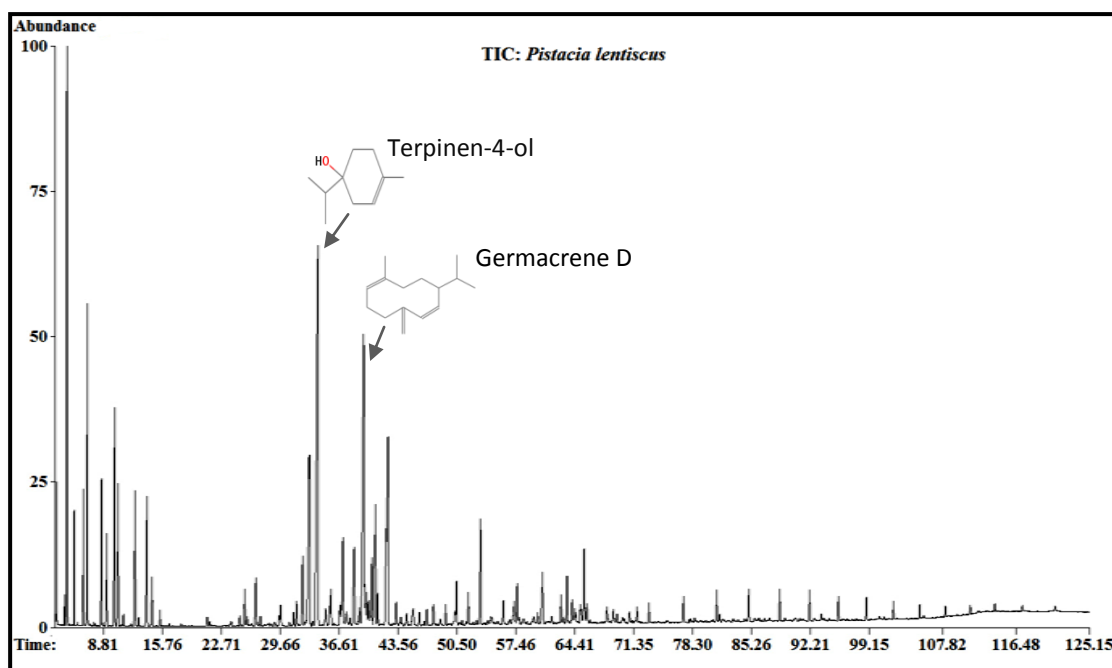


Figure 34 : Chromatogramme CPG-SM de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

Tableau 09 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* identifiée par CG-SM.

| No. | Composants             | Temps de rétention (min) | IA   | Pourcentage (%) |
|-----|------------------------|--------------------------|------|-----------------|
| 1   | Tricyclene             | 4.259                    | 1007 | 0.2             |
| 2   | $\alpha$ -Pinene       | 4.543                    | 1027 | 5.97            |
| 3   | $\alpha$ -thujene      | 4.585                    | 1028 | 0.66            |
| 4   | Camphene               | 5.383                    | 1064 | 0.81            |
| 5   | Hexanal                | 5.806                    | 1077 | t               |
| 6   | $\beta$ -Pinene        | 6.476                    | 1097 | 1.26            |
| 7   | Sabinene               | 6.954                    | 1115 | 5.19            |
| 8   | verbenene              | 7.044                    | 1118 | t               |
| 9   | $\delta$ -3-Carene     | 7.872                    | 1144 | t               |
| 10  | 2-Heptanone            | 8.212                    | 1157 | 0.11            |
| 11  | $\alpha$ -Phellandrene | 8.615                    | 1168 | 1.74            |
| 12  | $\alpha$ -Terpinene    | 9.237                    | 1189 | 1.04            |
| 13  | Limonene               | 10.180                   | 1199 | 3.14            |
| 14  | 2-Hexenal              | 11.201                   | 1227 | 0.14            |
| 15  | $\gamma$ -Terpinene    | 12.579                   | 1249 | 1.77            |
| 16  | $\beta$ -Ocimene       | 13.008                   | 1251 | 0.10            |
| 17  | Styrene                | 13.419                   | 1263 | t               |
| 18  | o-Cymene               | 13.974                   | 1272 | 1.94            |
| 19  | $\alpha$ -Terpinolene  | 14.579                   | 1279 | 0.66            |
| 20  | Isopentyl isovalerate  | 15.521                   | 1296 | 0.19            |
| 21  | (E)-2-octenal          | 17.056                   | 1321 | t               |

|    |   |        |      |              |
|----|---|--------|------|--------------|
| 22 | 2-Nonanone                                    | 21.092 | 1386 | 0.14         |
| 23 | Nonanal                                       | 21.394 | 1391 | 0.10         |
| 24 | $\beta$ -thujone                              | 23.793 | 1429 | t            |
| 25 | $\alpha$ -Cubebene                            | 24.288 | 1437 | 0.15         |
| 26 | $\alpha$ -Longipinene                         | 25.152 | 1451 | t            |
| 27 | Isopentyl hexanoate                           | 25.515 | 1457 | 0.55         |
| 28 | 2,4-Heptadienal                               | 25.799 | 1461 | 0.32         |
| 29 | $\alpha$ -Ylangene                            | 26.288 | 1469 | t            |
| 30 | $\alpha$ -Copaene                             | 26.832 | 1478 | 1.88         |
| 31 | $\beta$ -Bourbonene                           | 28.360 | 1503 | t            |
| 32 | Benzaldehyde                                  | 29.019 | 1519 | 0.10         |
| 33 | 2-Nonanol                                     | 29.569 | 1533 | 0.15         |
| 34 | $\beta$ -Cubebene                             | 29.750 | 1537 | 0.76         |
| 35 | <i>cis</i> - $\beta$ -Terpineol               | 30.789 | 1562 | 0.10         |
| 36 | Pinocarvone                                   | 31.273 | 1574 | 0.21         |
| 37 | 1-Terpineol                                   | 31.635 | 1583 | 0.80         |
| 38 | Bornyl acetate                                | 32.348 | 1600 | 1.14         |
| 39 | Caryophyllene                                 | 33.176 | 1621 | <b>5.10</b>  |
| 40 | Aromadendrene                                 | 33.550 | 1631 | 0.67         |
| 41 | Terpinen-4-ol                                 | 34.082 | 1604 | <b>11.49</b> |
| 42 | 2-Decenal                                     | 36.179 | 1641 | t            |
| 43 | <i>trans</i> -Pinocarveol                     | 36.898 | 1653 | 0.27         |
| 44 | $\alpha$ -Humulene                            | 37.097 | 1657 | 1.52         |
| 45 | $\beta$ -Farnesene                            | 37.943 | 1672 | 0.16         |
| 46 | $\alpha$ -Amorphene                           | 38.426 | 1681 | 1.82         |
| 47 | Viridiflorene                                 | 38.692 | 1685 | t            |
| 48 | $\beta$ -Bisabolene                           | 39.049 | 1726 | t            |
| 49 | Verbenone                                     | 39.532 | 1730 | 0.39         |
| 50 | Germacrene D                                  | 39.894 | 1735 | <b>8.64</b>  |
| 51 | $\alpha$ -Selinene                            | 40.148 | 1740 | 0.55         |
| 52 | $\beta$ -Selinene                             | 40.529 | 1743 | 0.51         |
| 53 | $\alpha$ -Muurolene                           | 40.940 | 1747 | 1.28         |
| 54 | Carvone                                       | 41.079 | 1752 | 2.72         |
| 55 | Cyclopentadiene                               | 41.187 | 1754 | 0.48         |
| 56 | Naphthalene                                   | 42.190 | 1766 | 2.02         |
| 57 | $\delta$ -Cadinene                            | 42.408 | 1768 | <b>4.86</b>  |
| 58 | $\beta$ -Sesquiphellandrene                   | 43.024 | 1775 | t            |
| 59 | $\gamma$ -Curcumene                           | 43.375 | 1779 | 0.41         |
| 60 | Myrtenol                                      | 44.625 | 1794 | 0.39         |
| 61 | 2-Tridecanone                                 | 45.399 | 1804 | 0.47         |
| 62 | Germacrene B                                  | 45.586 | 1808 | t            |
| 63 | <i>cis</i> -(Z)- $\alpha$ -Bisabolene epoxide | 45.820 | 1814 | 0.16         |
| 64 | <i>cis</i> -Calamenene                        | 46.124 | 1819 | 0.21         |
| 65 | <i>trans</i> -Carveol                         | 46.994 | 1836 | 0.26         |
| 66 | p-Cymen-8-ol                                  | 47.767 | 1851 | 0.82         |
| 67 | exo-2-Hydroxycineole                          | 48.112 | 1858 | t            |
| 68 | <i>cis</i> -Carveol                           | 48.577 | 1867 | 0.15         |
| 69 | $\alpha$ -Calacorene                          | 50.335 | 1902 | 0.23         |
| 70 | $\beta$ -Ionone                               | 51.622 | 1927 | t            |
| 71 | Caryophyllene oxide                           | 53.338 | 1961 | 1.76         |
| 72 | Salvial-4(14)-en-1-one                        | 54.570 | 1985 | 0.17         |
| 73 | $\beta$ -Oploplenone                          | 54.685 | 2017 | 0.12         |
| 74 | Globulol                                      | 58.183 | 2061 | t            |

|                                     |                         |        |      |              |
|-------------------------------------|-------------------------|--------|------|--------------|
| 75                                  | Spathulenol             | 60.643 | 2114 | 1.12         |
| 76                                  | $\tau$ -Muurolol        | 63.549 | 2177 | 0.72         |
| 77                                  | $\delta$ -Cadinol       | 64.141 | 2190 | 0.47         |
| 78                                  | Nonanoic acid           | 64.467 | 2197 | 0.28         |
| 79                                  | $\alpha$ -Bisabolol     | 65.102 | 2211 | 0.28         |
| 80                                  | $\alpha$ -Cadinol       | 65.555 | 2221 | 1.27         |
| 81                                  | Acenaphthylene          | 66.243 | 2237 | 0.47         |
| 82                                  | Dehydroaromadendrene    | 68.249 | 2283 | 0.41         |
| 83                                  | Alloaromadendrene oxide | 70.086 | 2326 | 0.15         |
| 84                                  | 12-Norcyercene-B        | 70.896 | 2345 | 0.23         |
| 85                                  | E,E-Farnesal            | 71.796 | 2366 | 0.30         |
| 86                                  | Vilgarol B              | 73.868 | 2416 | t            |
| 87                                  | Benzoic acid            | 74.504 | 2448 | 0.64         |
| 88                                  | Ascabiol                | 81.560 | 2609 | 0.16         |
| 89                                  | Palmitic acid           | 93.547 | 2940 | 0.14         |
| <b>Total</b>                        |                         |        |      | <b>85.59</b> |
| <b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>   |                         |        |      | <b>24.48</b> |
| <b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b> |                         |        |      | <b>29.16</b> |
| <b>Monoterpènes oxygénés</b>        |                         |        |      | <b>17.6</b>  |
| <b>Sesquiterpènes oxygénés</b>      |                         |        |      | <b>6.52</b>  |
| <b>Autres</b>                       |                         |        |      | <b>7.83</b>  |
| IA : Indice Arithmétique            |                         |        |      |              |
| t: trace (< 0.1%)                   |                         |        |      |              |

### 3. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

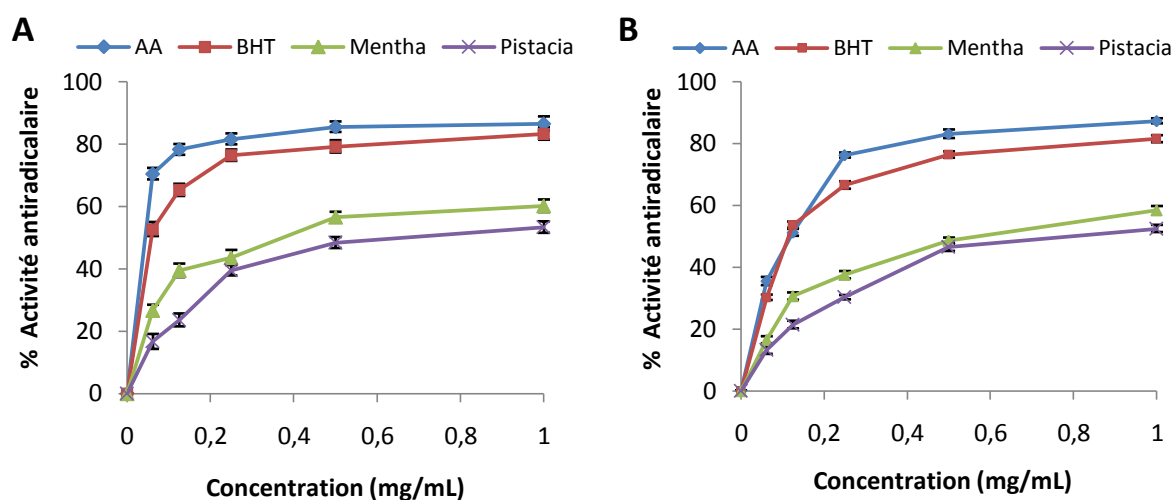
Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Prior *et al.*, 1998).

#### 3.1. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> et de l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup>

Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes de la Figure 35, qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle. Afin d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits par rapport aux antioxydants de synthèse, il faut calculer le paramètre CI<sub>50</sub> qu'il est défini comme la concentration de l'extrait brut nécessaire pour réduire la moitié de la concentration initiale du DPPH<sup>•</sup> ou de l'anion superoxyde. Après analyse de nos résultats nous déduisons à partir de ces courbes la concentration CI<sub>50</sub> (tableau 10).

En effet, la faible valeur CI<sub>50</sub> signifie la forte activité antioxydante. Dans ce cas, la concentration CI<sub>50</sub> d'acide ascorbique présente la meilleure activité du piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> de l'ordre de 40  $\mu$ g/ml. Les huiles essentielles de *M. spicata* et de *P. lentiscus* possèdent une activité antioxydante avec des CI<sub>50</sub> de l'ordre de 351  $\pm$  0.032 et

640 ± 0.16 µg/ml, respectivement. D'autre part, Les résultats obtenus montrent que les deux huiles essentielles piègent le radical superoxyde d'une manière dose dépendante. On peut résumer l'ordre décroissant des échantillons testés en termes d'activité comme suit : Vit C > BHT > *M. spicata* > *P. lentiscus*



**Figure 35:** Activité antioxydante d'huiles essentielles de *M. spicata* et *P. lentiscus* mesurée par les tests DPPH (A) et NBT/Riboflavine (B). Acide Ascorbique (AA) et BHT étant des contrôles positives.

### 3.2. Test TEAC et FRAP

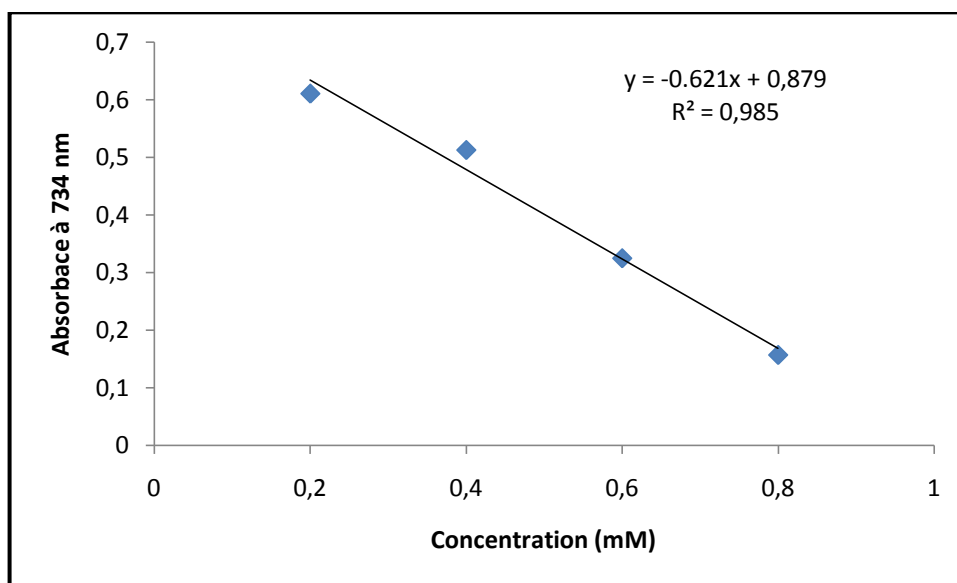
Nous avons fait le choix d'exprimer les résultats de façon homogène: autrement dit, en équivalent d'un antioxydant (choisi comme référence) par gramme de matière sèche. La valeur la plus élevée correspondra à l'activité la plus forte. Le test TEAC étant exprimé en fonction du Trolox et le test FRAP utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 9.

**Tableau 10 :** Effets scavenger et réducteur des huiles essentielles de *M. spicata* et *P. lentiscus* vis-à-vis des différents radicaux utilisés.

|                     | DPPH·<br>(CI <sub>50</sub> µg/mL) | NBT/Riboflavine<br>(CI <sub>50</sub> µg/mL) | TEAC<br>(µmol<br>Trolox/mg) | FRAP<br>(µg GAE<br>équivalent/g) |
|---------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|
| <i>M. spicata</i>   | 351 ± 0.032                       | 566 ± 0.047                                 | 0.359 ± 0.037               | 238.66 ± 35.36                   |
| <i>P. lentiscus</i> | 640 ± 0.16                        | 760 ± 0.125                                 | 0.247 ± 0.023               | 153.33 ± 32.44                   |
| Acide ascorbique    | 40                                | 120 ± 0.005                                 | 1.172 ± 0.016               | 731.33 ± 24.44                   |
| BHT                 | 58 ± 0.003                        | 108 ± 0.002                                 | 1.072 ± 0.014               | 620 ± 29.61                      |

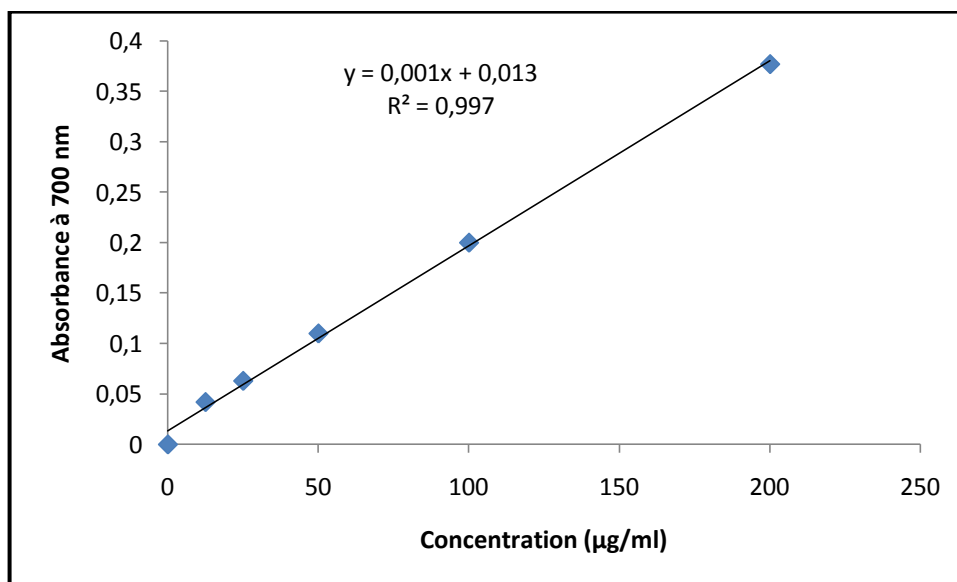
Les valeurs sont exprimées comme moy ± SD.

La gamme étalon du Trolox obtenue pour des concentrations allant de 0.2 à 0.8 mM est représentée dans la Figure 36.



**Figure 36 :** Droite d'étalonnage du Trolox.

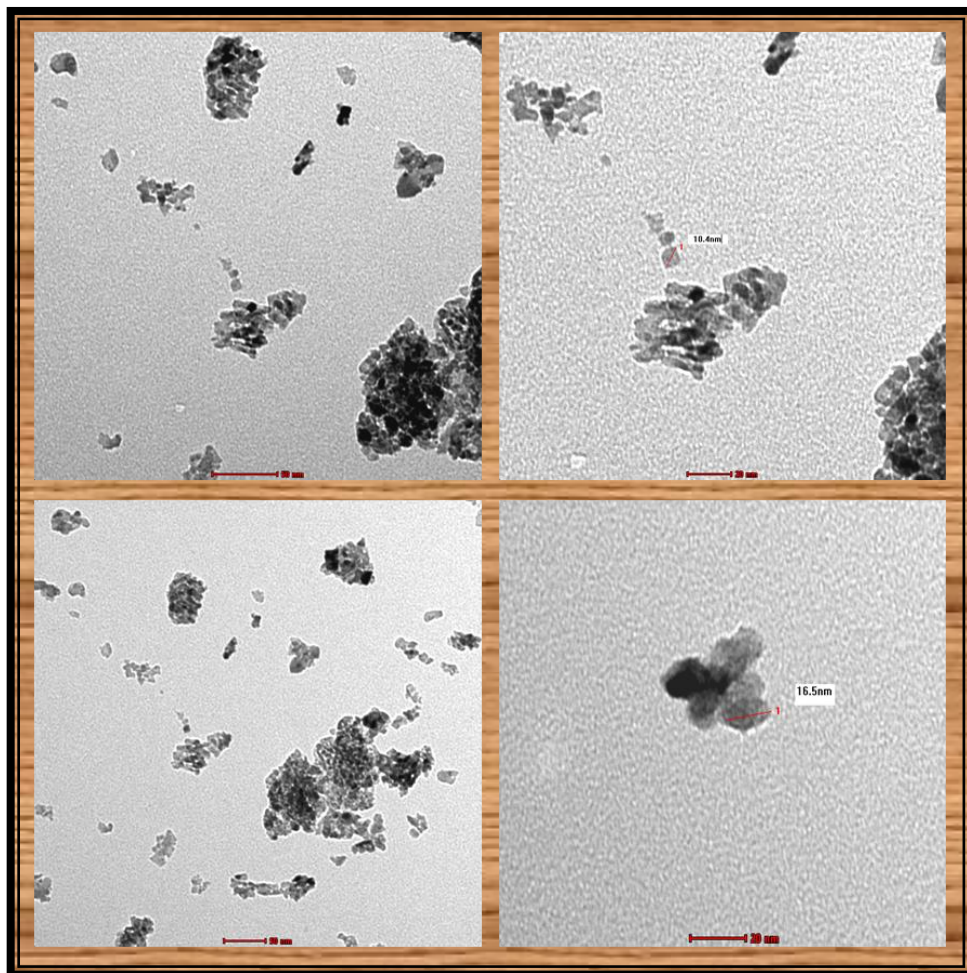
D'autre part, la gamme d'acide gallique est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 200  $\mu\text{g/ml}$  (Fig.37).



**Figure 37 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

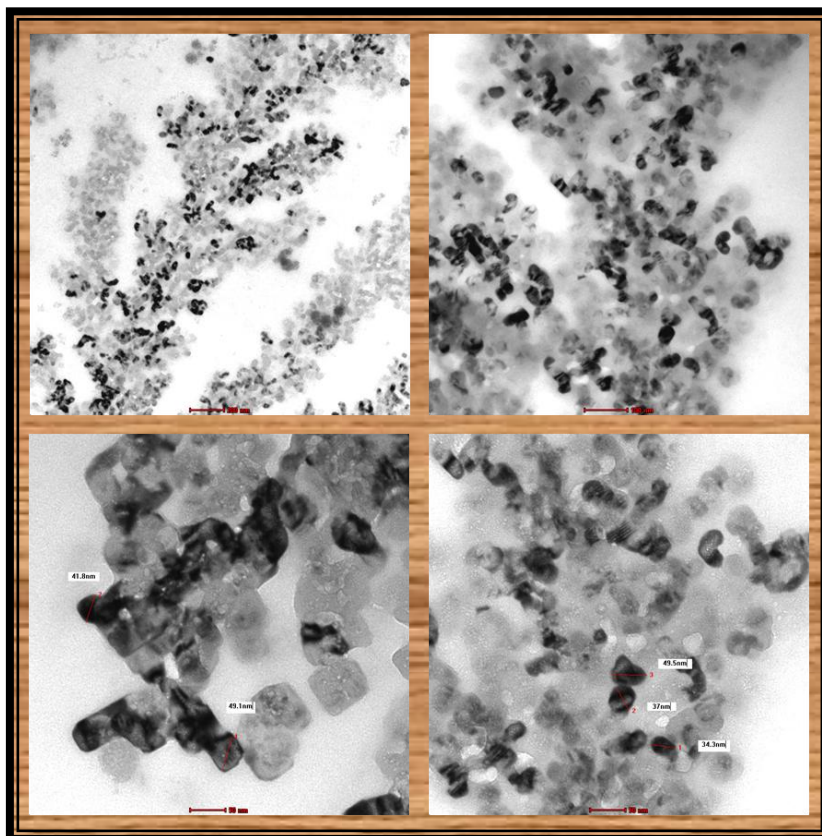
#### 4. Caractérisation morphologique et dispersion en taille des nanoparticules par microscopie électronique en transmission (MET)

Les NPs sont dispersées en solution aqueuse puis déposées sur des grilles pour permettre leur observation par MET. Les images de MET des NiO NPs (Fig. 38 et Fig. 39) permettent d'apprécier la taille et la forme des particules avec différents grossissements. L'analyse des clichés révèle des NPs multiformes et une forte tendance à l'agrégation. Certaines particules ressemblent en effet à de petites sphères et d'autres à de petits cubes.



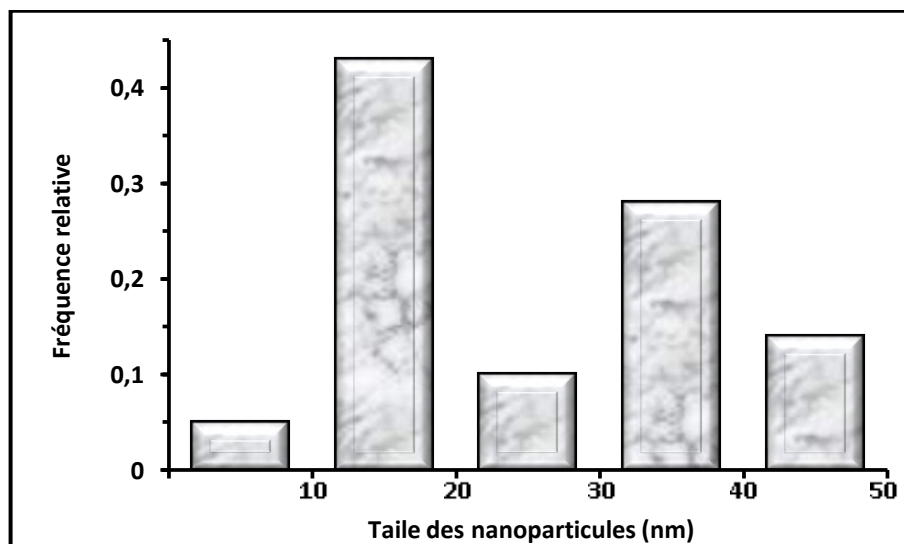
**Figure 38** : Clichés de MET de NiO NPs dans de l'eau déminéralisée à des différents grossissements (à gauche 50 nm et à droite 20 nm).





**Figure 39** : Clichés de MET de NiO NPs dans DMEM à des différents grossissements (en haut à gauche 200, à droit 100 nm et en bas 50 nm).

La distribution statistique en taille a été ensuite mesurée (Fig. 40). La taille des NPs varie de 10 à 50 nm de diamètre (70 particules mesurées) ; la taille moyenne est de 25 nm avec un écart type de 14 nm. L'écart type apporte une indication sur la dispersité c'est-à-dire l'homogénéité en taille.



**Figure 40** : Fréquence relative du diamètre de NiO NPs.

#### 4.1. Comportement des nanoparticules en solution: Mesures de potentiel Zêta

Des mesures de potentiel Zêta en fonction des différentes solutions testées ont été réalisées et les résultats sont montrés dans le tableau 11. Les potentiels Zêta sont de -14 mV pour l'eau et -18 mV pour le DMEM ce qui, d'après la littérature (Bihari *et al.*, 2008), est limite pour maintenir des suspensions stables. Le potentiel Zêta est négatif et reste également proche de la valeur dans l'eau déminéralisée. Cette donnée est cruciale car elle montre que les particules peuvent être dispersées en solution sans craindre une floculation instantanée.

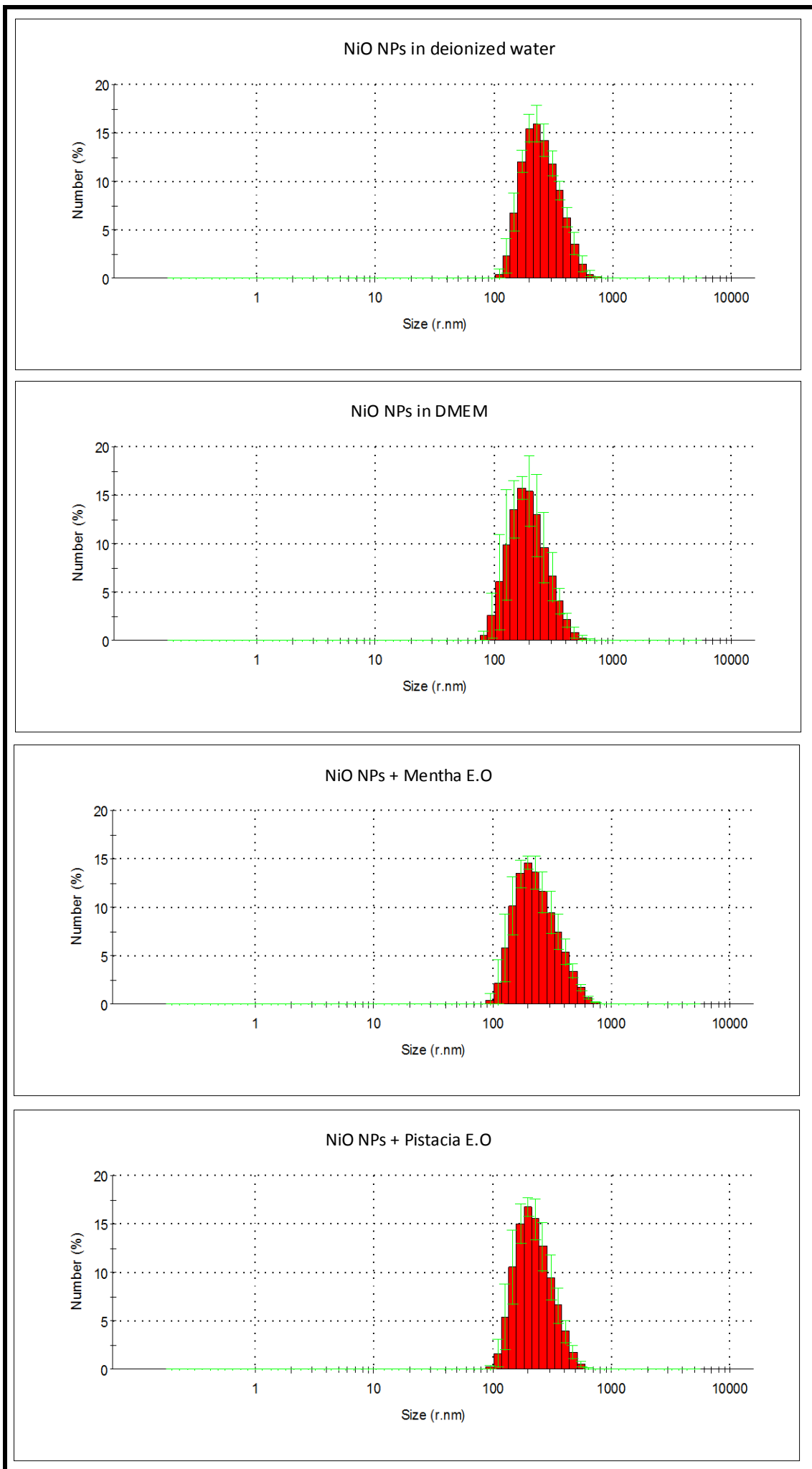
**Tableau 11:** Mesures de diamètre hydrodynamique, potentiel Zêta et de diffusion de NiO NPs dans des différentes solutions.

| Solution   | Rayon hydrodynamique (nm) | Potentiel Zeta (mV) | Diffusion ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) |
|--|---------------------------|---------------------|--|
| Eau déminéralisée                                    | 293,86 $\pm$ 9.51         | -14,06 $\pm$ 0.60   | 0,627 $\pm$ 0.08                       |
| DMEM (SVF10%)  | 288,1 $\pm$ 7.04          | -18,2 $\pm$ 1.10    | 0,908 $\pm$ 0.02                       |
| DMEM + HE de Mentha (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )   | 238,63 $\pm$ 5.16         | -15,76 $\pm$ 0.24   | 0,950 $\pm$ 0.03                       |
| DMEM + HE de Pistacia (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | 278,6 $\pm$ 1.26          | -12,78 $\pm$ 0.71   | 0,893 $\pm$ 0.04                       |

#### 4.2. Mesures de diamètre hydrodynamique

Les mesures de diamètre hydrodynamiques (DH) en solution renseignent sur les états d'agrégation des NPs. Généralement, la distribution en taille de particules est donnée en intensité, en volume et en nombre. Les mesures en volume dépendent naturellement du volume des particules et les mesures en intensité dépendent de la surface exposée par celles-ci. Dans notre cas, la mesure en nombre est donc la mieux adaptée et sera utilisée pour évaluer les états d'agrégation. Les résultats sont exposés en figure 41.

Les différentes NPs de NiO ont été dispersées dans différentes solutions à raison de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Le DH a ensuite été mesuré après sonification et comparé avec les résultats obtenus dans de l'eau. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 10. L'analyse des résultats montre qu'en raison de valeurs obtenues, il n'y a pas différence significative entre les solutions testées et l'eau. Cette donnée est importante puisqu'elle démontre qu'il n'existe pas des interactions particulières entre le milieu de culture et ces NPs. De plus, le milieu DMEM induit une diminution de DH. Ces conséquences vont dans le sens d'une stabilisation des dispersions avec une probable diminution des états d'agrégation des particules. L'augmentation de la diffusion s'explique par la présence des sels et des protéines utiles à la viabilité des cellules (Fig.42).



**Figure 41:** Distribution de la taille hydrodynamique des NiO NPs (r: diamètre, nm).

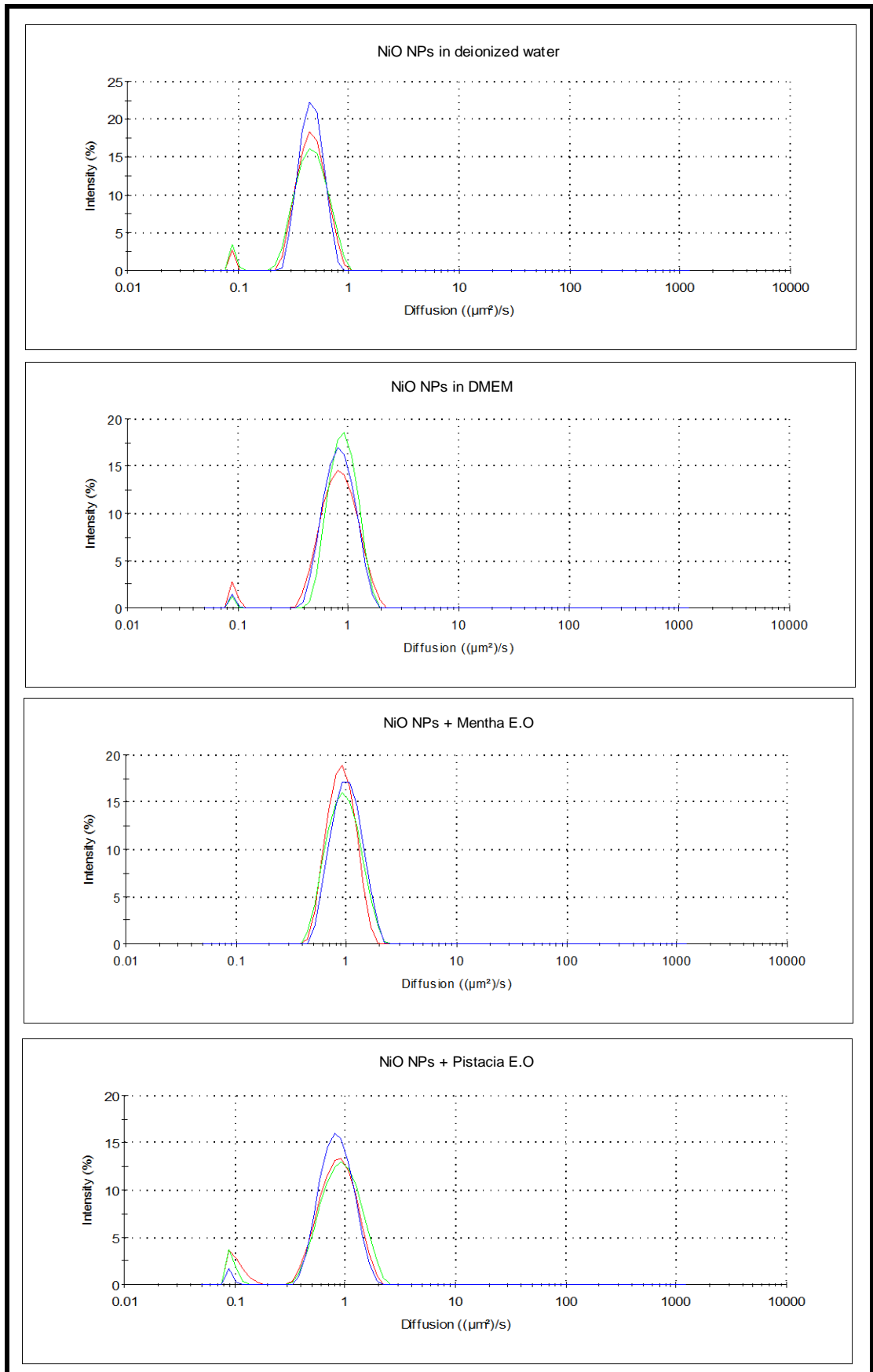


Figure 42: distribution de la diffusion des NiO NPs.

## 5. Caractérisation morphologique de la lignée utilisée

Les cellules A549 ont été cultivées dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> et observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase juste après la subculture (Fig. 43). La lignée cellulaire A549 est constituée de cellules alvéolaires de type II, isolées en 1972 d'un adénocarcinome chez un homme de 58 ans de type caucasien (Giard *et al.*, 1973). Il s'agit à ce jour de la seule lignée cellulaire alvéolaire disponible commercialement. En condition de culture submergée classique, elles ne forment pas de jonctions serrées (BéruBé *et al.*, 2009), mais il a tout de même été montré qu'elles présentaient une structure polarisée (Foster *et al.*, 1998). Tout comme les cellules alvéolaires de type II natives, les cellules A549 présentent des corps lamellaires (Foster *et al.*, 1998).

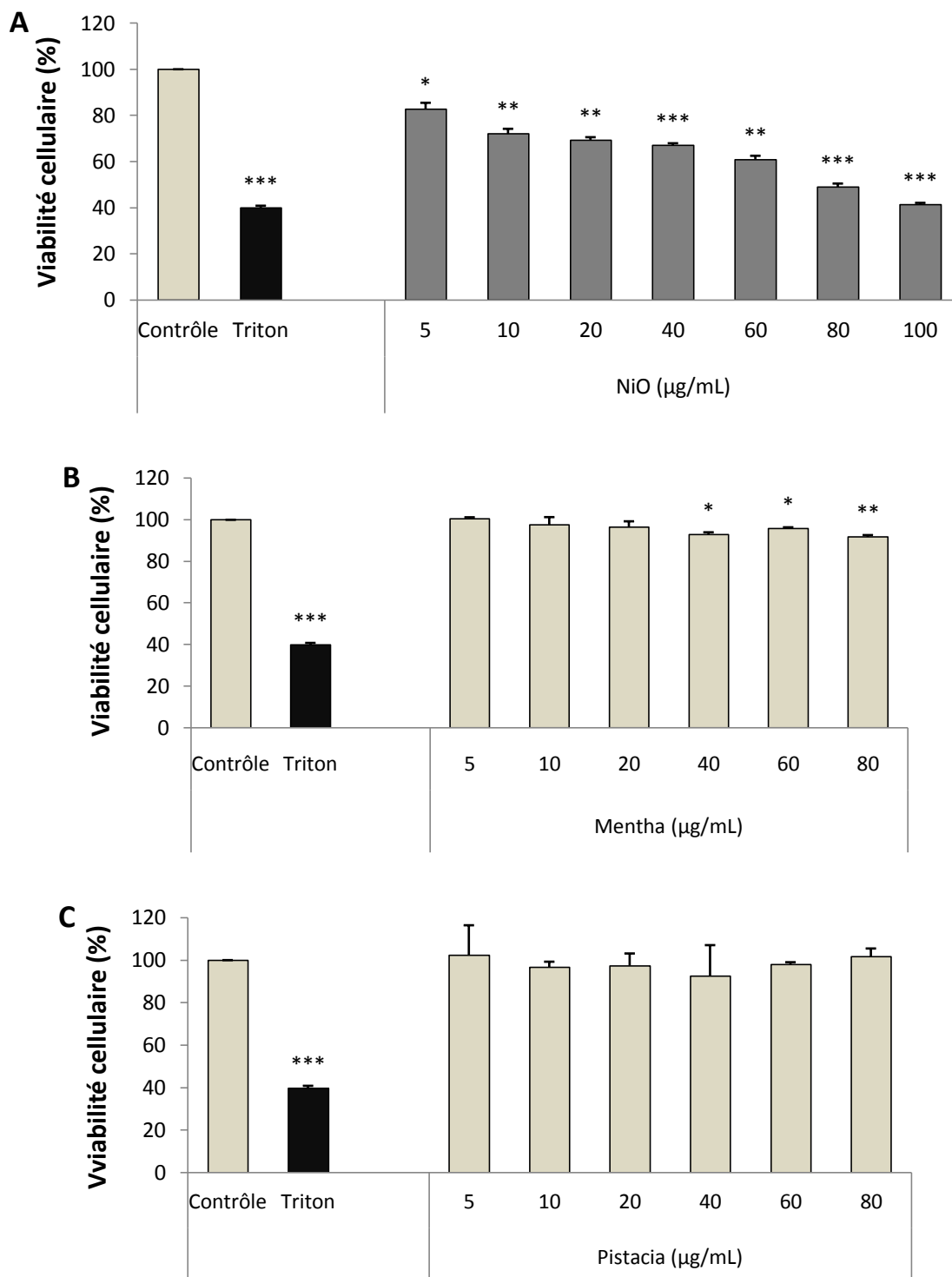


**Figure 43** : Observation des cellules A549 par microscopie en contraste de phase.

## 6. Evaluation de l'activité mitochondriale et la viabilité cellulaire

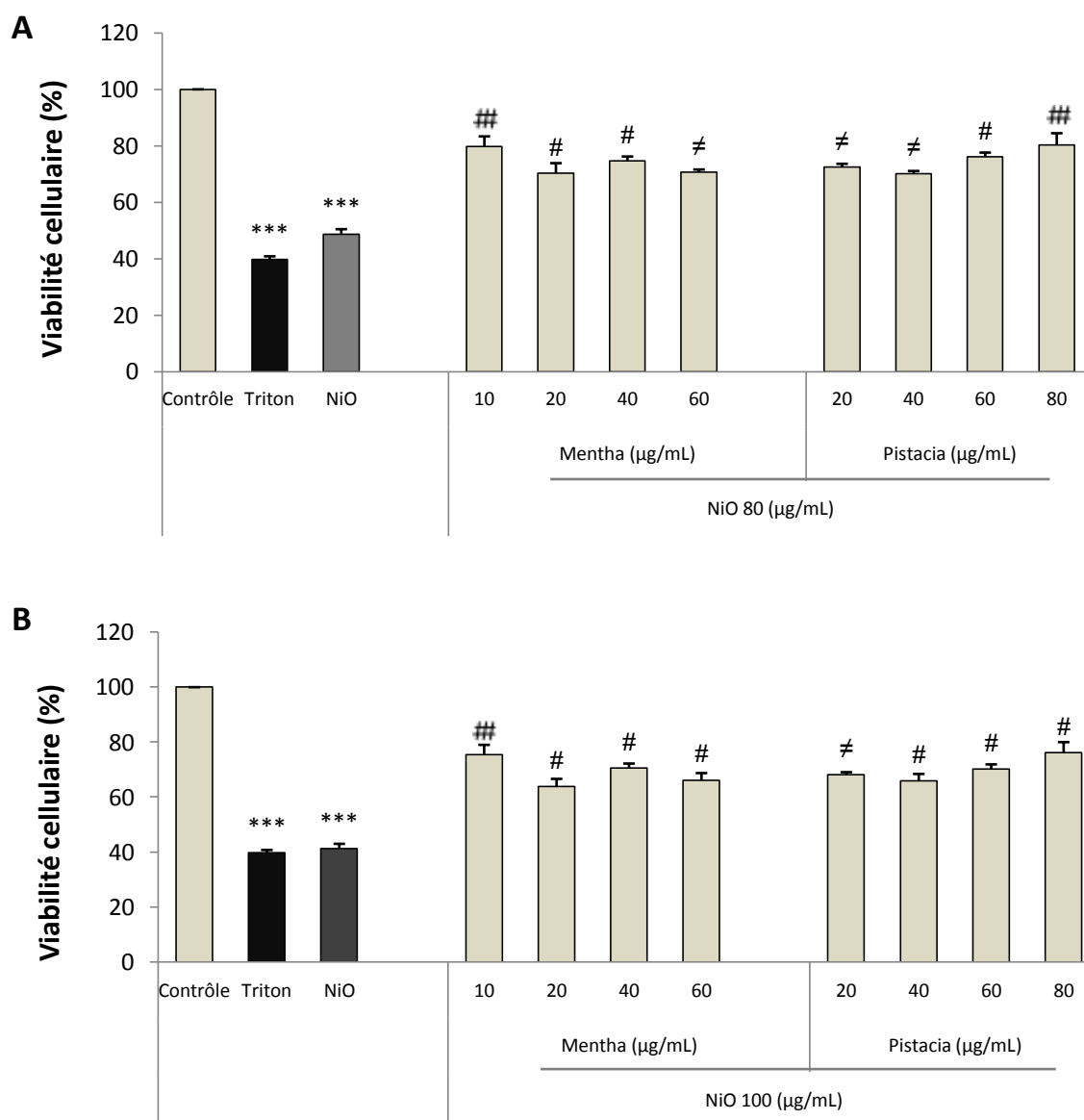
La cytotoxicité des NiO NPs et des huiles essentielles de Mentha et Pistacia a été testée, par la réalisation d'un test MTT sur des cellules alvéolaires exposées à des concentrations de NiO NPs allant de 5 à 100 µg/ml et d'huiles allant de 5 à 80 µg/ml pendant 24 h (Fig. 44). Les résultats de ce test ont montré une nette diminution du pourcentage des cellules MTT positives proportionnellement à l'augmentation de la concentration de NiO NPs. Cette diminution est donc dose dépendante. Le pourcentage des cellules MTT positives reflète la proportion des cellules capables de réduire le MTT en formazan de couleur bleu sous l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Cela fournit à la fois des informations sur la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial. La CL<sub>50</sub> était  $79.83 \pm 0.856$  µg/ml (Fig. 44, A). Basant sur ces données, les doses sub-maximales de 80 et 100 µg/ml ont été choisies pour cette étude.

De plus, nous avons trouvé que toutes les concentrations des huiles essentielles utilisées dans le test MTT, à l'exception de la dose 80 µg/ml de *Mentha*, ne montrent pas d'effet marqué sur le nombre de cellules viables (Fig. 44, B et C).



**Figure 44:** Effets-doses de 24 h d'exposition aux (A) NiO NPs, (B) et (C) huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus*, respectivement, sur la viabilité des cellules A549. Le Triton a été utilisé comme un contrôle positif. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  par rapport aux contrôles.

Par suite, la pré-exposition de 24 h à l'huile essentielle de *P. lentiscus* (60 et 80  $\mu\text{g/ml}$ ) et de *M. spicata* (10 et 40  $\mu\text{g/ml}$ ) étaient les meilleures concentrations présentées d'effet protecteur de la viabilité cellulaire réduite par NiO NPs (Fig. 45, A et B).



**Figure 45:** Effets-doses de 24 h de pré-exposition des cellules A549 à l'huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* suivie par une exposition aux NiO NPs ((A) 80  $\mu\text{g/mL}$  ou (B) 100  $\mu\text{g/mL}$ ) pendant 24 h. Le Triton a été utilisé comme un contrôle positif. \*\*\* $p < 0.001$  par rapport aux contrôles ;  $\neq p < 0.05$ ; # $p < 0.01$ ; # $p < 0.001$  par rapport aux NiO NPs.

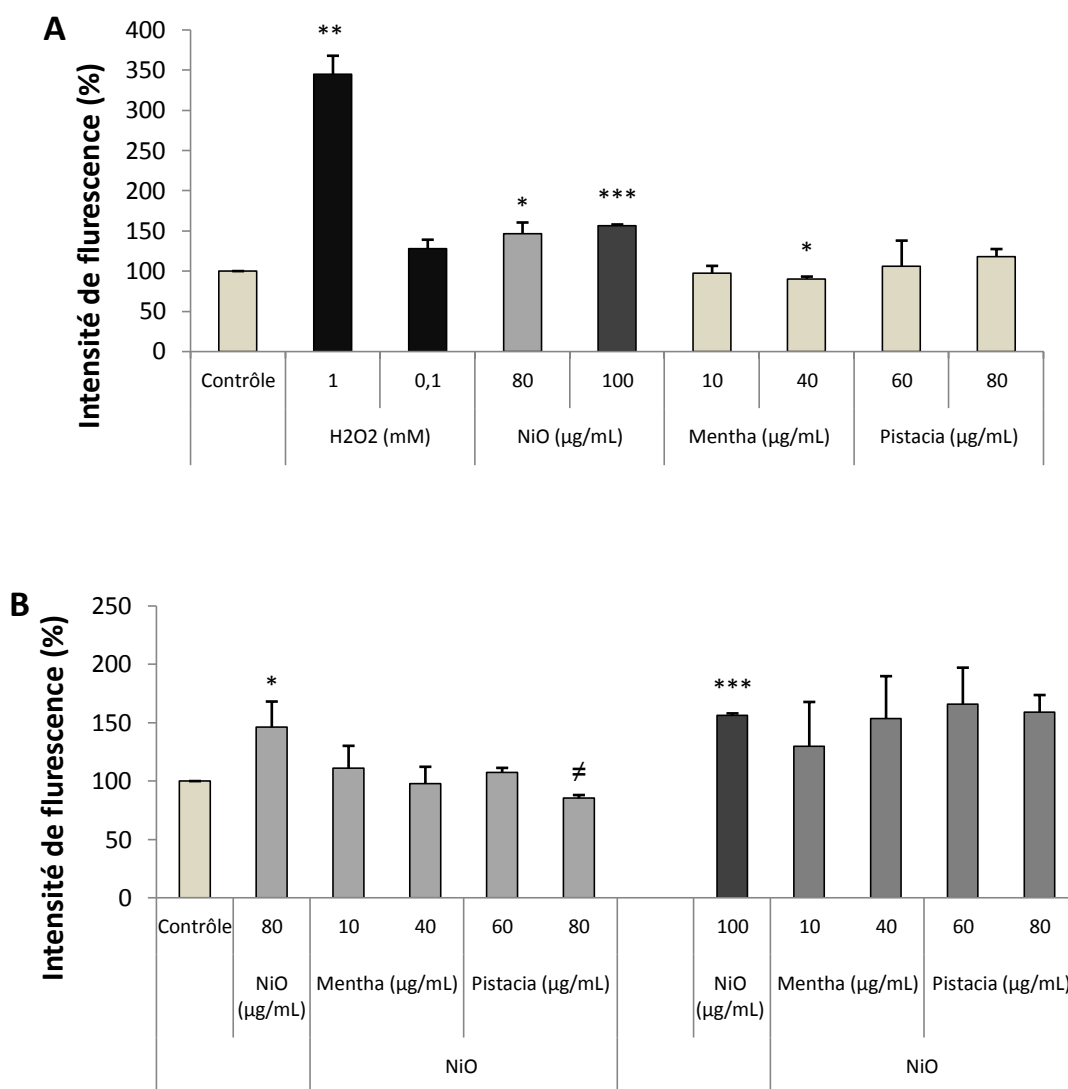
## 7. Evaluation de la production d'espèces radicalaires de l'oxygène

La production des ERO par les cellules A549 a été mesurée après traitement par NiO NPs. La sonde H<sub>2</sub>DCF-DA a été utilisée compte tenu de sa capacité à pénétrer dans la cellule et à générer une molécule fluorescente (DCF) après réaction avec les ERO (essentiellement radical hydroxyl et peroxy-nitrite). Le pourcentage d'intensité de fluorescence est proportionnel à la quantité d'ERO par cellule.

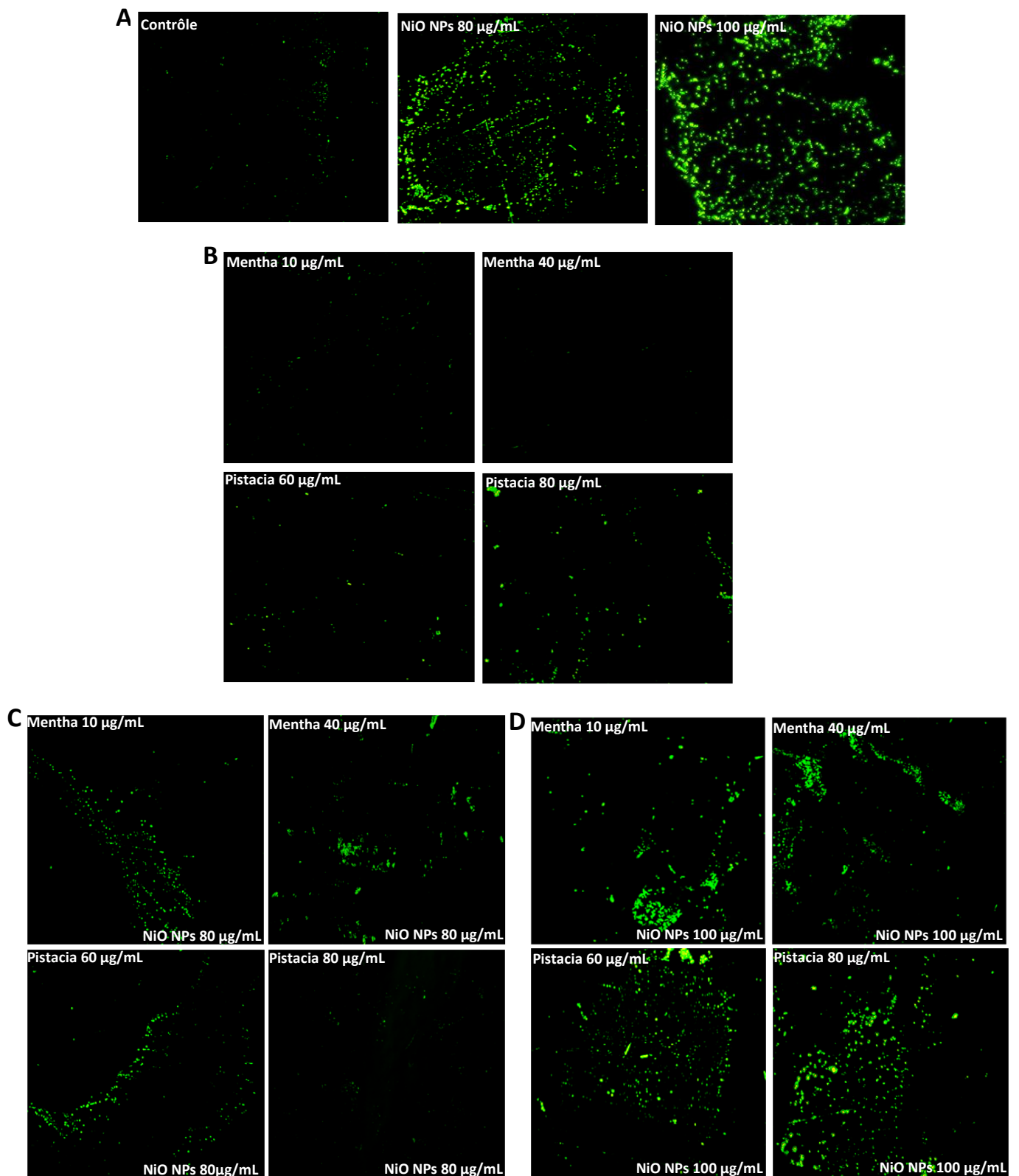
Les cellules A549 ont été cultivées dans des plaques de 96/12 puits pré-traitées avec les deux concentrations sélectionnées de chacune des huiles essentielles pendant 24 h précédemment au NiO NPs à 80 et 100 µg/ml. Ensuite, une coloration au H<sub>2</sub>DCF-DA a été réalisée sur les cellules mises en suspension et celles-ci ont été analysées au lecteur de microplaques ou sous microscope à fluorescence. Les résultats sont présentés dans les figures 46 et 47.

L'analyse des résultats montre une augmentation significative d'intensité de fluorescence entre cellules contrôles et cellules traitées avec le NiO NPs. D'autre part, une diminution significative du pourcentage d'intensité est observée au niveau des cellules traitées avec 40 µg/ml d'huile de *Mentha* (Fig. 46, A). Comparativement aux cellules traitées par le NiO, la pré-incubation de cellules avec l'une des huiles essentielles a abouti à une réduction marquée, celle-ci n'est statistiquement significative qu'avec l'huile de *Pistacia* à 80 µg/ml (Fig. 46, B). Ces résultats sont confirmés par l'imagerie à fluorescence (Fig. 47).





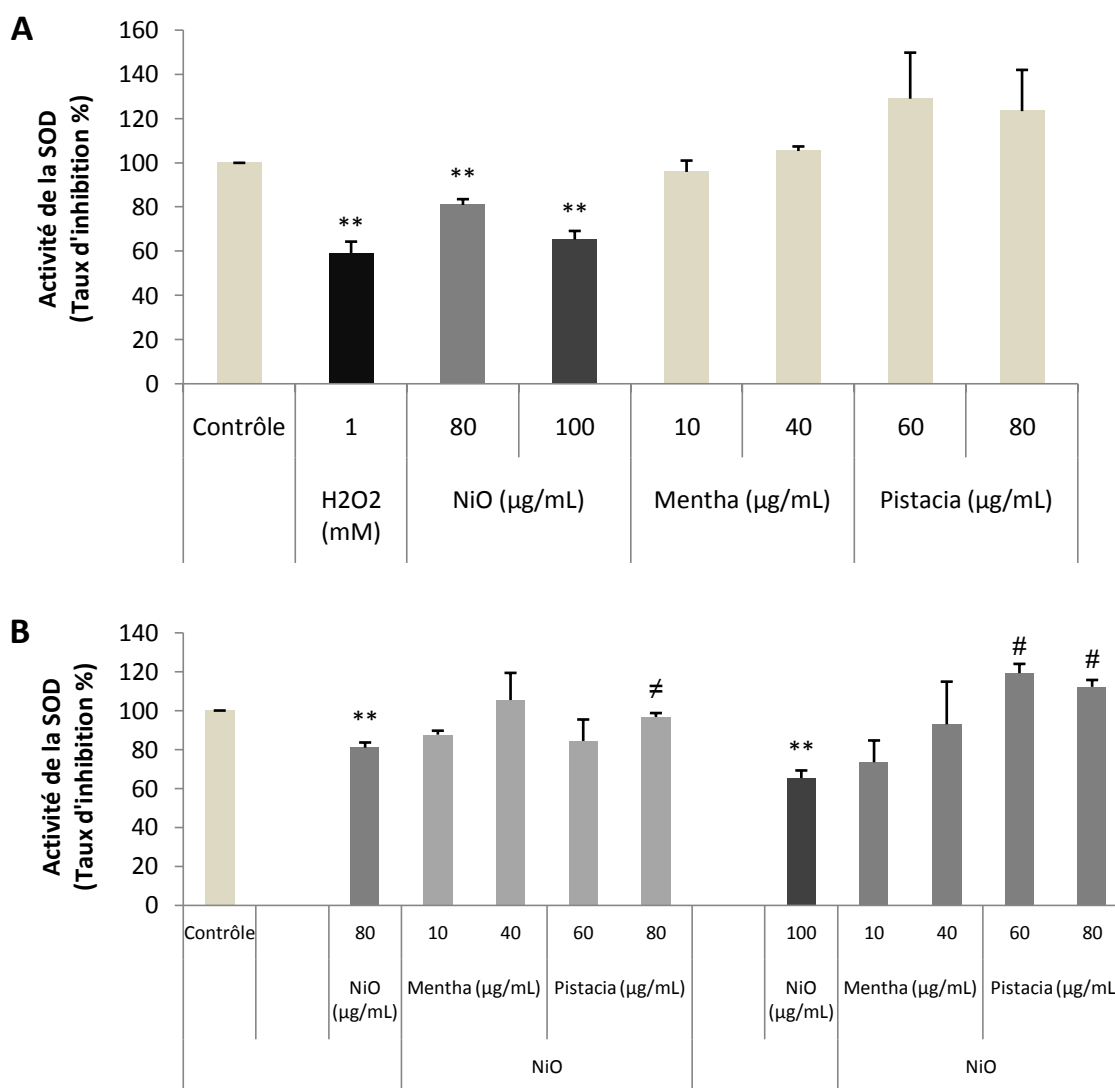
**Figure 46:** (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* sur la production des ERO dans les cellules A549 après 24 h d'exposition. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé comme un contrôle positif. (B) huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* atténuent la production des ERO générées par NiO NPs. Les cellules ont été pré-exposées aux huiles essentielles puis aux NiO NPs pendant 24 h. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  comparativement aux contrôles; ≠ $p < 0.05$  par rapport au NiO.



**Figure 47:** Production intracellulaire des ERO dans les cellules A549. Les images ont été prises par un microscope à fluorescence (OLYMPUS IX73). Effets de (A) NiO NPs, (B) huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* sur la production des ERO dans les cellules A549 après 24 h d'exposition. (C and D) huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* atténuent la production des ERO générées par NiO NPs. Les cellules ont été pré-exposées aux huiles essentielles puis aux NiO NPs pendant 24 h.

## 8. Evaluation de l'activité superoxyde dismutase (SOD)

Puisque le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de la balance antioxydant/pro-oxydant, soit par un déficit en anti-oxydants ou par une surproduction d'ERO et/ou ERN, il était important de préciser l'effet de NiO NPs sur le taux d'anti-oxydants cellulaires. L'activité de SOD dans les cellules A549 traitées par le NiO NPs/huiles essentielles a été mesurée au niveau intracellulaire et mitochondriale après une coloration avec le formazan. Ces cellules cultivées en plaques de 12 puits ont été traitées avec le NiO NPs à 80, 100  $\mu\text{g/ml}$  et pré-incubées ou non avec les huiles essentielles pendant 24 h. Les résultats sont présentés dans la figure 48.



**Figure 48:** Taux d'inhibition (%) d'activité de la SOD, (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* dans les cellules A549 pendant 24 h. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé comme un contrôle positif. (B) Huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* améliorent le niveau de SOD réduit par NiO NPs. Les cellules ont été pré-exposées aux huiles essentielles puis aux NiO NPs pendant 24 h. \*\* $p < 0.01$  par rapport aux contrôles;  $\neq p < 0.05$  and # $p < 0.01$  par rapport au NiO.

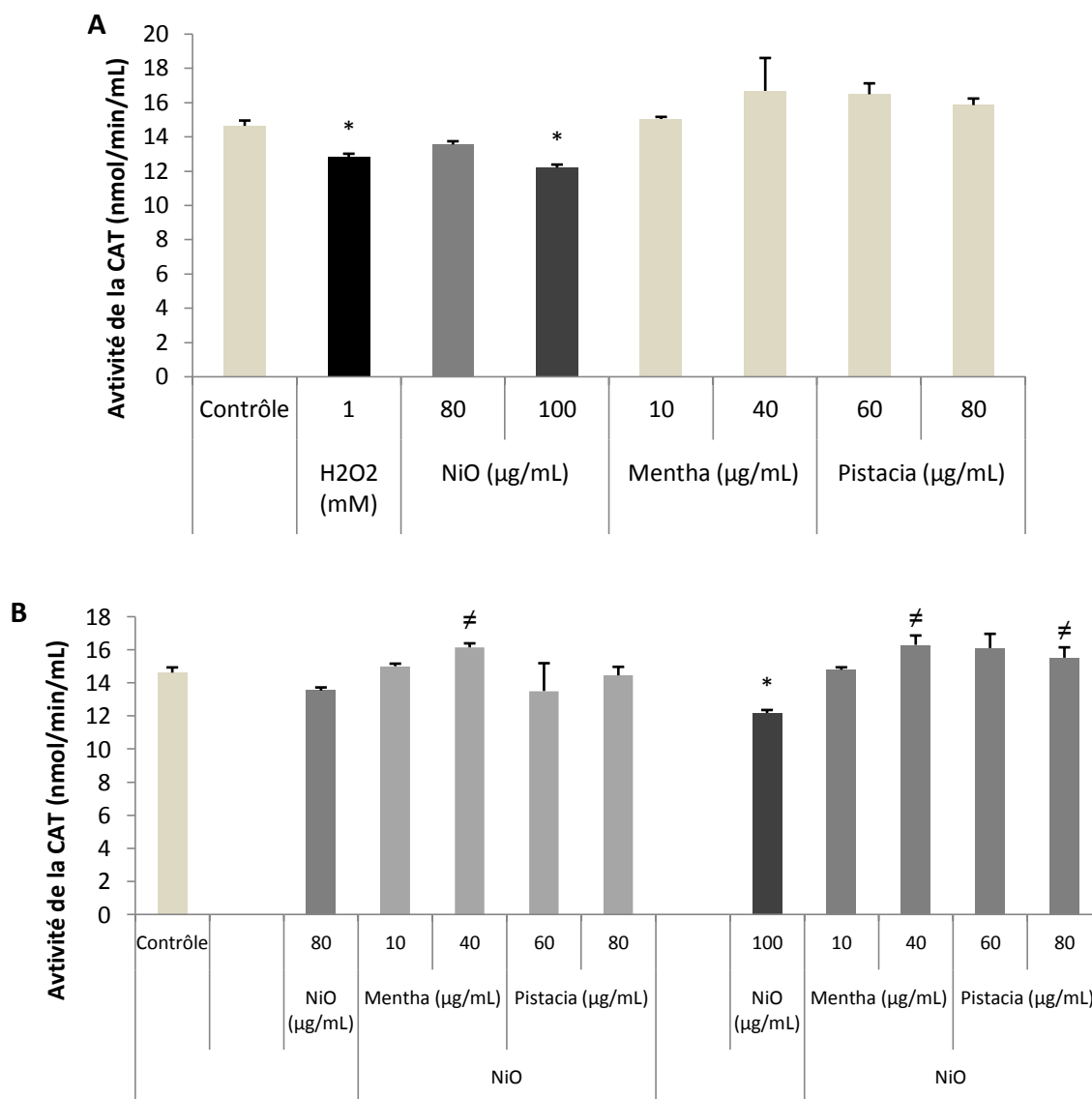
L'analyse de ces résultats montre une diminution significative de l'activité de la SOD des cellules après traitement avec le NiO NPs. Ceci reflète essentiellement une surproduction intracellulaire des anions  $O_2^\circ$ . Le pourcentage d'inhibition de la réduction de WST-1 par la SOD augmente dans les cellules positives par rapport aux contrôles de 96%, 106% et 129%, 124% avec *Mentha* (10 et 40  $\mu\text{g/ml}$ ) et *Pistacia* (60 et 80  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivement (Fig. 48, A).

Par comparaison aux cellules traitées avec le NiO NPs, cette augmentation est significative à 60, 80  $\mu\text{g/ml}$  de pré-traitement avec l'huile essentielles de *Pistacia* pendant 24 h. La pré-incubation avec l'huile de *Mentha* rehausse aussi l'activité de la SOD (Fig. 48, B).

### **9. Evaluation de l'activité catalase**

Un dosage colorimétrique du produit de l'oxydation du  $H_2O_2$ , non éliminé par la catalase (la résorufine) a été réalisé pour évaluer l'impact de traitements sur l'activité de cette enzyme. Les cellules A549 ont été incubées en absence ou en présence de NiO NPs ou d'huile essentielle de *Mentha* ou *Pistacia* utilisés à 10, 40  $\mu\text{g/ml}$  et 60, 80  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement, pendant 24 h. L'activité de la catalase a été exprimée en nmol/min/ml et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 49.

Tandis que l'activité catalase dans les cellules traitées par le NiO NPs est significativement inférieure à celle des cellules contrôles, une légère augmentation de cette activité est observée dans les cellules traitées par les différentes concentrations d'huiles essentielles (Fig. 49, A). Cette augmentation est significative avec *Mentha* (40  $\mu\text{g/ml}$ ) et avec *Pistacia* (80  $\mu\text{g/ml}$ ) comparativement aux cellules traitées par NiO NPs (Fig. 49, B).



**Figure 49:** Variation de l'activité CAT, (A) Effets de NiO NPs, huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* dans les cellules A549 pendant 24 h. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé comme un contrôle positif. (B) Huile essentielle de *M. spicata* et de *P. lentiscus* améliorent l'activité de la CAT réduite par NiO NPs. Les cellules ont été pré-exposées aux huiles essentielles puis aux NiO NPs pendant 24 h. \* $p < 0.05$  par rapport aux contrôles;  $\neq p < 0.05$  par rapport au NiO.

## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

## Discussion des résultats

Les NPs de NiO sont aujourd'hui de plus en plus présentes dans les objets qui nous entourent. Bien qu'il n'existe à ce jour, aucun syndrome relié directement à la présence de NiO chez l'homme, l'agence internationale de la recherche contre le cancer (IARC) a classifié ce polluant comme potentiellement carcinogène (IARC, 1990). Il est donc essentiel d'évaluer la toxicité de ces objets et de comprendre les propriétés physico-chimiques susceptibles d'influer sur celle-ci. Les études *in vivo* sur des sujets humains sont très limitées pour des questions de faisabilité, les effets pouvant être masqués par d'autres facteurs (pollution, tabagisme.etc). La recherche toxicologique se tourne en conséquence vers des modèles comme les cellules humaines en culture. Ce type de modèle permet également de disséquer les mécanismes métaboliques intervenant après introduction de NPs dans leur milieu. Le choix de la lignée cellulaire alvéolaire A549 découle du fait que le compartiment alvéolaire est la zone du tractus respiratoire la plus touchée par le dépôt et l'accumulation de nanomatériaux (Geiser et Kreyling, 2010; Paur *et al.*, 2011).

Il faut aussi mentionner ici les propriétés des NPs à produire les ERO qui sont souvent à la base de la toxicité que l'on porte aux NPs de NiO. Dans le corps humain, les ERO sont naturellement fabriquées lors des processus métaboliques. Cependant, leur présence en quantités anormalement élevées dans les cellules peut entraîner des dommages parfois irréversibles (Yin *et al.*, 2012). Le stress oxydant, cause de plusieurs maladies, suscite la recherche de nouveaux remèdes antioxydants. Dans cette optique, l'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de deux plantes utilisées dans la pharmacopée algérienne a été réalisée. Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

### 1. Rendement et composition en huile essentielle

Le rendement de *M. spicata* en huile était 2.16 %, plus haut de ceux trouvés dans d'autres régions, Bejaia avec un rendement de 1.1% (Brahmi *et al.*, 2016), Setif de 0.9% (Boukhebt *et al.*, 2011) et Saida de 1.3% (Allali *et al.*, 2013). Ces variations de

teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment le climat, la période de récolte et la méthode d'extraction. La quantité en huile essentielle de *P. lentiscus* est semblable à celle trouvée dans la littérature (Dob *et al.*, 2006; Gardeli *et al.*, 2008). D'autre part, on remarque que la composition chimique d'huile essentielle des deux espèces étudiée est presque la même obtenue dans d'autres travaux mais à des proportions différentes. Alors que l'espèce *M. spicata* est dotée d'une prédominance des composés monoterpéniques oxygénés (Boukhebt *et al.*, 2011; Allali *et al.*, 2013), l'espèce *P. lentiscus* est riche en composés sesquiterpéniques hydrocarbonés (Dob *et al.*, 2006; Gardeli *et al.*, 2008). Ces résultats confirment l'identité des chémotypes utilisés dans cette étude.

## 2. Activité antioxydante

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des huiles essentielles des plantes choisies. D'après nos connaissances et à ce jour là, nous sommes les premiers ont évalué les propriétés antioxydantes d'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior *et al.*, 2005). Pour cette raison, nous avons combiné quatre techniques complémentaires.

En effet, l'huile essentielle de *M. spicata* révèle une activité à piéger les radicaux DPPH• ( $CI_{50} = 351 \pm 0.032 \mu\text{g/ml}$ ),  $O_2^{\bullet-}$  ( $CI_{50} = 566 \pm 0.047 \mu\text{g/ml}$ ) et le radical cation ABTS<sup>•+</sup> ( $0.359 \pm 0.037 \mu\text{mol Trolox/mg}$ ). A concentration 1 mg/ml, le pouvoir réducteur du fer de cette huile est  $238.66 \pm 35.36 (\mu\text{g GAE équivalent/g})$ . Ces activités sont moins efficaces que ceux de l'acide ascorbique et le BHT.

L'huile essentielle de *M. spicata* a été rapportée de réduire le DPPH à 50% d'une part, et les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) aux ions ferreux correspondants ( $Fe^{2+}$ ), atteignant une réduction de 50% avec une valeur  $RP_{50}$  de  $452,3 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$  d'autre part (Brahmi *et al.*, 2016). Mkaddem *et al.* (2009) ont montré que l'huile essentielle de la menthe verte était plus efficace à balayer les radicaux ABTS<sup>•+</sup> avec une  $CI_{50}$  de  $195.1 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$  qu'au DPPH• ( $3476,3 \mu\text{g/ml}$ ). Des travaux de de Kizil *et al.* (2010) et Nickavar *et al.* (2008) ont également constaté que l'huile essentielle de *M. spicata* réduisait la concentration du radical libre de DPPH, avec une  $CI_{50}$  de 77,4 et 87,89  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.



Dans la présente étude, l'extrait des feuilles de *P. lentiscus* possède une capacité à balayer les radicaux DPPH et  $O_2^{\bullet-}$  dont la  $CI_{50}$  égale à  $640 \pm 0.16$  et  $760 \pm 0.125$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. De plus, à concentration 1 mg/ml, cette huile essentielle a pu piéger le radical ABTS $^{\bullet+}$  ( $0.247 \pm 0.023$   $\mu\text{mol Trolox/mg}$ ) et réduire le fer ( $153.33 \pm 32.44$   $\mu\text{g GAE équivalent/g}$ ). Comparativement aux contrôles positifs, ces valeurs restent toujours inférieures.

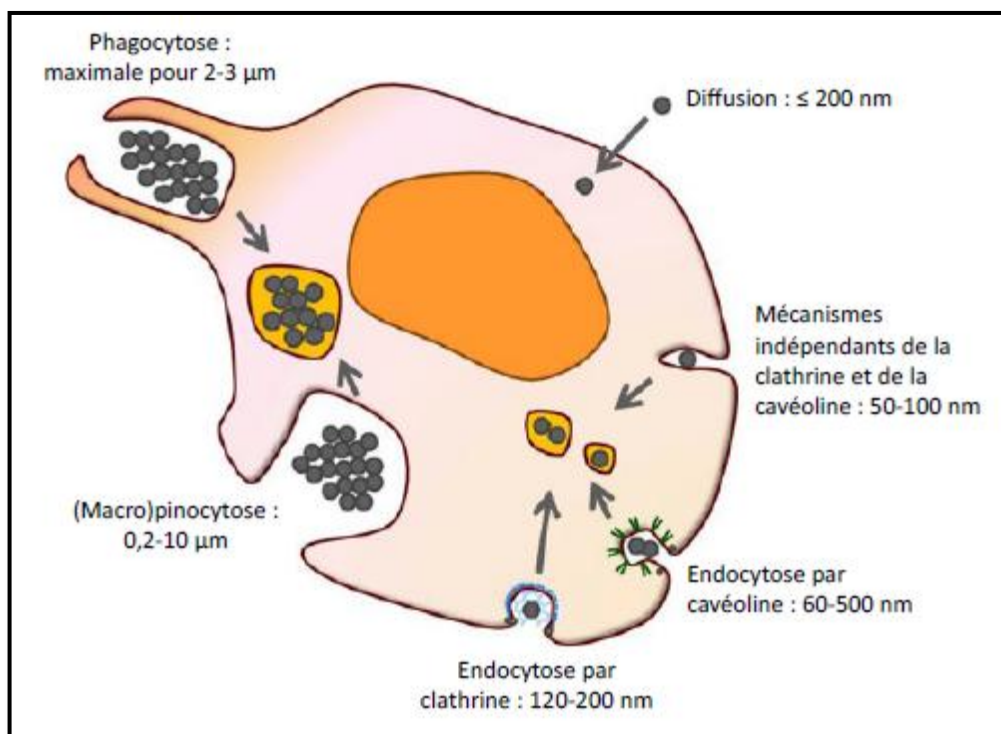
Certains auteurs ont mentionné que les extraits des feuilles du pistachier ont un pouvoir antioxydant très intéressant, même meilleure que celui des antioxydants de synthèse. Atmani et al. (2009) ont étudié ce pouvoir en utilisant plusieurs solvants (éthanol, éthyle acétate, hexane et chloroforme) par le test DPPH. Ces extraits ont été comparés au BHA. Leur travail montre que tous les extraits, à l'exception de celui du chloroforme, possèdent une très forte activité (jusqu'à 90%) à balayer ce radical, équivalent à celle de BHA (89%). Dans une étude effectuée par Benhamou et al. (2007), l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique des feuilles a été évaluée par rapport au radical DPPH et comparée à l'acide ascorbique et au Trolox. Les résultats ont révélé une activité puissante.

En se référant à la bibliographie, il n'y a pas des publications (d'après notre recherche) scientifiques qui ont étudié l'activité antioxydante d'huile essentielle de *P. lentiscus*.

### 3. Protocole de dispersion des NPs

Le protocole de dispersion des NPs de NiO utilisé ici réduit l'agglomération des NPs, dans l'eau, mais aussi dans le milieu d'exposition. En effet le diamètre hydrodynamique après dilution dans le milieu d'exposition, i.e. du DMEM, est ici de  $288,1 \pm 7.04$  nm. Sans sonication préalable, ce diamètre est, à 100  $\mu\text{g/mL}$ , supérieur à 1  $\mu\text{m}$  pour le  $\text{TiO}_2$  NPs (Ji *et al.*, 2010) et le ZnO NPs (Deng *et al.*, 2009). Notre protocole de dispersion permet donc de diminuer l'écart de taille des NPs observé entre un milieu sans et avec sonication. Dans notre modèle, l'état d'agglomération constaté laisse supposer que la (macro)pinocytose pourrait jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes d'internalisation des NPs (Bruinink *et al.*, 2015). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les NPs internalisées s'accumulent dans le cytoplasme principalement sous la forme de vésicules cytoplasmiques, pouvant résulter d'un processus d'endocytose (Simon-Deckers *et al.*, 2008). Cependant,

l'observation de quelques NPs sous forme libre suggère tout de même l'existence d'autres mécanismes d'internalisation, comme par exemple la diffusion à travers les membranes (Fig.50) (Bruinink *et al.*, 2015).



**Figure 50** : Principaux modes d'internalisation des nanomatériaux dans les cellules en fonction de leur taille primaire ou de celle de leurs agrégats/agglomérats (Bruinink *et al.*, 2015).

#### 4. Effets de NiO NPs et des huiles essentielles sur l'activité mitochondriale et la viabilité cellulaire

Les fonctions des mitochondries incluent la phosphorylation oxydative nécessaire pour la production de l'ATP, mais elles jouent aussi des rôles importants dans l'homéostasie ionique, dans plusieurs voies métaboliques, dans l'apoptose et la mort cellulaire en général et dans la production et la dégradation des espèces réactives de l'oxygène (Brinton, 2008; Flint Beal, 2008).

L'étude de prolifération a montré que l'augmentation de la concentration en NPs a ralenti la prolifération des cellules jusqu'à leur mort ( $CL_{50} = 79.83 \mu\text{g/ml}$ ). Dans l'intervalle des concentrations étudiées, la toxicité des NPs de NiO est donc dose dépendante. La diminution de l'activité succinate deshydrogénase par l'intermédiaire du MTT a conduit à envisager des altérations mitochondriales sous l'effet des NPs. En accord avec les résultats obtenus, en utilisant le test MTT, une diminution de la

prolifération cellulaire a été révélée sur des cellules alvéolaires A 549 (Ahamed, 2011; Capasso *et al.*, 2014).

Selon l'institut national du cancer (USA), les extraits bruts des végétaux sont considérés comme étant cytotoxiques lorsque leurs valeurs IC<sub>50</sub> sont inférieures à 30 µg/ml (Gomide *et al.*, 2013). Après un grand triage, les concentrations d'huiles essentielles du pistachier (60 et 80 µg/ml) et de la menthe (10 et 40 µg/ml) ont été sélectionnées en raison de leurs meilleures cytoprotection activités. En plus des résultats obtenus, aucun effet toxique n'est détecté dans ce modèle de lignée cellulaire exposé à chacune des huiles testées. Compte tenu du rôle majeur que jouent les mitochondries dans le mode de mort cellulaire déclenché par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Remila *et al.*, 2016), l'influence de pré-traitement des cellules THP-1 par des extraits de *P. lentiscus* sur les fonctions mitochondriales a été étudiée. D'autre part, Zu *et al.* (2010) ont montré que l'huile essentielle de *M. spicata* ne présentait aucune activité cytotoxique sur les cellules tumorales pulmonaires (A549) et mammaires (MCF-7). En outre, parmi les extraits et l'huiles essentielles de six espèces de menthe provenant de l'Iran, l'huile essentielle de *M. spicata* a eu la faible activité prolifératrice vis-à-vis de la lignée cellulaire Hep2 (Rahimifard *et al.*, 2010).

## 5. Effets sur le stress oxydant

Le stress oxydant fait partie des principaux effets toxiques des NPs rapportés dans la littérature. Les preuves du déclenchement d'un stress oxydant par les NPs se traduisent principalement par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), une diminution des réserves cellulaires en antioxydants (glutathion, SOD, catalase, etc.), une oxydation des molécules biologiques (peroxydation des lipides en particulier) et le fait que le prétraitement avec des antioxydants diminue l'amplitude de ces effets (Johnston *et al.*, 2009; Kermanizadeh *et al.*, 2014).

Dans la présente étude, la quantité intracellulaire d'ERO produites au cours du traitement des A549 par les NPs de NiO, à 80 et 100 µg/ml, a été déterminée par coloration au H<sub>2</sub>DCFDA. A ces concentrations une surproduction significative d'ERO intracellulaire et mitochondriale a été révélée dans les cellules. Les effets toxiques de NiO NPs ont été étudiés dans différents types de cellules humaines, principalement les cellules du foie et des voies aériennes. Dans une étude sur les cellules BEAS-2B et

A549, une augmentation significative d'ERO après 45 min d'exposition a été enregistrée (Capasso *et al.*, 2014). D'autres études *in vitro* ont également montré que plusieurs types des NPs de nickel étaient capables d'induire un stress oxydant significatif par le biais d'une production accrue d'ERO dans les cellules exposées (Nickavar *et al.*, 2008; Ahamed, 2011; Siddiqui *et al.*, 2012).

D'autre part, nous avons noté que la pré-incubation de cellules avec l'huiles essentielles des deux plantes a aboutit à une réduction significative dans la production d'ERO. Il a été postulé que les phénols des végétaux peuvent se comporter comme des balayeurs d'ERO, des chélateurs de métaux et des modulateurs d'enzymes; et d'empêcher donc la peroxydation des lipides (Rodrigo & Bosco, 2006). L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *M. spicata* est probablement due à la présence de la grande quantité de composés oxygénés (Brahmi *et al.*, 2016). Certains composés tels que les phénylpropanoïdes, les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont doués d'activité inhibitrice de l'oxydation (Ruberto *et al.*, 2000). Ainsi, le Carvone, le composant majeur d'huile essentielle de *M. spicata* (71,02%), a été rapporté de réduire le DPPH avec IC<sub>50</sub> de 19,4 ± 1,0 (Hussain *et al.*, 2010). Concernant *P. lentiscus*, le pouvoir antioxydant de son huile essentielle est probablement dû à la présence du terpinen-4-ol et à l'effet synergétique des composants présents dans cette huile. En accord avec nos résultats, le prétraitement des cellules THP-1 par des extraits de *P. lentiscus* pendant 24 h a efficacement protégé ces cellules contre les dommages de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Remila *et al.*, 2015).

Comme le stress oxydant résulte d'un déséquilibre de la balance pro-oxydant/anti-oxydant, nous avons procédé à une évaluation du système anti-oxydant suite au traitement des cellules A549 avec le NiO NP. La surproduction des ERO révélée après traitement aux NiO NPs est associée à une diminution des défenses anti-oxydantes intracellulaires, en particulier l'activité catalase et SOD, soulignant l'activité pro-oxydante potentielle des nanoparticules de NiO. La diminution de l'activité de la SOD et la catalase est concomitante à la surproduction du O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ce qui peut être à l'origine de l'oxydation des composants cellulaires majeurs comme les lipides, les protéines et l'ADN causant leurs inactivations et leurs dégradations ultérieures (Das *et al.*, 2001). Ceci est en accord avec des études antérieures, réalisées sur des cellules

neurones murins HT22 et des souris intoxiquées en présence de NPs (Li *et al.*, 2012; Niska *et al.*, 2015).

L'activité de ces enzymes a été améliorée dans les cellules prétraitées par les huiles essentielles utilisées à différentes concentrations. Conformément à nos résultats, Des études similaires ont été réalisées dont l'objectif était de démontrer l'aptitude d'huiles essentielles des plantes aromatiques à moduler le système enzymatique endogène (Li *et al.*, 2012; Porres-Martínez *et al.*, 2013, 2015).

**CONCLUSION  
ET PERSPECTIVES**

Cette étude porte, d'une part sur les mécanismes d'impact des NPs de NiO sur la prolifération cellulaire, la production des ERO et l'activité SOD et CAT et d'autre part, sur l'évaluation de la composition chimique, l'activité antioxydante et cytoprotective contre le NiO NP d'huiles essentielles extraites des feuilles de *M. spicata* et de *P. lentiscus*. Et ce, sur des cellules alvéolaires pulmonaires, en condition d'exposition *in vitro* submergée, dans du milieu de culture DMEM et pendant 24 h. Le choix de ces plantes est basé sur quelques données ethno-pharmacologiques (infections pulmonaires, asthme, troubles intestinaux, ulcère, infections microbiennes.etc).

L'étude phytochimique des deux plantes a permis de mettre en évidence la présence des anthocyanes, des leuco-anthocyanes, des flavonoïdes, des tanins, des terpènes et stérols ; et l'absence des alcaloïdes et des saponosides. Les deux huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation de type clevenger où le rendement était estimé à 0.42% et 2.16%, *Mentha* et *Pistacia* respectivement. L'analyse de l'huile essentielle de *M. spicata* par CG-SM a permis d'identifier 24 composés dont deux majeurs le Carvone (71.02%) et le Limonène (17.43%). Quant à celle de *P. lentiscus*, son huile essentielle est composée d'un mélange où les pourcentages sont très proches. Les composants majeurs étaient : terpinen-4-ol (11.89%), germacrene D (8.27%), sabinene (6.92%),  $\alpha$ -Pinene (5.97%) et caryophyllene (5.1%).

Par suite, nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antioxydantes des extraits de ces plantes par quatre techniques complémentaires. Les résultats obtenus nous amènent à conclure que les deux extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux à piéger les radicaux DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$ , O $_2\cdot$  et à réduire le fer. L'ordre décroissant des échantillons testés en termes d'activité était comme suit : Vit C > BHT > *M. spicata* > *P. lentiscus*.

En ce qui concerne la caractérisation morphologique et le comportement en solution de NiO NPs, l'analyse des clichés de MET révèle des NPs multiformes et une forte tendance à l'agrégation. Certaines particules ressemblent en effet à de petites sphères et d'autres à de petits cubes avec une taille moyenne de 25 nm. En outre, le potentiel Zêta de NiO NPs dans le milieu de culture est négatif et reste également proche de la valeur dans de l'eau déminéralisée ce qui nous amène à conclure que les particules peuvent être dispersées en solution sans craindre une floculation instantanée. Le DH a ensuite été mesuré et l'ensemble des résultats démontre qu'il n'existe pas des interactions particulières entre le milieu de culture et ces NPs.

Les résultats obtenus *in vitro* sur cellules pulmonaires humaines A549 cultivées en présence de NiO NPs et prétraitées ou non aux huiles essentielles de Mentha et Pistacia, nous amènent à avancer les conclusions suivantes :

- ✓ La présence des NPs a eu une influence sur la prolifération cellulaire. Les réponses observées dépendent de la dose d'exposition puisque l'augmentation de la concentration a intensifié l'effet des NPs jusqu'à la mort cellulaire ( $CL_{50}$  a été estimée à 79.83  $\mu\text{g/ml}$ ).
- ✓ Une rupture de l'équilibre RedOx a été mise en évidence chez les cellules exposées aux NPs. Celle-ci se caractérise par une augmentation des ROS et une diminution des activités SOD et CAT. L'utilisation d'imagerie à fluorescence a aussi permis d'observer l'intensité de production des ERO au sein des cellules.
- ✓ Aucun effet toxique n'est détecté dans ce modèle de lignée cellulaire exposé à chacune des huiles testées. En revanche, la pré-incubation de cellules en présence d'huiles essentielles des deux plantes a abouti à une réduction significative dans la production d'ERO et à une amélioration dans l'activité du système enzymatique endogène préalablement affecté par le NiO NP.

Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées :

- L'étude cytotoxique de NiO NPs *in vitro* seront prolongées en mesurant la peroxydation lipidique de la membrane ainsi que les biomarqueurs d'apoptose (l'activité caspase-3 et la fragmentation de l'ADN). Il serait aussi souhaitable de confirmer ces résultats par étude *in vivo*.
- Elargir le panel des activités antioxydantes de ces huiles essentielles *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire.
- Caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.



**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- ☞ Abdel-Rahman, AHY, Soad AMY. Mastic as antioxidant. *J Am Oil Chem Soc.* 1975;52:423.
- ☞ Accominotti M, Bost M, Haudrechy P, Mantout B, Cunat PJ, Comet F, Mouterde C, Plantard F, Chambon P, Vallon, J. J. Contribution to chromium and nickel enrichment during cooking of foods in stainless steel utensils. *Contact Dermatitis.* 1998;38(6):305–10.
- ☞ Adkins B, Richards JH, Gardner DE. Enhancement of experimental respiratory infection following nickel inhalation. *Environ Res.* 1979;20(1):33–42.
- ☞ Afssaps. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. 2008;1–18.
- ☞ Agrawal SJ, Srivastava AK, Chaudhry HS. Haematological Effects of Nickel Toxicity on a Fresh Water Teleost, *Colisa fasciatus*. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1979;45(3):215–7.
- ☞ Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol Vitro.* 2011;25(4):930–6.
- ☞ Ahamed M, Ali D, Alhadlaq HA, Akhtar MJ. Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). *Chemosphere.* 2013;93(10):2514–22.
- ☞ Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M., Diaz Barradas, M.C., Tirado, R., Clavijo, A., Garcia Novo F. Composition of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil.* 2004;230:175–83.
- ☞ Alessandra M. Grand guide des huiles essentielles. Hachette. Paris; 2008.
- ☞ Allali H, Chikhi I, Dib MA, Muselli A, Fekhi N, Meliani N, Meliani, N, Kamal MA, Tabti B, Costa, J. Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation. *Nat Prod an indian J.* 2013;9(6):258–63.
- ☞ Angelos, M.G., Kutala, V.K., Torres, C.A., He, G., Stoner, J.D., Mohammed, M., Oerannan K. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2006;290:341–7.
- ☞ Arbonnier M. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Versailles: Quae, MNHN; 2002. 576 p.
- ☞ Assimopoulou AN, Papageorgiou VP. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia species*. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed Chromatogr.* 2005;19(8):586–605.
- ☞ Atmani D, Chafer N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.* 2009;112(2):303–9.
- ☞ ATSDR (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry). Toxicological Profile for Nickel. US Public Heal Serv Agency Toxic Subst Dis Regist. 2005;(August):397.

- ☞ Azzouz K. Traitement thermodynamique du filtrat de feuille du mûrier noire (*Morus nigra*) et son application comme colle. Mémoire d'ingénieur. Université de Djelfa; 2005.
- ☞ Baba Aissa F. Flores d'Algérie et du Maghreb. Encyclopidie des plantes utiles. librairie moderne. Rouiba, Algérie; 1999.
- ☞ Baba Arbi H. Importance relative d'exploitation des plantes médicinales dans la pharmacopée traditionnelle à l'Est du Sahara septentrional (cas de Ouargla et Touggourt). Mémoire d'Ingénieur. Université de Ouargla; 2010.
- ☞ Bahaz, M, Rachdi H. Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhinetolepis lonadoides* Coss (Tichert). Mémoire d'Ingénieur. Université de Ouargla; 2010.
- ☞ Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446–75.
- ☞ Balan K V., Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine.* 2007;14(4):263–72.
- ☞ Balan K V., Demetzos C, Prince J, Dimas K, Cladaras M, Han Z, Wyche JH, Pantazis P. Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, chios mastic gum. *In Vivo (Brooklyn).* 2005;19(1):93–102.
- ☞ Barka S, Ben Attallah S. L'effet de deux plantes médicinales sur quelques Bactéries pathogènes. Mémoire d'Ingénieur. Université de Ouargla; 2010.
- ☞ Barus C. Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques. Thèse en Génie des procédés et environnement. Université-Toulouse 3; 2008.
- ☞ Baytop T. Therapy with medicinal plants in turkey (past and present). *1sted Istanbul Publ Istanbul Univ.* 1984;3255/40:305.
- ☞ Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 1997;272(32):19633–6.
- ☞ Belhadj S. Pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. Mémoire d'Ingénieur. Université de Djelfa; 2000.
- ☞ Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis Press, Paris; 1997. 764 p.
- ☞ Bellakhdar J. Le Maghreb à travers ses plantes : plantes, productions végétales et traditions au Maghreb. Fennec L, editor. Editions le Fennec. Casablanca (Maroc); 2003.
- ☞ Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R, Gardini F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 2004;52(23):6932–8.
- ☞ Benarous K. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes :  $\alpha$ -amylase, trypsine et lipase. Mémoire d'Ingénieur. Université Amar Telidji-Laghouat; 2009.

- ☞ Benayad N. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Rapport du programme: Homme et la Biosphère MAB et UNESCO; 2008.
- ☞ Bencko V, Geist T, Arbetova D, Dharmadikari DM, Svandova E. Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to some trace elements. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1986;30(1):1–10.
- ☞ Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. Afr J Pharm Pharmacol. 2008;2(2):22–8.
- ☞ Bensegueni A. Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brûlures. Thèse d'Etat en sciences vétérinaires. Université Mentouri de Constantine; 2007.
- ☞ Bentley RY, Trimen H. Medicinal plants. London: J. and A Churchill; 1980. 68 p.
- ☞ Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem. 1997;272(33):20313–6.
- ☞ Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. Anal Biochem. 1987;161(2):559–66.
- ☞ Bihari P, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F. Optimized dispersion of nanoparticles for biological *in vitro* and *in vivo* studies. Part Fibre Toxicol. 2008;5(1):14.
- ☞ BioVision Incorporate. 155 S. Milpitas Boulevard, Milpitas, CA 95035 USA.1800.
- ☞ Blondeau C, Sava P, Toubin G, Belon JP, Magnin P, Gillet M. Activités des enzymes antioxydantes plaquettaires au cours de l'artériopathie. 1987;35(8):1115–8.
- ☞ Bouguerra A. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de magister en sciences alimentaires. Université de constantine; 2012.
- ☞ Boukhebt H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H, Harzallah D. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. Der Pharm Lett. 2011;3(4):267–75.
- ☞ Bousbia N. Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Mémoire de Magistère. Option Sciences Alimentaires. INA, Algérie; 2004.
- ☞ Brahmi F, Adjaoud A, Marongiu B, Falconieri D, Yalaoui-Guellal D, Madani K, Chibane M. Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. J Essent Oil Res. 2016;28(3):211–20.
- ☞ Brian ML. The isolation of aromatic materials from plant products. R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem( USA); 1995. p. 57–148.
- ☞ Brinton RD. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. Trends in Neurosciences. 2008;31(10):529–37.
- ☞ Bruaux P, Lafontaine A. Exposition humaine aux éléments traces: Effets possibles sur la santé. Archives Belges De Medecine Sociate Hygiene Medecine Du Travail Et Medicine Legale. 1978;36:401–26.

- ☞ Bruinink A, Wang J, Wick P. Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. Arch Toxicol. 2015;89(5):659–75.
- ☞ Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier Tech, et doc Paris; 1999. p. 484–507.
- ☞ Buronzo AM. Le grand guide des huiles essentielles. HACHETTE P. 2008.
- ☞ Burrows CJ, Muller JG. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. Chem Rev. 1998;98(3):1109–52
- ☞ Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases. 2007;2(4):MR17–71.
- ☞ Capasso L, Camatini M, Gualtieri M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. Toxicol Lett. 2014;226(1):28–34.
- ☞ Caroline J. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète. Uninarsité Claude-Bernard- Lyon1; 2003.
- ☞ Carr a C, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). Circ Res. 2000;87(5):349–54.
- ☞ Chantal B. Toxicologie clinique. 5<sup>ème</sup> éd. Paris: Medecine-sciences Flammarion; 2000. 626 p.
- ☞ Charabot E, Dupont J, Pillet P. Les huiles essentielles et leurs principaux constituants. Paris: Librairie Polytechnique Ch. Beranger; 1899.
- ☞ Chashschin VP, Artunina GP, Norseth T. Congenital defects, abortion and other health effects in nickel refinery workers. Sci Total Environ. 1994;148 (2): 287-291.
- ☞ Chen CY, Wang YF, Huang WR, Huang YT. Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 2003;189(3):153–9.
- ☞ Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L, Lin J-K. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. Evidence-based Complement Altern Med. 2004;1(2):175–85.
- ☞ Chen K, Suh J, Carr A, Morrow J, Zeind J, Frei B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage *in vivo*, even in the presence of iron overload. Am J Physiol Metab. 2000;279(6):E1406–12.
- ☞ Chen R, Seaton A. A meta-analysis of painting exposure and cancer mortality. Cancer Detect Prev. 1998;22(6):533–9.
- ☞ Clemmensen OJ, Menné T, Kaaber K, Solgaard P. Exposure of nickel and the relevance of nickel sensitivity among hospital cleaners. Contact Dermatitis. 1981;7(1):14–8.
- ☞ Clemons GK, Garcia JF. Neuroendocrine effects of acute nickel chloride administration in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1981;61(3):343–8.
- ☞ Colleen M S, Allan D M, Michael AL. Basic Medical Biochemistry. Lippincott Williams &Wilkins; 205AD. p. 444–9.
- ☞ Cooke CLM, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. Cardiovasc Res. 2003;60(3):635–42.

- ☞ Cornell RG, Landis JR. Mortality patterns among nickel/chromium alloy foundry workers. IARC Sci Publ. 1984;(53):87–93.
- ☞ Costa M, Salnikow K, Sutherland JE, Broday L, Peng W, Zhang Q, Kluz T. The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. Mol Cell Biochem. 2002;234-235:265–75.
- ☞ Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000;88(1):170–5.
- ☞ Crump KS. Lung cancer mortality and diesel exhaust: Reanalysis of a retrospective cohort study of US railroad workers. Inhal Toxicol. 1999;11(1):1–17.
- ☞ Daldrup T, Haarhoff K, Szathmary SC. Fatal nickel sulfate poisoning. Beitr Gerichtl Med. 1983;41:141–4.
- ☞ Das KK, Das SN, DasGupta S. The influence of ascorbic acid on nickel-induced hepatic lipid peroxidation in rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2001;12(3):187–96.
- ☞ Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. Biochem Biophys Res Commun. 2003;305(3):761–70.
- ☞ De billerbeck VG, Roques C, Vaniere P, Marquier P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d’huile essentielle. Hygiène. 2002;10:248–51.
- ☞ De Maack, F, Sablier M. Couplage chromatographique avec la spectrométrie de masse. Technique de l’ingénieur. Anal caractérisation. 1994;1:2614–21.
- ☞ Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J. 1997;(1):1–18.
- ☞ Del Corso L, Pastine F, Protti MA, Romanelli AM, Moruzzo D, Ruocco L, Pentimone F. Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy home-living elderly. Panminerva Med. 2000;42(4):273–7.
- ☞ Deng X, Luan Q, Chen W, Wang Y, Wu M, Zhang H, Jiao Z. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. Nanotechnology. 2009;20(11).
- ☞ Djenane D, Meddahi A, Roncales P. Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. Sci Aliments. 2006;26:37–73.
- ☞ Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA, Roncalés P. Ability of  $\alpha$ -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. Food Chem. 2002;76(4):407–15.
- ☞ Dob T, Dahmane D, Chelghoum C. Chemical Composition of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. J Essent Oil Res. 2006;18(3):335–8.
- ☞ Dolovich J, Evans SL, Nieboer E. Occupational asthma from nickel sensitivity: I. Human serum albumin in the antigenic determinant. Br J Ind Med. 1984;41(0007-1072 (Print)):51–5.
- ☞ Dongmo PMJ, Tatsadjieu NL, Sonwa ET, Kuate J, Zollo PH a, Menut C. Antiradical potential and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Citrus latifolia* against *Phaeoramularia angolensis*. African J Biotechnol. 2008;7(22):4045–50.

- ☞ Dorantes L, Colmenero R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo ME, Fernandez E, Solano C. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *Int J Food Microbiol.* 2000;57(1-2):125–8.
- ☞ Dormer RL, Kerbey AL, McPherson M, Manley S, Ashcroft SJH, Schofield JG, Randle, PJ. The effect of nickel on secretory systems. Studies on the release of amylase, insulin and growth hormone. *Biochem J.* 1974;140(2):135–42.
- ☞ Dostal LA, Hopfer SM, Lin SM, Sunderman FW. Effects of nickel chloride on lactating rats and their suckling pups, and the transfer of nickel through rat milk. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989;101(2):220–31.
- ☞ Dotterud LK, Falk ES. Metal allergy in north Norwegian schoolchildren and its relationship with ear piercing and atopy. *Contact Dermatitis.* 1994;31(5):308–13.
- ☞ Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):305–11.
- ☞ Duke J. Nickel in Rocks and Ores. Nickel in environment. J.O. Nragu. John Wiley & Sons, New York; 1980. p. 51–66.
- ☞ Dung NT, Kim JM, Kang SC. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(12):3632–9.
- ☞ Dunnick JK, Elwell MR, Benson JM, Hobbs CH, Hahn FF, Haly PJ, Cheng YS, Eidson AF. Lung toxicity after 13-week inhalation exposure to nickel oxide, nickel subsulfide, or nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol Sci.* 1989;12(3):584–94.
- ☞ El Fadl A, Chtaina N. Etude de base sur la culture de la menthe au Maroc. Maroc; 2010.
- ☞ EPA. Nanotechnology white paper [Internet]. US Environmental Protection Agency, EPA 100/B-07/001. 2007. p. 136.
- ☞ Evans PH, Klinowski J, Yano E, Urano N. Alzheimer's disease: a pathogenic role for aluminosilicate-induced phagocytic free radicals. *Free Radic Res Commun.* 1989;6(8755-0199):317–21.
- ☞ Favier A. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin (Paris).* 2003;55:9–16.
- ☞ Fella S, Romadhane M, Abderraba M. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *J Soc Alg Chim.* 2006;16(2):193–202.
- ☞ Fetoui H, Garoui EM, Makni-ayadi F, Zeghal N. Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008;26(2):225–31.
- ☞ Fisher K, Rowe C, Phillips CA. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and on food. *Lett Appl Microbiol.* 2007;44(5):495–9.
- ☞ Fisher K, Phillips C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol.* 2008;19(3):156–64.

- ☞ Fletcher GG, Rossetto FE, Turnbull JD, Nieboer E. Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environmental Health Perspectives*. 1994. p. 69–79.
- ☞ Flint Beal M. Mitochondria and Neurodegeneration. *Mitochondrial Biology: New Perspectives*. 2008. p. 183–92.
- ☞ Fournier P. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. *Bulletin mensuel de la Société linnéenne de Lyon*. 1948.
- ☞ Frachomme P, Pénoël D. Matière médicale aromatique fondamentale- L'aromathérapie exactement. *Limoges*. 1990;4:317–446.
- ☞ France –Ida J. Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? *Info- essences*. 1998;1–2.
- ☞ Fridovich I. The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci*. 1998;7(12):2688–90.
- ☞ Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem*. 2008;107(3):1120–30.
- ☞ Garneau F. Le matériel végétal et les huiles essentielles. *Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation*. 2004;1–16.
- ☞ Garnier G, Bézanger-Beauquesne L, Debraux G. Ressources médicinales de la flore française. *Vigot frère. Paris*; 1961. 1511 p.
- ☞ Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV, Bydlowski SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(4):451–8.
- ☞ Gauche É, Hausswirth C. Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Sci Mot*. 2006;(58):43–66.
- ☞ Gausson H, Leroy JF, Ozenda P. *Précis de Botanique. 2–Les Végétaux Supérieurs. 2<sup>ème</sup> ed. Patis: Masson; 1982. 579 p.*
- ☞ Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7(1):2.
- ☞ Giner-Larza EM, Máñez S, Giner-Pons RM, Carmen Recio M, Ríos JL. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):61–9.
- ☞ Gitlitz PH, Sunderman FW, Goldblatt PJ. Aminoaciduria and proteinuria in rats after a single intraperitoneal injection of Ni(II). *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975;34(3):430–40.
- ☞ Gomide M da S, Lemos F de O, Lopes MTP, Alves TM de A, Viccini LF, Coelho CM. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. *Rev Bras Farmacogn*. 2013;23(6):895–902.
- ☞ Gramza A, Pawlak-Lema ska K, Korczak J, sowicz EW, Rudzinska M. Tea extracts as free radical scavengers. *Polish J Environ Stud*. 2005;14(6):861–7.
- ☞ Grudwag M. Embryology and fruit development in four species of *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *Bot J Linn Soc*. 1976;73(4):355–70.



- ☞ Guignard GL, Cosson L, Henry M. Abrégé de phytochimie. Paris ; New York : Masson; 1985. 224 p.
- ☞ Guignard JL, Dupont F. Botanique : Systématique moléculaire. 13<sup>ème</sup> ed. Paris: Masson; 2004.
- ☞ Haber LT, Diamond GL, Zhao Q, Erdreich L, Dourson ML. Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. Regul Toxicol Pharmacol. 2000;31(2 Pt 1):231–41.
- ☞ Haguenoer J, Leveque G, Frimat P. Dosage du chrome, du nickel et du cobalt dans les ciments du nord de la France et de Belgique en relation avec les dermatoses professionnelles. archives des maladies professionnelles et de l'environnement. 1982;43:241.
- ☞ Halbaoui A, Halbaoui M. Etude phytochimique et l'extraction des huiles essentielles de la *Menthe poivrée* (*Mentha piperita* L.) de la zone de Eledrissia : Contribution à la mise en évidence de l'activité antibactérienne. Mémoire d'Ingéniorat. Université de Djelfa; 2012.
- ☞ Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>rd</sup> Ed. Oxford University Press; 1999. p. 541–3.
- ☞ Harborne JB. Phytochemical Methods. J Chem Inf Model. 1998;3:317.
- ☞ Hekmat CM. Voies d'accumulation, et exploration physiologique de certains effets cytotoxiques du nickel sur la croissance générale et sur les fonctions rénale et sexuelle chez le rat pubère mâle et femelle. . Mémoire de DEA en écologie générale. Université de Sfax, Tunisie; 2001.
- ☞ Held P, Newick K. Using biotek's synergy™ HT reader to measure reactive oxygen species (ROS) generation in stimulated cells. Biotechniques. 2009;46(1):61–2.
- ☞ Hfaiedh N. Impact du jeûne intermittent sur les effets cytotoxiques du chlorure de Nickel chez le rat pubère. Univ-Sfax, Tunisie; 2002.
- ☞ Himed L, Merniz S, Barakat M. Algerian Journal of Natural Products essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon ) extraite par hydrodistillation. 2016;1:252–60.
- ☞ Hirano S, Shimada T, Osugi J, Kodama N, Suzuki KT. Pulmonary clearance and inflammatory potency of intratracheally instilled or acutely inhaled nickel sulfate in rats. Arch Toxicol. 1994;68(9):548–54.
- ☞ Hmimsa Y. L'agrobiodiversité dans les agrosystèmes traditionnels de montagnes : Cas du Rif marocain. Mémoire de troisième cycle. Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences-Tétouan, Maroc; 2004.
- ☞ Ho W, Furst A. Nickel excretion by rats following a single treatment. Proc West Pharmacol. 1973;16:245–8.
- ☞ Hu W, Feng Z, Tang MS. Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. Carcinogenesis. 2004;25(3):455–62.

- ☞ 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. *Environmental Health Perspectives*. 1994. p. 281–4.
- ☞ Hussain AI, Anwar F, Shahid M, Ashraf M, Przybylski R. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from pakistan. *J Essent Oil Res*. 2010;22(1):78–84.
- ☞ IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 49: Chromium, Nickel, and Welding. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1990;49:1–648.
- ☞ Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 1988;240(4857):1302–9.
- ☞ Ishimatsu S, Kawamoto T, Matsuno K, Kodama Y. Distribution of various Nickel Compounds in Rat Organs After Oral-Administration. *Biol Trace Elem Res*. 1995;49(1):43–52.
- ☞ Ji Z, Jin X, George S, Xia T, Meng H, Wang X, Suarez E, Zhang H, Hoek EMV, Godwin H, Nel AE, Zink JI. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol*. 2010;44(19):7309–14.
- ☞ Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6(1):33.
- ☞ Jordano P. Polinizacion y variabilidad de la produccion de semillas de *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae). *An del Jard Botánico Madrid*. 1989;45:213–31.
- ☞ Judd WS, Campbell CS, Kellog EA, Stevens P. *Botanique systématique*. SUPERIEUR DB, editor. De Boeck; 2002. 467 p.
- ☞ Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF. Étude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité antibactérienne. *Phytotherapie*. 2008;6(3):160–4.
- ☞ Kasprzak KS, Sunderman JrF W, Salnikowa K. Nickel carcinogenesis. *Mutation Res*. 2003;533: 67–97.
- ☞ Kebissi H. *Encyclopédie des herbes et médicinales*. Dar el kotob Al iliyah, Beyrout, Libanon; 2004. p. 566.
- ☞ Kehal F. *Utilization de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraiche*. Mémoire de magister en sciences alimentaire, option: biochimie et technologie alimentaire. Université Mentouri de Constantine; 2013.
- ☞ Kermanizadeh A, Chauché C, Brown DM, Loft S, Møller P. The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: A review. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(2):111–24.
- ☞ Khalil A. Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin e against atherosclerosis. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80(7):662–9.

- ☞ Kizil S, Haşimi N, Tolan V, Kiliç E, Yüksel U. Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). Turkish J F Crop. 2010;15(2):148–53.
- ☞ Klein CB, Kargacin B, Su L, Cosentino S, Snow ET, Costa M. Metal mutagenesis in transgenic Chinese hamster cell lines. Environmental Health Perspectives. 1994. p. 63–7.
- ☞ Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene YA, Millet J, Chaumont J. Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis -à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. Ann Médecine Vétérinaire. 2004;148:202–6.
- ☞ Krug HF, Wick P. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. Angew Chemie - Int Ed. 2011;50(6):1260–78.
- ☞ Kuda T, Iwai A, Yano T. Effect of red pepper *Capsicum annuum* var. conoides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and *Cecal microflora* in mice fed beef tallow. Food Chem Toxicol. 2004;42(10):1695–700.
- ☞ Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: The interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radic Biol Med. 2002;33(2):154–72.
- ☞ Kusmenoglu S, Baser KHC, Ozek T. Constituents of the essential oil from the hulls of *Pistacia vera* L. J Essent Oil Res. 1995;7(4):441–2.
- ☞ Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phyther Res. 2004;18(6):435–48.
- ☞ Laib I. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs seches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de magister en sciences alimentaires. Université Mentouri de Constantine; 2011.
- ☞ Laidani F, Damir F. Contribution à l'étude des HE de *Mentha poivrée*, de la région Djelfa, Test de l'activité antibactérienne et antifongique. Mémoire ingénieur en Agropastoralisme. Université de Djelfa; 2008.
- ☞ Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde J-P, Cedex B. III -Monoterpènes synthétases. Bull Soc Pharm Bordeaux. 1994;133:100–18.
- ☞ Lei YX, Chen JK, Wu ZL. Detection of DNA strand breaks, DNA-protein crosslinks, and telomerase activity in nickel-transformed BALB/c-3t3 cells. Teratog Carcinog Mutagen. 2001;21(6):463–71.
- ☞ Le Trequesser Q. Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées : localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire. Thèse en physico-chimie de la matière condensée. Université de Bordeaux; 2014.
- ☞ Li A, Han L, Han CC. Antioxidant and neuroprotective activities of essential oil, isolated from chinese herb pairs of *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. J Appl Pharm Sci. 2012;2(5):1–4.

- ☞ Li C-H, Shen C-C, Cheng Y-W, Huang S-H, Wu C-C, Kao C-C, Liao J-W, Kang J-J. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*. 2012;6(7):746–56.
- ☞ Lieutaghi P. *Le livre des bonnes herbes, leurs propriétés médicinales, leur usage culinaire, où les trouver et comment les cultiver*. Verviers : Marbout; 1966.384 p.
- ☞ Lin X, Costa M. Transformation of human osteoblasts to anchorage-independent growth by insoluble nickel particles. *Environmental Health Perspectives*. 1994. p. 289–92.
- ☞ Lucchesi ME. *Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles*. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, France; 2005.
- ☞ Mabberley DJ. *The Plant Book (A portable dictionary of the higher plants)*. Cambridge: University Press; 1987.
- ☞ Maenza MD, Pradhan AM, Sunderman FW. Rapid induction of sacromas in rats by a combination of nickel sulfide and 3,4-benzopyrene. *Cancer Res*. 1971;31:2067–71.
- ☞ Manel G. *Impact de la Spiruline et du Pissenlit sur le stress oxydant induit par le plomb chez le rat en période d'allaitement*. Mémoire de mastère en biologie moléculaire et cellulaire. Université de Sfax, Tunisie; 2008.
- ☞ Marzouk Z, Neffati A, Marzouk B, Chraief I, Khemiss F, Chekir-Ghedira L, Boukef K. Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisia *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *J Food Agric Environ*. 2006;4(3-4):61–5.
- ☞ Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999;32(8):595–603.
- ☞ Mathur AK, Datta KK, Tandon SK, Dikshith TS. Effect of nickel sulphate on male rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1977;17 (2): 241-248.
- ☞ Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J Med Plants Res*. 2008;2(11):321–30.
- ☞ McGuire WW, Spragg RG, Cohen AB, Cochrane CG. Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 1982;69(3):543–53.
- ☞ Mena P, Maynar M, Guttiez JM. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in biocycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sports Med*. 1991;12:563–6.
- ☞ Menard A, Drobne D, Jemec A. Ecotoxicity of nanosized TiO<sub>2</sub>. Review of in vivo data. *Environ Pollut*. 2011;159(3):677–84.
- ☞ Menne T, Solgaard P. Temperature dependent nickel release from nickel alloys. *Contact Dermatitis*. 1979;5(2):82–4.
- ☞ Mezzetti A, Pierdomenico SD, Costantini F, Romano F, De Cesare D, Cuccurullo F, Imbustaro T, Riario-Sforza G, Di Giacomo F, Zuliani G, Fellin, R. Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: Effect of aging and aging- related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(6):676–81.
- ☞ Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *J Food Sci*. 2009;74(7).

- ☞ Mogode D. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchd. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Bamako, Mali; 2005.
- ☞ Mohammedi Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Option: Produits naturels, activité biologique et synthèse. Université ABB-Tlemcen; 2006.
- ☞ Momponb A. Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction: CO<sub>2</sub>, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants. 4<sup>ème</sup> rencontre internationale de Nyons; 1994. p. 149–66.
- ☞ Montagnier L, Olivier R, Pasquier C. Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Marcel Dekker, New York: CRC Press; 1997. 576 p.
- ☞ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55–63.
- ☞ Mouffok S. Effets toxiques du chlorure de Nickel sur la déterminisme de la reproduction chez la rate gestante de souche Wistar. Mémoire de Magister en biologie cellulaire et physiologie animales. Université El Hadj Lakhdar-Batna; 2008.
- ☞ Munné-Bosch S, Peñuelas J. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under mediterranean field conditions. *Ann Bot*. 2003;92(3):385–91.
- ☞ Muñoz A, Costa M. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260(1):1–16.
- ☞ National Academy of Sciences (NAS). Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants: Nickel. National Research Council, NAS, Washington, DC. 1975;277.
- ☞ National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1-Trans-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol (CAS No. 1972-08-3) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1996;446(91):1–317.
- ☞ Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran J Pharm Res*. 2008;7(3):203–9.
- ☞ Nicolas C, Michaël H. La Microchimie. Techniques et expériences. Boeck D, editor. Bruscelles: De Boeck - Wesmael; 1999.
- ☞ Niska K, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicol Vitr*. 2015;29(4):663–71.
- ☞ Nouioua W. Biodiversité et ressources phyto-genétiques d'un ecosystème forestier *Paeoniamascula* (L) Mill. Mémoire de magister. Université ferhat abbas-Setif; 2012.
- ☞ Novey HS, Habib M, Wells ID. Asthma and IgE antibodies induced by chromium and nickel salts. *J Allergy Clin Immunol*. 1983;72(4):407–12.
- ☞ Nowack B, Mueller NC. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *EMPA Act*. 2008;(2008-2009):63.

- ☞ Obone É, Chakrabarti SK, Bai C, Malick MA, Lamontagne L, Subramanian KS. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in sprague-dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *J Toxicol Environ Heal - Part A*. 1999;57(6):379–401.
- ☞ Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*. 2007;18(12):1518–23.
- ☞ OMS IPCS. Environmental Health Criteria n° 108: nickel. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety. 1991 [cited 2017 Nov 29].
- ☞ Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health*. 2002;122(1):28–34.
- ☞ Ottolenghi AD, Haseman JK, Payne WW, Falk HL, MacFarland HN. Inhalation studies of nickel sulfide in pulmonary carcinogenesis of rats. *J Natl Cancer Inst*. 1975;54(5):1165–72.
- ☞ Ouelmouhoub S. Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier : cas des subéraies du Parc National d'El Kala. Mémoire de Master. Institut agronomique méditerranéen (Montpellier)-France; 2005.
- ☞ Ouraïni D, Agoumi A, Ismaïli-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M, Belabbas, M. A. Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytotherapie*. 2005;3(4):147–57.
- ☞ Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'Guessan YT, Figueredo G, Chalchat, JC. Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus Chim*. 2004;7(10-11):1081–6.
- ☞ Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr Diet*. 1986;44(6):307–15.
- ☞ Ozenda P. Flore du Sahara , 2<sup>ème</sup> ed Ch , Sauvage. 1978. 76-77 p.
- ☞ Paris R, Moyes H. Matière médical. 3<sup>ème</sup> ed. Masson. Paris; 1971.
- ☞ Paris M . Hurabielle M . Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1, Généralités, monographies. Paris ; New York : Masson; 1981. 339 p.
- ☞ Pauli A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int J Aromather*. 2001;11(3):126–33.
- ☞ Paur HR, Cassee FR, Teeguarden J, Fissan H, Diabate S, Aufderheide M, Kreyling WG, Hänninen O, Kasper G, Riediker M, Rothen-Rutishauser B, Schmid O. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung-A dialog between aerosol science and biology. *J Aerosol Sci*. 2011;42(10):668–92.
- ☞ Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer disease and oxidative stress. *J Biomed Biotechnol*. 2002;2002(3):120–3.
- ☞ Phung KT, Lemoel G, Garelik D, Hrault C, Durand D. Intoxicacion tabagique : Dosage de la cotinine urinaire. *L'eurobiologiste*. 1999;239:23–9.
- ☞ Pichard A, Bisson M, Houeix N. Nickel et ses dérivés. INERIS Fiche données Toxicol environnementales des Subst Chim. 2006;1–71.

- ☞ Porres-Martinez M, Gonzalez-Burgos E, Accame MEC, Gomez-Serranillos MP. Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Food Res Int.* 2013;54(1):523–31.
- ☞ Porres-Martínez M, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Protective properties of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil against oxidative stress-induced neuronal injury. *Food Chem Toxicol.* 2015;80:154–62.
- ☞ Poul S, Ferdinand P. *Guide des plantes médicinales.* 3<sup>ème</sup> ed. Paris; 1977.
- ☞ Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290–302.
- ☞ Prohaska J, Ganther H. Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;76(2):437–45.
- ☞ Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ Sci.* 2004;5(6):676–83.
- ☞ Quézel P, Santa S. *Nouvelle flore d'Algérie et des régions méridionales.* Paris: Edition CNRS; 1963. p. 786.
- ☞ Ragaini R, Ralsto H., Roberts N. Environmental trace metal contamination in kellogg, Idaho, near a lead smelting complex. *Environ Sci Technol.* 1977;11:773–81.
- ☞ Rahimifard N, Hajimehdipoor H, Hedayati M, Bagheri O, Pishehvar H, Ajani Y. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep2 Cell Lines. *J Med Plants. Journal of Medicinal Plants;* 2010;3(35):88–92.
- ☞ Rankin DWH. *CRC handbook of chemistry and physics, 89<sup>th</sup> edition,* edited by David R. Lide. *Crystallogr Rev.* 2009;15(3):223–4.
- ☞ Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231–7.
- ☞ Reichheld JP, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y. AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 2005;579(2):337–42.
- ☞ Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *ELSEVIER Mutat Res.* 1995;316:103–22.
- ☞ Remila S, Atmani-Kilani D, Delemasure S, Connat JL, Azib L, Richard T, Atmani D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med.* 2015;7(3):274–86.
- ☞ Rendall RE, Phillips JI, Renton KA. Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *Ann Occup Hyg.* 1994;38(6):921–30.
- ☞ Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 2006;142(3-4 SPEC. ISS.):317–27.

- ☞ Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 2008;19(7):681–7.
- ☞ Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJD. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Med*. 2000;66(8):687–93.
- ☞ Sachdev S, Davies KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):215–23.
- ☞ Samate-Abdoul D. Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso. Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou, Burkina Faso; 2001.
- ☞ Sandrine M. Les antioxydants et les membranes lipidiques. Université de Technologie de Compiègne, Cedex- France; 2013.
- ☞ Santucci B, Manna F, Cannistraci C, Cristaudo A, Capparella R, Bolasco A, Picardo M. Serum and urine concentrations in nickel-sensitive patients after prolonged oral administration. *Contact Dermatitis*. 1994;30(2):97–101.
- ☞ Sarkar B. Nickel metabolism. *Nickel in the Human Environment*. Lyon, France: IARC Scientific Publication; 1984. p. 367–84.
- ☞ Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med*. 1979;21(1):104–7.
- ☞ Scandalios JG. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005;38(7):995–1014.
- ☞ Schroeder HA, Balassa JJ, Tipton IH. Abnormal trace metals in man—Vanadium. *J Chronic Dis*. 1963;16(10):1047–71.
- ☞ Schuhmacher A, Reichling J SP. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*. 2003;10(6-7):504–10.
- ☞ Sebai, M., Boudali M. la phytothérapie entre la confiance et la méfiance. mémoire professionnel infirmier de la santé publique. Mémoire de fin d'étude. Institut de Formation Paramédicale de Chettia-Chlef; 2012.
- ☞ Seidemann J. *World Spice Plants Economic Usage, Botany, Taxonomy*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg; 2005. 592p.
- ☞ Senhaji O, Faid M, Kalalou I. Étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie*. 2006;4(1):24–30.
- ☞ Servais S. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone. Université Claude-Bernard- Lyon1; 2004.
- ☞ Sharma N, Tripathi A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World J Microbiol Biotechnol*. 2006;22(6):587–93.
- ☞ Sharma S, Sangwan NS, Sangwan RS. Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Curr Sci*. 2003;84(4):544–50.



- ☞ Shi ZC. Acute nickel carbonyl poisoning: a report of 179 cases. *Br J Ind Med.* 1986;43(6):422–4.
- ☞ Shirakawa T, Kusaka Y, Fujimura N, Kato M, Heki S, Morimoto K. Hard metal asthma: cross immunological and respiratory reactivity between cobalt and nickel? *Thorax.* 1990;45(4):267–71.
- ☞ Siddiqui MA, Ahamed M, Ahmad J, Majeed Khan MA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Alrokayan SA. Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):641–7.
- ☞ Silou T, Malanda M, Loubaki L. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* un plan factoriel complet 2 3. *J Food Eng.* 2004;65(2):219–23.
- ☞ Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'Hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carrière M. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology.* 2008;253(1-3):137–46.
- ☞ Smail-Saadoun N. Types stomatiques du genre *Pistacia*: *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *Atlantica* et *Pistacia lentiscus* L. 2005;371(183):369–71.
- ☞ Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(5):575–86.
- ☞ Spiegelberg T, Kordel W, Hochrainer D. Effects of NiO inhalation on alveolar macrophages and the humeral immune system in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1984;8:516–25.
- ☞ Sunderman FW, Hopfer SM, Sweeney KR, Marcus AH, Most BM CJ. Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1989;(191):5–11.
- ☞ Sunderman FW, Dingle B, Hopfer SM, Swift T. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. *Am J Ind Med.* 1988;14(3):257–66.
- ☞ Tiesjema B, Baars AJ. Re-evaluation of some human-toxicological maximum permissible risk levels earlier evaluated in the period 1991-2001. 2009.
- ☞ Valk EE, Hornstra G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int J Vitam Nutr Res.* 2000;70(2):31–42.
- ☞ Van HIM, Von BB, Boden D, Kraal G, Scheper R. Effects of oral exposure to nickel or chromium on cutaneous sensitization. *Curr Probl Dermatol.* 1991;20:237–41.
- ☞ Vandermoten S, Cusson M, Francis F, Haubruge E. La biosynthèse des isoprénoides chez les pucerons: une cible potentielle de nouveaux bio-insecticides. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2008;12(4):451–60.
- ☞ Verdú M, García-Fayos P. Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Can J Bot.* 1998;76(1):134–41.
- ☞ Viaud H. Les huiles essentielles et leur distillation. *Thérapeutique naturelle.* GNOMA. 1993. 924 p.

- ☞ Villar A, Sanz MJ, Payo M. Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. Int J Crude Drug Res. 1987;25:1–3.
- ☞ Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Perez-Álvarez J. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. J Food Saf. 2008;28(4):567–76.
- ☞ Vyskocil A, Senft V, Viau C, Cizkova M, Kohout J. Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds. Hum Exp Toxicol. 1994;13(4):257–61.
- ☞ Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radic Biol Med. 1999;27(5-6):612–6.
- ☞ Wang S, Paek D, Kim R, Cha B. Variation of Systolic Blood Pressure in Rats Exposed to Cadmium and Nickel. Environ Res. 2002;88(2):116–9.
- ☞ Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. Hypertension. 2004;44(4):381–6.
- ☞ Weisher CH, Oldiges H, Hochrainer D, Kordel W. Subchronic effects induced by NiO-inhalation in wistar rats. In mechanisms of toxicity and hazard evaluation. 1980. p. 555–8.
- ☞ WHO. Nickel. Environmental Health Criteria No. 108. World Health Organization. Geneva. 1991.
- ☞ Winkelhausen E, Kuzmanova S, Steiner W. Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. 2001;39(4):341–5.
- ☞ Wojtovich AP, Foster TH. Optogenetic control of ROS production. Redox Biol. 2014;2(1):368–76.
- ☞ Wolff SP, Bascal ZA, Hunt J V. “Autoxidative glycosylation”: free radicals and glycation theory. Prog Clin Biol Res [Internet]. 1989;304:259–75.
- ☞ Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA. Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. AJP - Lung Cell Mol Physiol. 2005;289(2):L159–73.
- ☞ Wolters M, Hermann S, Golf S, Katz N, Hahn A. Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. Eur J Clin Nutr. 2006;60(1):85–91.
- ☞ Woźniak K, Błasiak J. Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. Cell Mol Biol Lett. 2004;9(1):83–94.
- ☞ Wu LF, Navarro C, De Pina K, Quenard M, Mandrand MA. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* K-12 and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth. Environmental Health Perspectives. 1994. p. 297–300.
- ☞ Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP, Zhao B. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;263(1):81–8.
- ☞ Zastawny TH, Dabrowska M, Jaskolski T, Klimarczyk M, Kulinski L, Koszela A, Szczesniewicz M, Sliwinska M, Witkowski P, Olinski R. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. Free Radic Biol Med. 1998;24(5):722–5.

- ☞ Zeghad N. Etude du contenu poly-phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire magister (Ecole doctorale) en Biotechnologie végétale. Université Mentouri de Constantine; 2009.
- ☞ Zohary M. A monographic study of the genus *Pistacia lentiscus*. *Palest J Bot.* 1952;5:187–228.
- ☞ Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules.* 2010;15(5):3200–10.
- ☞ Anonyme 1. [accéder 13/06/2017]. Disponible sur:  
[http://search.babylon.com/?q=Extraction+et+analyse+d'une+essence+de+menthe&s=web&as=0&babsrc=HP\\_ss](http://search.babylon.com/?q=Extraction+et+analyse+d'une+essence+de+menthe&s=web&as=0&babsrc=HP_ss)
- ☞ Anonyme 2. [accéder 03/07/2017]. Disponible sur:  
[http://search.babylon.com/?q=FinalReportMOR&s=web&as=0&babsrc=HP\\_ss](http://search.babylon.com/?q=FinalReportMOR&s=web&as=0&babsrc=HP_ss)
- ☞ Anonyme 3. Infos spécialistes. 2006 [accéder 06/10/2017]. Valable de:  
<http://www.ceapharma.ch/romarin.html#info>
- ☞ Anonyme 4. [accéder 06/10/2017]. Disponible sur:  
[http://books.google.com/books?id=xW99y9ugUGkC&printsec=frontcover&dq=les+vertus&hl=fr&ei=hOUITqSdIcqphAfxkp29Aw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=9&sqi=2&ved=0CE4Q6AEwCA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=xW99y9ugUGkC&printsec=frontcover&dq=les+vertus&hl=fr&ei=hOUITqSdIcqphAfxkp29Aw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=9&sqi=2&ved=0CE4Q6AEwCA#v=onepage&q&f=false)
- ☞ Anonyme 5. [accéder 28/11/2017]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/wiki>

# ANNEXES

## Publications et Communications

### Publications

- **Khiari Mohamed**, Kechrid Zine, Klibet Fahim, Elfeki Abdelfattah, Shaarani Md. Sharifudin, Krishnaiah Duduku. NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of *Pistacia lentiscus* essential oil. *Toxicology reports* 5 (2018) 480–488.
- **Khiari M.**, Kechrid Z., Halbaoui A., Halbaoui M. (2018) Essential Oil of *Mentha Spicata* Leaves from Algeria: Chemical Composition and Antibacterial Activity. In: Kallel A., Ksibi M., Ben Dhia H., Khélifi N. (eds) *Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions*. EMCEI 2017. *Advances in Science, Technology & Innovation (IEREK Interdisciplinary Series for Sustainable Development)*. Springer, Cham
- Klibet F., Boumendjel A., **Khiari M.**, Elfeki A., Messarah M. (2015). Oxidative stress-related liver dysfunction by sodium arsenite: Alleviation by *Pistacia lentiscus* oil. *Pharmaceutical biology*.

### Communication orale

- **KHIARI, M., KECHRID, Z. 2015** - An investigation of enzymes activities in nickel toxicity of rats administrated magnesium sulphate. *5<sup>th</sup> International Conference on Chemical and Bioprocess Engineering*. Kota Kinabalu, Malaysia on 9<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> Decemer 2015.

### Communications affichées

- **KHIARI, M., KECHRID, Z., HALBAOUI, A., HALBAOUI, M. 2017** – Essential oil of *Mentha spicata* leaves from Algeria: chemical composition and antibacterial activity. *16<sup>th</sup> international days of biotechnology (IDB2017)*. HÔTEL MarcoPolo Concorde Hamammet, Tunisie : 18-22 Novembre 2017
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., GOUZI, H., KECHRID, Z. 2014** - An investigation of enzymes activities in nickel toxicity of albino (Wistar) rats administrated magnesium. *24<sup>ème</sup> forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB*. HÔTEL Chich Khan – Hamammet, Tunisie : 24-27 Mars 2014.
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., GOUZI, H., KECHRID, Z. 2013** - Contribution à l'étude de l'effet magnésium sur la toxicité du nickel chez les mâles Wistar. *24<sup>ème</sup> forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB*. HÔTEL El Mouradi Club Kantaoui – Sousse, Tunisie : 25-28 Décembre 2013.
- **KHIARI, M., KECHRID, Z. 2012** - An investigation of enzymes activities in nickel toxicity of albino (Wistar) rats administrated magnesium. *Les Journées Internationales de Biotechnologie*. HÔTEL Nour Palace – Mahdia, Tunisie : 19-22 Décembre 2012.

- **KHIARI, M., KECHRID, Z.** – Etude de l’influence du Magnésium sur la toxicité du Nickel chez les rats Wistar mâles. *Conférence Nationale sur La Dégradation de L’environnement*. Département des Sciences Fondamentales. Univ 20 AOUT 1955 –SKIKDA: 05 et 06 Juin 2012.
  
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., BOUHALIT, S., KECHRID, Z. 2011** - Contribution à l’étude de l’effet magnésium sur le métabolisme des rats Wistar mâles exposés au nickel. *3<sup>ème</sup> Séminaire International de Biologie Animal*. UNIV MENTOURI, Constantine: 09-11 Mai 2011.
  
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., BOUHALIT, S., KECHRID, Z. 2011** - Contribution à l’étude de l’effet magnésium sur le métabolisme des rats Wistar mâles exposés au nickel. *9<sup>ème</sup> Journée Nationales de Pharmacie*. UNIV HADJ LAKHDAR, Batna: 09 Juin 2011.
  
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., BOUHALIT, S., KECHRID, Z. 2010** - Contribution à l’étude de l’effet magnésium sur le métabolisme des rats Wistar mâles exposés au nickel. *Congrès International de sur les Matériaux et l’Environnement*. HOTEL SIDI FEDJ, Alger : 05-07 Octobre 2010.
  
- **KHIARI, M., HAMDIKHEN, M., BOUHALIT, S., KECHRID, Z. 2010** – Evaluation de la protection du magnésium contre l’effet toxique du nickel chez les rats mâles Wistar. *1<sup>er</sup> Congrès Maghrébin d’Immunologie*. HOTEL Safir – Mazafran, Zeralda, Alger : 05 et 06 Juin 2010.
  
- **KHIARI, M., KECHRID, Z. 2009** - Contribution à l’étude de l’effet magnésium sur le métabolisme des rats Wistar mâles exposés au nickel. *5<sup>ème</sup> Congres International de Biotechnologie de l’AMB, 20<sup>ème</sup> Journées Biologiques de l’ATSB*. Association Maghrebine de Biotechnologie. HOTEL KARTHAGO – Hammamet Yasmine, Tunisie : 22-25 Mars 2009.
  
- **KHIARI, M., KECHRID, Z. 2009** - L’effet du magnésium sur le métabolisme des rats Wistar mâles exposés au nickel. *2<sup>ème</sup> Colloque Francophone en Environnement et Santé*. Laboratoire d’Ecobiologie des Milieux Marins et Littoraux. Département des Sciences de la Mer. Univ Badji Mokhtar Annaba : 16-18 Mai 2009.
  
- **KHIARI, M., KECHRID, Z. 2009** - An investigation of enzymes activities in nickel toxicity of albino (Wistar) rats administrated magnesium sulphate. *Journée Mondiale de L’Environnement*. Département des Sciences Fondamentales. Univ 20 AOUT 1955 – SKIKDA : 07-08 Juin 2009.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Toxicology Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxrep](http://www.elsevier.com/locate/toxrep)

# NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of *Pistacia lentiscus* essential oil

Khiari Mohamed<sup>a,b</sup>, Kechrid Zine<sup>a</sup>, Klibet Fahima<sup>a</sup>, Elfeki Abdelfattah<sup>c</sup>, Shaarani Md. Sharifudin<sup>d</sup>, Krishnaiah Duduku<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Annaba, 23000 Annaba, Algeria

<sup>b</sup> Phytochemical Laboratory, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University Malaysia Sabah, 88400 Kota Kinabalu, Malaysia

<sup>c</sup> Laboratory of Ecophysiology Animal, Faculty of Science, University of Sfax, 3038 Sfax, Tunisia

<sup>d</sup> Faculty of Food Science and Nutrition, University Malaysia Sabah, 88400 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Nickel oxide nanoparticles  
Oxidative stress  
Cytotoxicity  
*Pistacia lentiscus*  
Essential oil

## ABSTRACT

Nickel oxide nanoparticles (NiO NPs) have attracted increasing attention owing to potential capacity to penetrate to several human cell systems and exert a toxic effect. Elsewhere, the use of medicinal plants today is the form of the most widespread medicine worldwide. Utilizing aromatic plants as interesting source of phytochemicals constitute one of the largest scientific concerns. Thus this study was focused to investigate antioxidant and cytoprotective effects of essential oil of a Mediterranean plant *P. lentiscus* (PLEO) on NiO NPs induced cytotoxicity and oxidative stress in human lung epithelial cells (A549). The obtained results showed that cell viability was reduced by NiO NPs, who's also found to induce oxidative stress in dose-dependent manner indicated by induction of reactive oxygen species and reduction of antioxidant enzymes activities. Our results also demonstrated that PLEO contains high amounts in terpinen-4-ol (11.49%), germacrene D (8.64%),  $\alpha$ -pinene (5.97%), sabinene (5.19%), caryophyllene (5.10%) and  $\delta$ -Cadinene (4.86%). PLEO exhibited a potent antioxidant capacity by cell viability improving, ROS scavenging and enhancing the endogenous antioxidant system against NiO NPs in this model of cells. The present work demonstrated, for the first time, the protective activity of PLEO against cell oxidative damage induced by NiO NPs. It was suggested that this plant essential oil could be use as a cells protector.

## 1. Introduction

The rapid development of nanotechnology has exposed man and his environment to a number of exotic metals. In the recent years, overgrowing nanotechnology industries have led to the large-scale production of engineered nanoparticles (NPs), especially the metal NPs, for various uses [1]. Nanoparticles are defined as particles with a diameter of less than 100 nm in one structural dimension. Compared to the same materials with micrometer scale dimensions, nanomaterials have specific properties, such as small size, large surface area, shape, and special structure [2].

NPs of many different metal oxides are currently being used in numerous applications, we give as examples: magnetic resonance imaging, drug delivery, electronics, catalysis, optical devices [3,4]; as well as consumer products like cosmetics, sunscreens, sports accessories, inks and pigments, etc. [5]. Due to the growing number of

applications and the recent development of combustion-based engine transportation [6], there is an increasing risk for human, environment and exposure to NPs. Their potential toxicological impacts are still a matter of investigation and our actual knowledge on the effects of nano-sized contaminants on biological systems remains incomplete [7]. Their use also (which is still largely unregulated) has become a recognized social health problem because the inhalation, dermal absorption or ingestion of particles of various sizes and compositions leads to increased rates of chronic respiratory and cardiovascular diseases [8].

Nickel oxide nanoparticles (NiO NPs) have attracted increasing attention owing to potential use in a variety of applications such as catalysts, solar cells, light-emitting diodes, lithium-ion batteries, resistive random access memory, electrochemical sensors and biosensors [9]. Therefore, increasing use of NiO NPs necessitates an improved understanding of their potential impact on the environment and human health. Besides, toxic effects of NiO NPs have been investigated in

\* Corresponding author.

E-mail address: [krishna@ums.edu.my](mailto:krishna@ums.edu.my) (K. Duduku).

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.012>

Received 13 September 2017; Received in revised form 28 February 2018; Accepted 19 March 2018

Available online 21 March 2018

2214-7500/ © 2018 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Table 1**  
Preliminary screening of leaves of *P. lentiscus*.

| Chemical groups    | <i>P. lentiscus</i> |
|--------------------|---------------------|
| Anthocyanins       | +                   |
| Leuco-Anthocyanins | +                   |
| Alkaloids          | –                   |
| Flavonoids         | +                   |
| Tannins            | +                   |
| Terpenoids         | +                   |
| Steroids           | –                   |

different human cell systems, mainly on liver and airway cells [10].

Oxidative stress, which is an imbalance between ROS (reactive oxygen species) production and the antioxidant systems favoring a ROS excess, has been identified as a common mechanism for cell damage. This imbalance can be amplified by aging, smoking, diseases and some kinds of food [11]. During oxidative stress, ROS are produced mainly from the mitochondrial electron transport chain. In addition, nanoparticles have been demonstrated to generate more free radicals and reactive oxygen species than larger particles, likely due to their higher surface area [12]. The inverse correlation between cell viabilities and the ROS level proved that oxidative stress is probably a key route by which nanoparticles induce cytotoxicity [11].

In recent years, focus on plant research has increased all over the world. Many plant extracts have demonstrated potent chemo-preventive properties; most of these extracts are known to exert their effects via antioxidant mechanisms either by quenching reactive oxygen species (ROS), inhibiting lipid peroxidation or by stimulating cellular antioxidant defenses [13,14].

*Pistacia lentiscus* L. also known as mastic tree, belongs to the family Anacardiaceae which consisting of more than eleven species [15]. It is largely distributed in the Mediterranean region ecosystems where it grows wild in Algeria, Tunisia, Morocco, Turkey, France, Spain, Italy and Greece [16]. Despite its limited distribution in the world, this plant is known internationally for several therapeutic properties. The aerial parts have been used in the treatment of hypertension and possess stimulant and diuretic properties [17]. According to Ali-Shtayeh et al. (1998) the leaves are extensively used in traditional medicine for the treatment of eczema, diarrhea, and throat infections, and as a potent antiulcer agent [18]. Several studies have also reported that essential oil from aerial parts possesses appreciable biological properties such as antioxidant [19,20], anti-inflammatory, antimicrobial [19], anti-fungal [21], and antiatherogenic [22].

Thus, this study was designed to evaluate the antioxidant activity of PLEO using *in vitro* tests complemented with a study of their cytoprotective activity against NiO NPs induced oxidative stress in human cell culture. To our knowledge, this is the first investigation using essential oil to reduce NPs inducing cytotoxicity.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant materials

The leaves of *P. lentiscus* were collected at the flowering stage from the mountains of Ouled Driss in Souk ahras (36°21'N, 8°07'E, 800 m) during 2013. The sample was dried in the shade away from light at room temperature. After drying, the sample was cut to very small parts with analytical mill, used for the extraction of essential oil. The identification of the investigated specie was confirmed by Laboratory of Valorization of Natural Biological Resources (Setif, Algeria), where a voucher specimen was deposited in a botanical collection.

### 2.2. Phytochemical analysis

The extract of *P. lentiscus* leaves (2–3 mg/ml) was subjected to a

**Table 2**  
Chemical composition of *Pistacia lentiscus* essential oil.

| No. | Compounds                                     | AI   | Percentage (%) |
|-----|---|------|----------------|
| 1   | Tricyclene                                    | 1007 | 0.2            |
| 2   | $\alpha$ -Pinene                              | 1027 | 5.97           |
| 3   | $\alpha$ -thujene                             | 1028 | 0.66           |
| 4   | Camphene                                      | 1064 | 0.81           |
| 5   | Hexanal                                       | 1077 | t              |
| 6   | $\beta$ -Pinene                               | 1097 | 1.26           |
| 7   | Sabinene                                      | 1115 | 5.19           |
| 8   | verbenene                                     | 1118 | t              |
| 9   | $\delta$ -3-Carene                            | 1144 | t              |
| 10  | 2-Heptanone                                   | 1157 | 0.11           |
| 11  | $\alpha$ -Phellandrene                        | 1168 | 1.74           |
| 12  | $\alpha$ -Terpinene                           | 1189 | 1.04           |
| 13  | Limonene                                      | 1199 | 3.14           |
| 14  | 2-Hexenal                                     | 1227 | 0.14           |
| 15  | $\gamma$ -Terpinene                           | 1249 | 1.77           |
| 16  | $\beta$ -Ocimene                              | 1251 | 0.10           |
| 17  | Styrene                                       | 1263 | t              |
| 18  | o-Cymene                                      | 1272 | 1.94           |
| 19  | $\alpha$ -Terpinolene                         | 1279 | 0.66           |
| 20  | Isopentyl isovalerate                         | 1296 | 0.19           |
| 21  | (E)-2-octenal                                 | 1321 | t              |
| 22  | 2-Nonanone                                    | 1386 | 0.14           |
| 23  | Nonanal                                       | 1391 | 0.10           |
| 24  | $\beta$ -thujone                              | 1429 | t              |
| 25  | $\alpha$ -Cubebene                            | 1437 | 0.15           |
| 26  | $\alpha$ -Longipinene                         | 1451 | t              |
| 27  | Isopentyl hexanoate                           | 1457 | 0.55           |
| 28  | 2,4-Heptadienal                               | 1461 | 0.32           |
| 29  | $\alpha$ -Ylangene                            | 1469 | t              |
| 30  | $\alpha$ -Copaene                             | 1478 | 1.88           |
| 31  | $\beta$ -Bourbonene                           | 1503 | t              |
| 32  | Benzaldehyde                                  | 1519 | 0.10           |
| 33  | 2-Nonanol                                     | 1533 | 0.15           |
| 34  | $\beta$ -Cubebene                             | 1537 | 0.76           |
| 35  | <i>cis</i> - $\beta$ -Terpineol               | 1562 | 0.10           |
| 36  | Pinocarvone                                   | 1574 | 0.21           |
| 37  | 1-Terpineol                                   | 1583 | 0.80           |
| 38  | Bornyl acetate                                | 1600 | 1.14           |
| 39  | Caryophyllene                                 | 1621 | 5.10           |
| 40  | Aromadendrene                                 | 1631 | 0.67           |
| 41  | Terpinen-4-ol                                 | 1604 | 11.49          |
| 42  | 2-Decenal                                     | 1641 | t              |
| 43  | <i>trans</i> -Pinocarveol                     | 1653 | 0.27           |
| 44  | $\alpha$ -Humulene                            | 1657 | 1.52           |
| 45  | $\beta$ -Farnesene                            | 1672 | 0.16           |
| 46  | $\alpha$ -Amorphene                           | 1681 | 1.82           |
| 47  | Viridiflorene                                 | 1685 | t              |
| 48  | $\beta$ -Bisabolene                           | 1726 | t              |
| 49  | Verbenone                                     | 1730 | 0.39           |
| 50  | Germacrene D                                  | 1735 | 8.64           |
| 51  | $\alpha$ -Selinene                            | 1740 | 0.55           |
| 52  | $\beta$ -Selinene                             | 1743 | 0.51           |
| 53  | $\alpha$ -Murolene                            | 1747 | 1.28           |
| 54  | Carvone                                       | 1752 | 2.72           |
| 55  | Cyclopentadiene                               | 1754 | 0.48           |
| 56  | Naphthalene                                   | 1766 | 2.02           |
| 57  | $\delta$ -Cadinene                            | 1768 | 4.86           |
| 58  | $\beta$ -Sesquiphellandrene                   | 1775 | t              |
| 59  | $\gamma$ -Curcumene                           | 1779 | 0.41           |
| 60  | Myrtenol                                      | 1794 | 0.39           |
| 61  | 2-Tridecanone                                 | 1804 | 0.47           |
| 62  | Germacrene B                                  | 1808 | t              |
| 63  | <i>cis</i> -(Z)- $\alpha$ -Bisabolene epoxide | 1814 | 0.16           |
| 64  | <i>cis</i> -Calamenene                        | 1819 | 0.21           |
| 65  | <i>trans</i> -Carveol                         | 1836 | 0.26           |
| 66  | p-Cymen-8-ol                                  | 1851 | 0.82           |
| 67  | <i>exo</i> -2-Hydroxycineole                  | 1858 | t              |
| 68  | <i>cis</i> -Carveol                           | 1867 | 0.15           |
| 69  | $\alpha$ -Calacorene                          | 1902 | 0.23           |
| 70  | $\beta$ -Ionone                               | 1927 | t              |
| 71  | Caryophyllene oxide                           | 1961 | 1.76           |
| 72  | Salvial-4(14)-en-1-one                        | 1985 | 0.17           |
| 73  | $\beta$ -Oploplene                            | 2017 | 0.12           |
| 74  | Globulol                                      | 2061 | t              |

(continued on next page)



**Table 2** (continued)

| No.                        | Compounds               | AI   | Percentage (%) |
|----------------------------|-------------------------|------|----------------|
| 75                         | Spathulenol             | 2114 | 1.12           |
| 76                         | $\tau$ -Muurolol        | 2177 | 0.72           |
| 77                         | $\delta$ -Cadinol       | 2190 | 0.47           |
| 78                         | Nonanoic acid           | 2197 | 0.28           |
| 79                         | $\alpha$ -Bisabolol     | 2211 | 0.28           |
| 80                         | $\alpha$ -Cadinol       | 2221 | 1.27           |
| 81                         | Acenaphthylene          | 2237 | 0.47           |
| 82                         | Dehydroaromadendrene    | 2283 | 0.41           |
| 83                         | Alloaromadendrene oxide | 2326 | 0.15           |
| 84                         | 12-Norcyercene-B        | 2345 | 0.23           |
| 85                         | E,E-Farnesal            | 2366 | 0.30           |
| 86                         | Vilgarol B              | 2416 | t              |
| 87                         | Benzoic acid            | 2448 | 0.64           |
| 88                         | Ascabiol                | 2609 | 0.16           |
| 89                         | Palmitic acid           | 2940 | 0.14           |
| Total                      |                         |      | 85.59          |
| Monoterpene hydrocarbons   |                         |      | 24.48          |
| Sesquiterpene hydrocarbons |                         |      | 29.16          |
| Monoterpenes oxygenated    |                         |      | 17.6           |
| Sesquiterpenes oxygenated  |                         |      | 6.52           |
| Other                      |                         |      | 7.83           |

AI: Arithmetic Index; t: trace (< 0.1%).

Bold numbers in table are the main compounds present in *Pstacia lentiscus* essential oil (PLEO).

preliminary phytochemical analysis for the detection of different chemical groups by using different tests and the results are presented in Table 1 [23].

### 2.3. Extraction, isolation and identification of PLEO

100 g of leaves were separately hydrodistilled for 3 h using a clevenger-type apparatus. Then the essential oil was dried using anhydrous sodium sulphate and stored in sterile glass vial at 4 °C until analyses. The yield of oil was calculated depending on the fresh weight of plant materials.

### 2.4. GC analysis

GC analysis was performed on a 6890 series instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) standard model with Flame Ionization Detectors (FID) using the following conditions: fused silica capillary column with a polar stationary phase HP-INNOWax (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film, polyethylene glycol). Helium used as a carrier gas at a flow rate of 0.5 ml/min, injector and detector temperature are 250 and 280 °C, respectively. The splitless injection mode was used with injection volume of 1  $\mu$ l diluted in hexane 1%. The oven temperature was programmed at 60 °C for 8 min, and then progressed to 270 °C at 2 °C/min.

**Table 3**

Antioxidant effect on DPPH radicals, superoxide radicals, scavenging ability on ABTS radicals and reducing power of *P. lentiscus* essential oil.

|               | Scavenging ability on DPPH radicals (IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL) | Scavenging ability on superoxide radicals (IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL) | Scavenging ability on ABTS radicals ( $\mu$ mol Trolox/mg) | Reducing power ability ( $\mu$ g GAE equivalent/g) |
|---------------|---|---|--|--|
| PLEO          | 640 $\pm$ 0.16  | 760 $\pm$ 0.125   | 0.247 $\pm$ 0.023  | 153.33 $\pm$ 32.44                                 |
| Ascorbic acid | 40  | 120 $\pm$ 0.005   | 1.172 $\pm$ 0.016  | 731.33 $\pm$ 24.44                                 |
| BHT           | 58 $\pm$ 0.003  | 108 $\pm$ 0.002   | 1.072 $\pm$ 0.014  | 620 $\pm$ 29.61                                    |

Values are expressed as mean  $\pm$  SD of three measurements. GAE: acid galic.

### 2.5. GC–MS analysis

GC/MS (EI mode, scan range of  $m/z$  50–550 and ionization energy of 70 eV) data were measured on the same gas chromatograph coupled with MSD 5975. MS source temperature at 230 °C; MS quadrupole temperature at 150 °C; MSD transfer line was maintained at 280 °C. The HP-INNOWax capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m film thickness) was directly coupled to the MS; the other parameters were the same as with GC analysis.

Identification of components was made on the basis of their Arithmetic Index (AI) calculated following Van den Dool and Kratz [24] using a series of *n*-alkane (C<sub>10</sub>–C<sub>30</sub>) mixtures, and by computerized matching of the acquired mass spectra with those stored in the data bank (Wiley/NBS library) and the literature [25–27].

### 2.6. Antioxidant activity assays

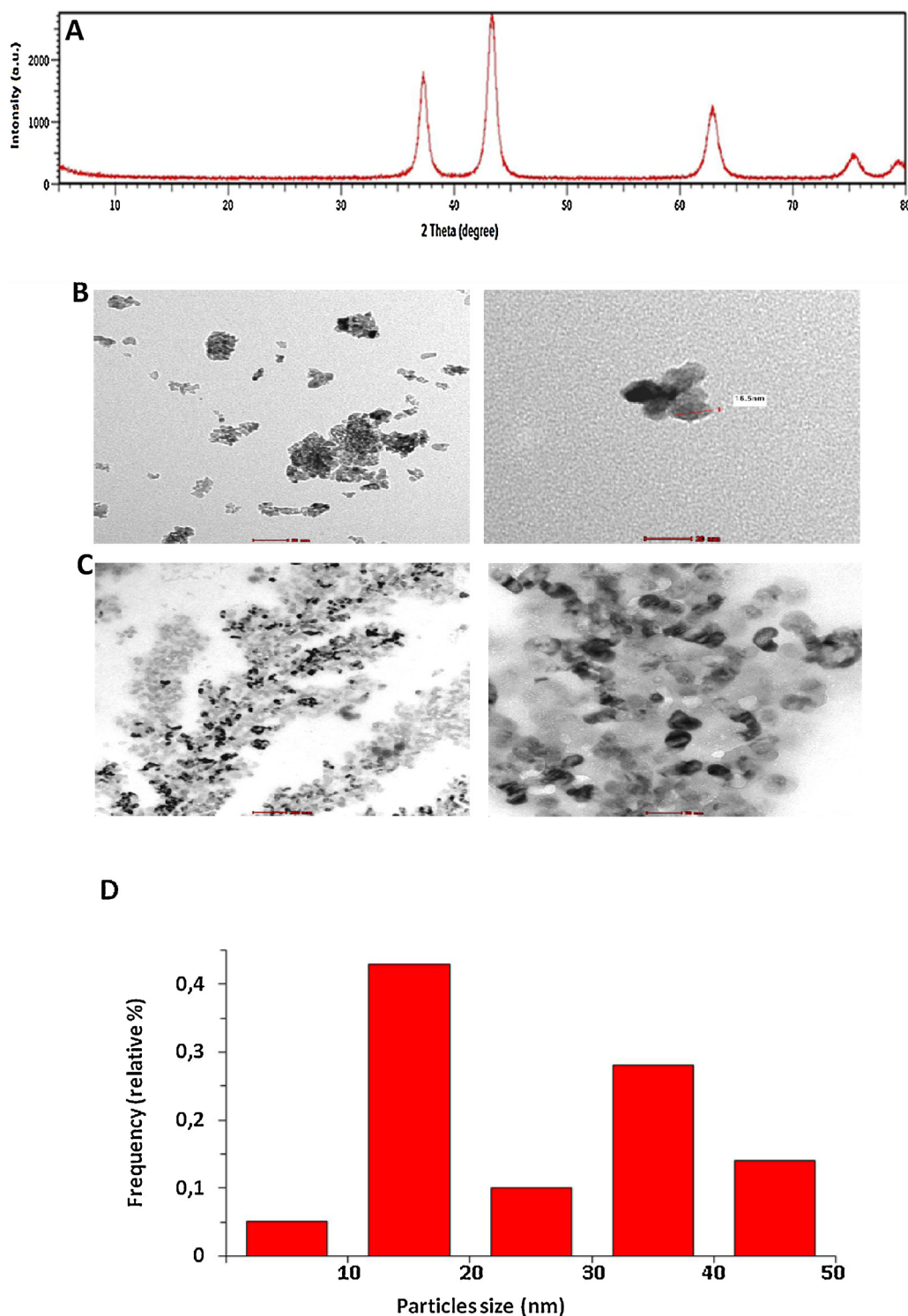
DPPH and superoxide free radicals scavenging activity was evaluated according to Hatano et al. [28] and Beyer and Fridovich [29], respectively. The sample concentration providing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) was calculated and reported as mean  $\pm$  SD. Further, the ABTS assay was carried out utilizing the method of Re et al. [30]. TEAC value was calculated from the Trolox standard curve and expressed as Trolox equivalent ( $\mu$ mol/mg). The reducing power of the PLEO was determined according to reported method and expressed as Gallic acid equivalent ( $\mu$ g/g extract) [31]. Ascorbic acid and BHT served as positive control in all the previous assays, the experiments were also performed in triplicate and mean values recorded.

### 2.7. Nickel nanoparticles and reagents

Nickel oxide (NiO) nanopowder (Product No. 637130, particle size: < 50 nm and purity: 98,8% trace metals basis), MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]), DCFH-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), hank's balanced salt solution (HBSS), fetal bovine serum (FBS), penicillin–streptomycin, trypsin, phosphate buffered saline (PBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). SOD and Catalase enzyme assay kits were obtained from Bio-Vision Inc. (Milpitas, California, USA). All other chemicals used were of the highest purity available from commercial sources.

### 2.8. Nickel oxide nanoparticles characterization

Crystalline nature of NiO NPs was characterized by X-ray diffraction (XRD) using Shimadzu XRD-6000 Diffractometer at room temperature, while shape and size were determined by field emission transmission electron microscopy (TEM, JEM- 2100F, JEOL Inc., Japan) at an accelerating voltage of 120 kV. On the other hand, dynamic light scattering (DLS) (Nano-ZetaSizer-ZS, Malvern Instruments, UK) was used to determine the hydrodynamic size and Zeta potential of the NiO NPs as described by Ahamed et al. (2013) [32].

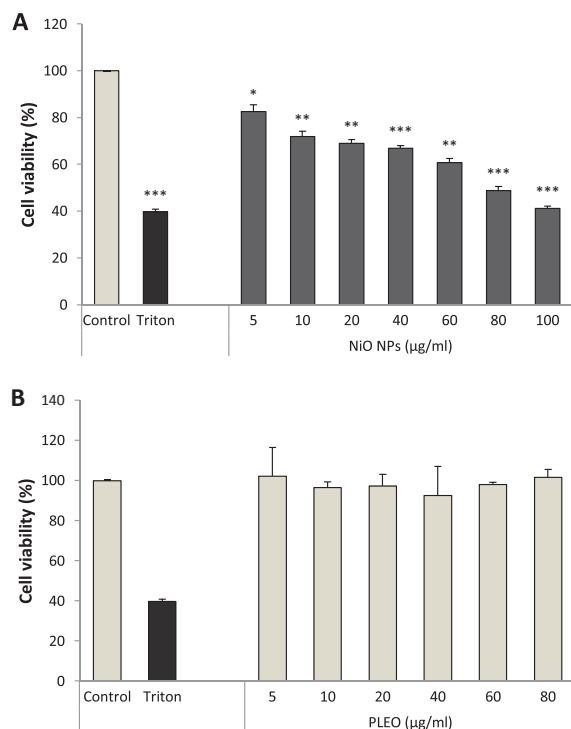


**Fig. 1.** Characterization of NiO NPs. (A) X-ray diffraction pattern, (B and C) transmission electron microscopy image in deionized water (50, 20 nm) and in full DMEM (200, 50 nm), respectively and (D) frequency of size distribution.

## 2.9. Cell culture and treatments

The human lung epithelial cells (A549) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin–streptomycin at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C. At 85% confluence, cells were harvested utilizing 0.25% trypsin and were sub-cultured into 75 cm<sup>2</sup> flasks, 96-well or 12-well plates according to selection of experiments. Cells were allowed to attach the surface for 24 h prior to treatment. NiO NPs were suspended in cell culture medium and diluted to appropriate

concentrations (0.5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml) for 24 h. The appropriate dilutions of NiO NPs were then sonicated using a sonicator bath at room temperature for 10 min at 40W to avoid nanoparticles agglomeration prior to administration to the cells. Cells were treated with PLEO at concentration of 60 and 80 µg/ml for 24 h before exposure to NiO NPs (80 and 100 µg/ml). Essential oil samples were dissolved in DMSO and diluted in the medium (final concentration of DMSO in the medium was < 0.3%)



**Fig. 2.** (A) NiO NPs induced cytotoxicity in A549 cells. Cells were exposed to different concentrations of NiO NPs for 24 h. (B) Effects of PLEO on cell viability. A549 cells were treated with different concentrations of essential oil samples for 24 h also. Triton was used as a negative control. Data represented are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001 treatments compared to control.

### 2.10. Cell viability and measurement of ROS

Viability of cells after exposure to NiO NPs was assessed by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay as described by Mosmann (1983) [33], whereas the production of intracellular ROS was measured using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) [34]. Cells were seeded in 96-well plates at a concentration of  $1 \times 10^4$  cells/well and exposed to NiO NPs or/with PLEO at the concentrations for 24 h.

### 2.11. Antioxidant enzymes activities

Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities were measured by commercially available kits. The cells were seeded into 12-well plates at a concentration of  $7 \times 10^5$  cells/well and all measurements were performed according to supplier's recommendations.

### 2.12. Statistical analysis

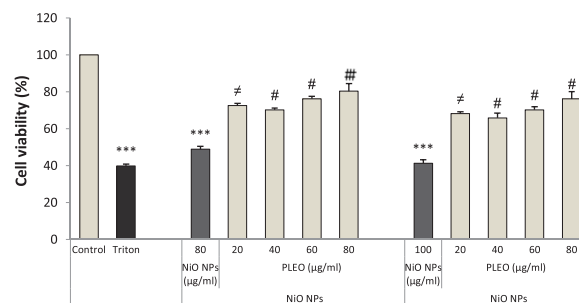
Data are presented as mean values  $\pm$  SD and the statistical analyses of the data were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's *t*-test. A probability value of  $p$  < 0.05 was considered to denote a statistically significant difference.

## 3. Results and discussion

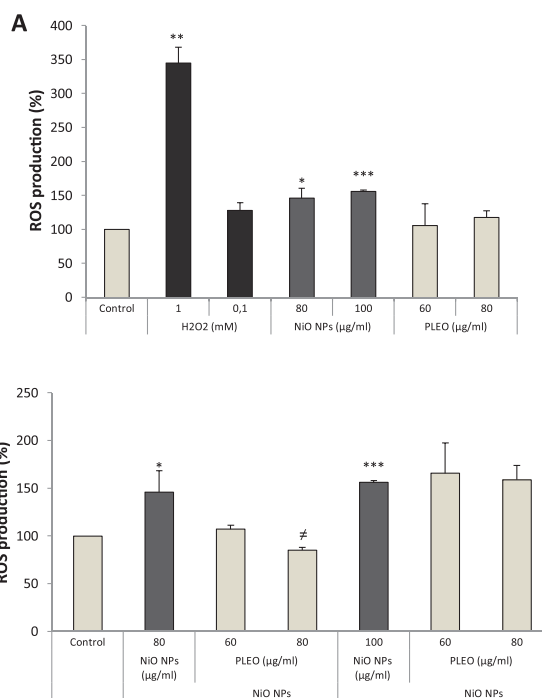
### 3.1. Chemical composition of the essential oil

Results of the phytochemical analysis indicated that leaf comprising anthocyanins, leucoanthocyanins, flavonoids, tanins and terpenoids which are shown in Table 1.

Table 2 indicates the various chemical constituents identified in



**Fig. 3.** Protective effect of PLEO on NiO NPs induced cytotoxicity. A549 cells were treated with different concentrations of essential oil for 24 h followed by NiO NPs for 24 h. Triton was used as a negative control. Data represented are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001 treatments compared to control;  $\neq p$  < 0.05; # $p$  < 0.01; ## $p$  < 0.001 compared to NiO NPs.



**Fig. 4.** (A) Effects of NiO NPs and PLEO on ROS production in A549 cells. Cells were treated with different concentrations for 24 h.  $H_2O_2$  was used as a negative control. (B) PLEO attenuates NiO NPs induced ROS generation. A549 cells were treated with different concentrations of essential oils for 24 h followed by NiO NPs for 24 h also. Data represented are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05; \*\*\* $p$  < 0.001 treatments compared to control;  $\neq p$  < 0.05 compared to NiO NPs.

PLEO. The yield of extraction was  $0.42 \pm 0.02\%$  and it characterized by variety of components in less percentage. The main compounds present are terpinen-4-ol (11.49%), germacrene D (8.64%),  $\alpha$ -Pinene (5.97%), sabinene (5.19%), caryophyllene (5.10%) and  $\delta$ -Cadinene (4.86%).

The plant extractions provide an essential oil of light-brown color with a very strong and persistent aromatic-spicy odor. The PLEO yield obtained is similar to that in the literature [20,35]. Therefore, these results revealed that the two major components identified (terpinen-4-ol and germacrene D), founded with this amount for the first time, are in agreement with previous studies and confirmed the identity of the chemotypes used in this study [26,36].

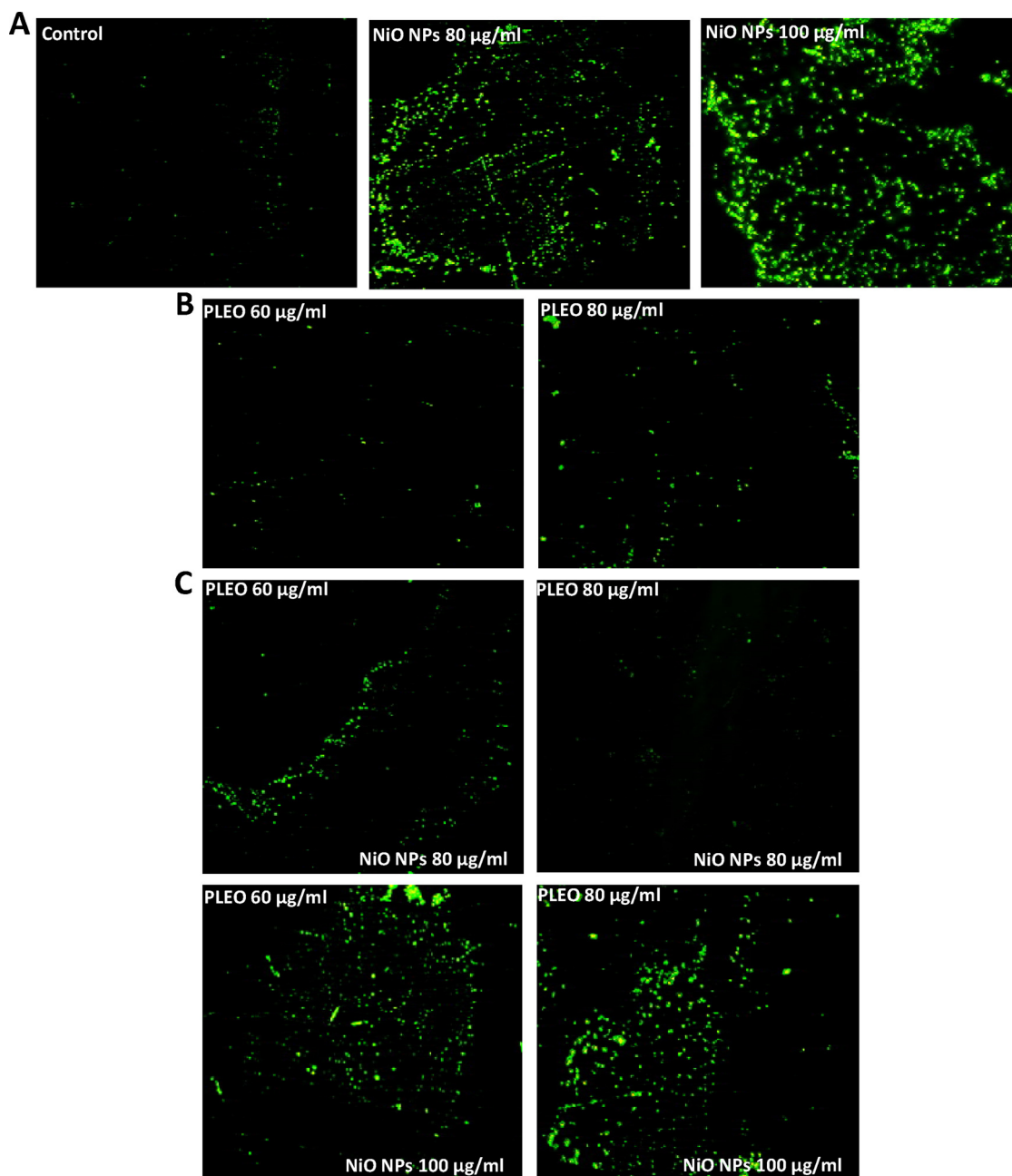


Fig. 5. Intracellular ROS generation in A549 cells. Images were captured with a fluorescence microscope (OLYMPUS IX73). Effects of NiO NPs (A) and PLEO (B) on ROS production. Cells were treated with different concentrations for 24 h. (C) PLEO attenuate NiO NPs induced ROS generation in dose-dependent manner. A549 cells were treated with different concentrations of essential oil for 24 h followed by NiO NPs for 24 h also.

### 3.2. Antioxidant activities

Antioxidant activities of PLEO were evaluated with four systems to establish authenticity, using two synthetic antioxidants positive controls (BHT and Ascorbic acid). Potency was assessed by measuring the  $IC_{50}$  or Trolox/GAE equivalent and the results are reported in Table 3. The order of antioxidant capacity was Ascorbic acid > BHT > PLEO.

According to the results which have been obtained, the tested samples were able to reduce the DPPH radical and scavenging the Superoxide radical with  $IC_{50}$  equal to  $640 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$  and  $760 \pm 0.125 \mu\text{g/ml}$  for DPPH and SOD assay respectively. Different parts and constituents from *P. lentiscus* have been shown *in vitro* radical scavenging properties [37,38]. Using the DPPH scavenging activity assay, it was found that all of the *P. lentiscus* extracts in solvents, except for the chloroform extract, have a high radical scavenging activity

(90%) equivalent to that of the standard, BHA (89%). The ethanolic and aqueous fractions from the ethyl acetate extract have high scavenging activities with values of  $78 \pm 0.93\%$  and  $90.29 \pm 0.29\%$ , respectively [39]. In 2007, Barra et al. [40] conducted a study which showed that the PLEO exhibited radical scavenging activity ranged between 0.52 and 4.61 mmol/l.

The highest reducing power ability ( $\mu\text{g GAE equivalent/g}$ ) and scavenging ability on ABTS radicals ( $\mu\text{mol Trolox equivalent/mg}$ ) were observed also in the following order; ascorbic acid > BHT > PLEO. From our data, it appears that the values in the present study were comparable to those of Ascorbic acid and BHT. While comparing our present results of this assay with the literature already published, we found very few reports on the antioxidant activity of PLEO. We are the first evaluated the reducing power, ABTS and Superoxide radicals scavenging ability of PLEO.



### 3.3. NiO NPs characterization

Fig. 1A shows a sharp diffraction peaks that clearly indicates the crystalline nature of NiO NPs. No peaks of impurity were found in the XRD pattern, indicating that the nanoparticles of NiO used in this study consists of ultrapure phase. The existence of strong and sharp diffraction peaks at  $2\theta = 37.41, 43.35, 62.95, 75.40$  and  $79.45$  which perfectly corresponding to (111), (200), (220), (311) and (222) crystal planes, respectively (JCPDS Card No. 73-1523). Besides, the crystallite size has been estimated from XRD using the Scherer's equation [41]. The average nanocrystallite size of NiO NPs corresponding to the highest peak observed in XRD was found to be 24 nm. The typical TEM image of NiO NPs is indicated in Fig. 1B and C. TEM analyze show that the average diameter, from measuring over 70 particles, of NiO NPs was around 25 nm (further supporting the XRD results) and they have the tendency to aggregate in the solution used. Fig. 1D represents frequency of size distribution of NiO NPs. The measurements, performed by DLS, determined the average hydrodynamic size ( $293.86 \pm 9.51$  and  $288.1 \pm 7.04$  nm) and the zeta potential ( $-14.06 \pm 0.60$  and  $-18.2 \pm 1.10$  mV) of NiO NPs in water and culture media, respectively.

### 3.4. MTT assay

MTT assay was undertaken in order to evaluate the effectiveness of PLEO extracted on cell viability in A549 cells stressed by NiO NPs. First we evaluated the effects of NiO NPs on A549 cells viability. Incubation with 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu\text{g/ml}$  for 24 h resulted in a concentration dependent decrease in cell viability, the  $\text{LC}_{50}$  was  $79.83 \pm 0.856$   $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 2A). Based on these results NiO NPs at submaximal concentrations after 24 h, 80 and 100  $\mu\text{g/ml}$  were selected in this study. Next, we found all concentrations of PLEO used in MTT assay were determined to be non-toxic for A549 cells (Fig. 2B).

Therefore, the pre-exposition for 24 h to PLEO (60 and 80  $\mu\text{g/ml}$ ) were the best concentrations exhibited protective effect in cell viability reduced by NiO NPs (Fig. 3).

The main findings of this assay are the  $\text{LC}_{50}$  of NiO NPs was 79.83  $\mu\text{g/ml}$  and submaximal concentrations of 80 and 100  $\mu\text{g/ml}$  were selected in this study. Similar results were obtained in previous findings demonstrated a dose dependent reduction of MTT-value in A549 cells treated with NiO NPs [10] or with Ni NPs [42].

According to the National Cancer Institute (USA), vegetables crude extracts are cytotoxic considered when their  $\text{IC}_{50}$  values are less than 30  $\mu\text{g/ml}$  [43]. After a large screening, PLEO (60 and 80  $\mu\text{g/ml}$ ) concentrations were selected due to their best actions. Whereas, the concentration of 80  $\mu\text{g/ml}$  has the highest cytoprotective effect on NiO NPs reduced cell viability. In addition on the obtained results, it was not detected toxic effect in this model of human pulmonary cell line exposed to PLEO. The present study agree with the results of Remila et al. (2015) who have demonstrated that pre-treatment of THP-1 cells with *P. lentiscus* extracts for 24 h strongly inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$  damage, with maximum protection at 100  $\mu\text{g/ml}$  [15].

### 3.5. ROS production

In order to investigate the protective effect of PLEO on NiO NPs induced cytotoxicity mediated through ROS generation, A549 cells were treated with the two selected concentrations of the essential oil 24 h previous to NiO NPs. We detected a significant decrease of ROS level in cells treated with the essential oil (Figs. 4 and 5).

Oxidative stress, which is an imbalance between ROS production and the antioxidant systems favouring a ROS excess, has been identified as a common mechanism for cell damage. During oxidative stress, ROS are produced mainly from the mitochondrial electron transport chain. To minimize the damage induced by ROS, free radicals can be transformed to other less toxic molecules, for example, the superoxide anion

is enzymatically converted into hydrogen peroxide by superoxide dismutase (SOD) and hydrogen peroxide may be enzymatically converted into water by catalase or glutathione peroxidase enzymes [44].

Nanoparticles have been demonstrated to generate more free radicals and ROS than larger particles, likely due to their higher surface area [12]. NiO NPs have been reported to reduce cell viability and to induce oxidative stress by depletion of glutathione and induction of reactive oxygen species in HEP-2 and MCF-7 cells [45], cell death via apoptotic pathway and ROS generation in HepG2 cells in dose-dependent manner [32], NiO NPs also increased intracellular ROS, apoptosis and necrosis in BEAS-2B and A549 cells [10], Our results confirmed that NiO NPs is toxic to A549 cells.

Moreover, we noted that pre-incubation of cells with PLEO led to decrease of ROS generation which is due to the presence of terpinen-4-ol and, probably, to synergistic effect of its components. It has been reported that plant phenols can behave as ROS scavengers, metal chelators and enzyme modulators and prevent lipid peroxidation [46]. In agreement with our data obtained, pre-treatment of THP-1 cells with *P. lentiscus* extracts for 24 h strongly inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$  damage [15].

### 3.6. Antioxidant enzymes activities

Pre-incubation of cells with both concentrations 60 and 80  $\mu\text{g/ml}$  of PLEO led to enhance the antioxidant enzymes, SOD and CAT, activities affected by NiO NPs as shown in Figs. 6 and 7.

Similarly, the NPs also induce a significant depletion of antioxidants. The accumulation of ROS, e.g. superoxide radicals ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) and hydroxyl free radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) decrease the defensive effects of cellular antioxidant enzymes, e.g. SOD, CAT [47]. Exposure of HT22 hippocampal cells to CuO NPs resulted decrease in the activity of SOD and the other detoxification enzymes which has been founded in this work [48]. In contrast, these findings suggest that pre-treatment of cells with essential oil averted cell damage by preventing the decreased activity of antioxidant enzymes, SOD and CAT, induced by NiO NPs. In keeping with our results, many previously works has described the ability of

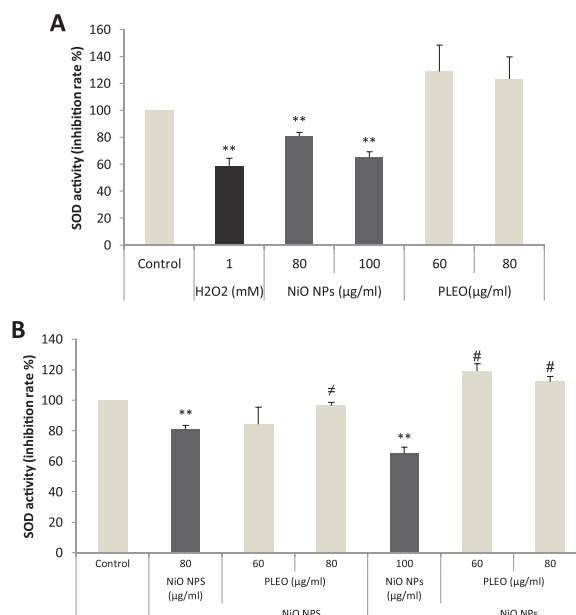
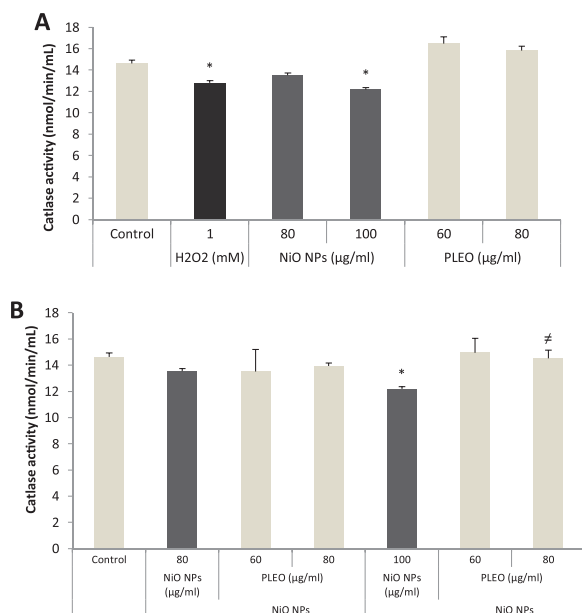


Fig. 6. (A) Effects of NiO NPs and PLEO on SOD activity in A549 cells. Cells were treated with different concentrations for 24 h.  $\text{H}_2\text{O}_2$  was used as a negative control. (B) *P. lentiscus* essential oil attenuates NiO NPs decreased SOD activity. A549 cells were treated with different concentrations of essential oils for 24 h followed by NiO NPs for 24 h also. Data represented are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  treatments compared to control;  $\neq p < 0.05$  and # $p < 0.01$  compared to NiO.



**Fig. 7.** (A) Effects of NiO NPs and PLEO on CAT activity in A549 cells. Cells were treated with different concentrations for 24 h. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a negative control. (B) PLEO attenuates NiO NPs decreased CAT activity. A549 cells were treated with different concentrations of essential oils for 24 h followed by NiO NPs for 24 h also. Data represented are mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  treatments compared to control;  $\neq p < 0.05$  compared to NiO NPs.

essential oil to modulate the endogenous enzymatic system [47,49].

#### 4. Conclusion

The data demonstrated that NiO NPs induced cytotoxicity in a concentration-dependent manner, which the mechanism may be through ROS generation and oxidative stress. The crucial results highlight, for the first time, the antioxidant and the protective activities of essential oil of *P. lentiscus* against cell oxidative damage induced by NiO NPs. These findings also showed the guidelines in the placement of NPs in safety to promote non-hazardous applications of nanotechnology.

#### Acknowledgment

The authors would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the offer of scholarship to the postgraduate (M. Khiari) and also the University Malaysia Sabah of Malaysia for providing the necessary facilities.

#### References

- [1] S.T. Hossain, S.K. Mukherjee, Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 1073–1082.
- [2] X.Q. Zhang, L.H. Yin, M. Tang, Y.P. Pu, ZnO, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles-induced toxic effects on human fetal lung fibroblasts, *Biomed. Environ. Sci.* 24 (2011) 661–669.
- [3] D.-E. Coricovac, E.-A. Moacă, I. Pinzaru, C. Cîtu, C. Soica, C.-V. Mihal, C. Păcurariu, V.A. Tutelyan, A. Tsatsakis, C.-A. Dehelean, Biocompatible colloidal suspensions based on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and toxicological profile, *Front. Pharmacol.* 8 (2017).
- [4] S.R. Balmuri, U. Selvaraj, V.V. Kumar, S.P. Anthony, A.M. Tsatsakis, K.S. Golokhvast, T. Raman, Effect of surfactant in mitigating cadmium oxide nanoparticle toxicity: implications for mitigating cadmium toxicity in environment, *Environ. Res.* 152 (2017) 141–149.
- [5] V. Sharma, R.K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar, M. Das, A. Dhawan, DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicol. Lett.* 185 (2009) 211–218.
- [6] V.V. Chernyshev, A.M. Zakharenko, S.M. Ugay, T.T. Hien, L.H. Hai, A.S. Kholodov, T.I. Burykina, A.K. Stratidakis, Ya.O. Mezhuhev, A.M. Tsatsakis, K.S. Golokhvast, Morphologic and chemical composition of particulate matter in motorcycle engine

- exhaust, *Toxicol. Rep.* 5 (2018) 224–230.
- [7] M. Skocaj, M. Filipic, J. Petkovic, S. Novak, Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol. Oncol.* 45 (2011) 227–247.
- [8] K. Donaldson, R. Duffin, J.P. Langrish, M.R. Miller, N.L. Mills, C.A. Poland, Raftis, A. Shah, C.A. Shaw, D.E. Newby, Nanoparticles and the cardiovascular system: a critical review, *Nanomedicine (Lond)* 8 (2013) 403–423.
- [9] K. Venkateswara Rao, C.S. Sunandana, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by chemical combustion: effect of fuel to oxidizer ratio on structure, microstructure and EPR, *Solid State Commun.* 148 (2008) 32–37.
- [10] L. Capasso, M. Camatini, M. Gualtieri, Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells, *Toxicol. Lett.* 226 (2014) 28–34.
- [11] B. Halliwell, Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett.* 540 (2003) 3–6.
- [12] C. Sioutas, R.J. Delfino, M. Singh, Exposure assessment for atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and implications in epidemiologic research, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 947–955.
- [13] A. Kumaran, R.J. Karunakaran, Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*, *Food Chem.* 100 (2007) 356–361.
- [14] J.C.R. Velloso, N.M. Khalil, V.A.F. Formenton, V.F. Ximenes, L.M. Fonseca, M. Furlan, I.L. Brunetti, O.M.M.F. Oliveira, Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark, *Fitoterapia* 77 (2006) 243–244.
- [15] S. Remila, D. Atmani-Kilani, S. Delemasure, J.L. Connat, L. Azib, T. Richard, D. Atmani, Antioxidant cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts, *Eur. J. Integr. Med.* 7 (2015) 274–286.
- [16] T. Yi, J. Wen, A. Golan-Goldhirsh, D.E. Parfitt, Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae), *Am. J. Bot.* 95 (2008) 241–251.
- [17] R. Bentley, H. Trimen, *Medicinal Plants*, International Book Distributors, 1880.
- [18] M.S. Ali-Shtayah, R.M.R. Yaghmour, Y.R. Faidi, K. Salem, M.A. Al-Nuri, Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *J. Ethnopharmacol.* 60 (1998) 265–271.
- [19] N. Benhammou, F.A. Bekkara, T.K. Panovska, Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2 (2008) 22–28.
- [20] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, M. Komaitis, Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chem.* 107 (2008) 1120–1130.
- [21] S. Kordali, A. Cakir, H. Zengin, M.E. Duru, Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey, *Fitoterapia* 74 (2003) 164–167.
- [22] G.V.Z. Dedoussis, A.C. Kaliora, S. Psarras, A. Chiou, A. Mylona, N.G. Papadopoulos, N.K. Andrikopoulos, Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression, *Atherosclerosis* 174 (2004) 293–303.
- [23] J.B. Harborne, *Phytochemical methods*, *J. Chem. Inf. Model.* 3 (1998) 317.
- [24] H. Van den dool, P.D. Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.* 11 (1963) 463–471.
- [25] R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured Publishing, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- [26] T. Dob, D. Dahmane, C. Chelghoum, Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria, *J. Essent. Oil Res.* 18 (2006) 335–338.
- [27] NIST, NIST Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database Number 69, (2018) Available: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (Accessed 20 July 2017).
- [28] T. Hatano, H. Kagawa, T. Yasuhara, T. Okuda, Two new flavonoids and other constituents in licorice root. Their relative astringency and radical scavenging effects, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 36 (1988) 2090–2097.
- [29] W.F. Beyer, I. Fridovich, Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions, *Anal. Biochem.* 161 (1987) 559–566.
- [30] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.
- [31] M. Oyaizu, Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Jpn. J. Nutr. Diet.* 44 (1986) 307–315.
- [32] M. Ahamed, D. Ali, H.A. Alhadlaq, M.J. Akhtar, Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2), *Chemosphere* 93 (2013) 2514–2522.
- [33] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [34] H. Wang, J.A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 612–616.
- [35] S. Zrira, A. Elamrani, B. Benjlali, Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco – a seasonal variation, *Flavour Fragr. J.* 18 (2003) 475–480.
- [36] E.-H. Benyoussef, S. Charchari, N. Nacer-Bey, N. Yahiaoui, A. Chakou, M. Bellatreche, The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria, *J. Essent. Oil Res.* 17 (2005) 642–644.
- [37] A. Abdelwahed, I. Bouhlel, I. Skandrani, K. Valenti, M. Kadri, P. Guiraud, R. Steiman, A.M. Mariotte, K. Ghedira, F. Laporte, M.G. Djijoux-Franca, L. Chekir-Ghedira, Study of antimutagenic and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 1–13.
- [38] W. Bhourri, S. Derbel, I. Skandrani, J. Boubaker, I. Bouhlel, M.B. Sghaier, S. Kilani, A.M. Mariotte, M. Djijoux-Franca, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, Study of

- genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits, *Toxicol. In Vitro* 24 (2010) 509–515.
- [39] D. Atmani, N. Chaher, M. Berboucha, K. Ayouni, H. Lounis, H. Boudaoud, N. Debbache, D. Atmani, Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food Chem.* 112 (2009) 303–309.
- [40] A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras, A. Angioni, Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7093–7098.
- [41] A.L. Patterson, The scherrer formula for X-ray particle size determination, *Phys. Rev.* 56 (1939) 978–982.
- [42] M. Ahamed, Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells, *Toxicol. In Vitro* 25 (2011) 930–936.
- [43] M. da, S. Gomide, F. de, O. Lemos, M.T.P. Lopes, T.M. de, A. Alves, L.F. Viccini, C.M. Coelho, The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines, *Braz. J. Pharmacogn.* 23 (2013) 895–902.
- [44] E. Huerta-García, J.A. Pérez-Arízti, S.G. Márquez-Ramírez, N.L. Delgado-Buenrostro, Y.I. Chirino, G.G. Iglesias, R. López-Marure, Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 73C (2014) 84–94.
- [45] M.A. Siddiqui, M. Ahamed, J. Ahmad, M.A. Majeed Khan, J. Musarrat, A.A. Al-Khedhairy, S.A. Alrokayan, Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 641–647.
- [46] C. Bosco Rodrigo, Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review, *Comp. Biochem. Physiol. – C Toxicol. Pharmacol.* 142 (2006) 317–327.
- [47] A. Li, L. Han, C.C. Han, Antioxidant and neuroprotective activities of essential oil, isolated from chinese herb pairs of *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*, *J. Appl. Pharm. Sci.* 2 (2012) 1–4.
- [48] K. Niska, M.J. Santos-Martinez, M.W. Radomski, I. Inkielewicz-Stepniak, CuO nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: protective effect of crocetin, *Toxicol. In Vitro* 29 (2015) 663–671.
- [49] M. Porres-Martínez, E. González-Burgos, M.E. Carretero, M.P. Gómez-Serranillos, Protective properties of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil against oxidative stress-induced neuronal injury, *Food Chem. Toxicol.* 80 (2015) 154–162.

# Metadata of the chapter that will be visualized in SpringerLink

|                      |   |  |
|----------------------|---|--|
| Book Title           | Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions                |  |
| Series Title         |   |  |
| Chapter Title        | Essential Oil of <i>Mentha Spicata</i> Leaves from Algeria: Chemical Composition and Antibacterial Activity |  |
| Copyright Year       | 2018  |  |
| Copyright HolderName | Springer International Publishing AG  |  |
| Corresponding Author | Family Name   | <b>Khiari</b>  |
|                      | Particle  |  |
|                      | Given Name  | <b>M.</b>  |
|                      | Prefix  |  |
|                      | Suffix  |  |
|                      | Division  | Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences |
|                      | Organization  | University of Annaba   |
|                      | Address   | Annaba, Algeria  |
|                      | Division  | Department of Biology, Faculty of Sciences   |
|                      | Organization  | University of Djelfa   |
|                      | Address   | Djelfa, Algeria  |
|                      | Email   | mohamedkhiari@yahoo.fr   |
| Author               | Family Name   | <b>Kechrid</b>   |
|                      | Particle  |  |
|                      | Given Name  | <b>Z.</b>  |
|                      | Prefix  |  |
|                      | Suffix  |  |
|                      | Division  | Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences |
|                      | Organization  | University of Annaba   |
|                      | Address   | Annaba, Algeria  |
|                      | Email   |  |
| Author               | Family Name   | <b>Halbaoui</b>  |
|                      | Particle  |  |
|                      | Given Name  | <b>A.</b>  |
|                      | Prefix  |  |
|                      | Suffix  |  |
|                      | Division  | Department of Biology, Faculty of Sciences   |
|                      | Organization  | University of Djelfa   |
|                      | Address   | Djelfa, Algeria  |
|                      | Email   |  |
| Author               | Family Name   | <b>Halbaoui</b>  |
|                      | Particle  |  |
|                      | Given Name  | <b>M.</b>  |
|                      | Prefix  |  |



Suffix  
Division Department of Biology, Faculty of Sciences  
Organization University of Djelfa  
Address Djelfa, Algeria  
Email

---

Abstract *Ethnopharmacological relevance:* The extract of *M. spicata* has several biological uses such as antioxidants, anti-inflammations, antispasmodics and antimicrobials.

---

Keywords (separated by '-') *Mentha spicata* - Essential oil - Chemical composition - Antibacterial activity - Carvone

---



Author Proof

# Essential Oil of *Mentha Spicata* Leaves from Algeria: Chemical Composition and Antibacterial Activity

M. Khiari, Z. Kechrid, A. Halbaoui, and M. Halbaoui

## Keywords

*Mentha spicata* • Essential oil • Chemical composition • Antibacterial activity  
Carvone

## 1 Introduction

**Ethnopharmacological relevance:** The extract of *M. spicata* has several biological uses such as antioxidants, anti-inflammations, antispasmodics and antimicrobials.

**Aim of the study:** This work was focused to investigate chemical composition and antibacterial activity of essential oil (E.O) from a Mediterranean plant *M. spicata*.

## 2 Materials and Methods

*M. spicata* E.O was extracted from the leaves using cle-  
venger apparatus then carried out by GC/MS technique.  
Furthermore, the antibacterial activity of E.O was valuated  
with three bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Proteus  
mirabilis* and *Klibesiella*. Commercial antibiotics were used  
as positive control.

## 3 Results

The phytochemical analysis indicated that the *M. spicata* leaf comprising anthocyanins, leucoanthocyanins, flavo-  
noids, tanins and terpenoids. The obtained results also  
showed that *M. spicata* E.O is rich in Carvone (71.02%) and  
Limonene (17.43%); and exhibited a potent antibacterial  
effect compared to controls.

The plant extractions provide essential oil of pale-yellow  
color with a very strong and persistent aromatic-spicy odor.  
The yield of *M. spicata* E.O extraction was 2.16% con-  
taining two major compounds, Carvone (71.02%) and  
Limonene (17.43%) (Table 1).

The *M. spicata* E.O antibacterial activity was evaluated  
against three bacterial strains to establish authenticity, using  
also three commercial antibiotics as positive controls (GM,  
CAZ and PIP). According to the obtained results, the tested  
samples were able to inhibit bacteria growing with best  
action in 1/2 dilution with ethanol. Furthermore, *Klibesiella*  
was the most sensible strain to the essential oil and very  
resistant to the commercial antibiotics used in this study  
(Table 2).

M. Khiari (✉) · Z. Kechrid  
Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology,  
Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of  
Annaba, Annaba, Algeria  
e-mail: mohamedkhiari@yahoo.fr

M. Khiari · A. Halbaoui · M. Halbaoui  
Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Djelfa,  
Djelfa, Algeria

AQ1

AQ2



**Table 1.** Preliminary screening of *M. spicata* leaves

| Chemical groups    | <i>M. spicata</i> |
|--------------------|-------------------|
| Anthocyanins       | +                 |
| Leuco-Anthocyanins | +                 |
| Alkaloids          | -                 |
| Flavonoids         | +                 |
| Tannins            | +                 |
| Terpenoids         | +                 |
| Steroids           | -                 |

**Table 2.** Antibacterial activity of *M. spicata* essential oil

|  | Antibiotics   |                |                  | E.O dilutions (D) of <i>Mentha spicata</i> |          |           | Positif control (Ethanol) |
|--|---------------|----------------|------------------|--|----------|-----------|---------------------------|
|  | Gentamicin GM | Ceftazidim CAZ | Piperacillin PIP | D1 (1/2)                                   | D2 (1/5) | D3 (1/10) |                           |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Gram <sup>+</sup> | +++           | -              | +++              | +++  | ++       | ++        | -                         |
| <i>Proteus mirabitis</i> (Gram <sup>-</sup> )  | ++            | +++            | ++               | +++  | ++       | ++        | +                         |
| Klibesiella (Gram <sup>-</sup> )               | ++            | -              | -                | +++  | +++      | ++        | +                         |

#### 4 Conclusion

The present research demonstrated the *M. spicata* essential oil antibacterial activities against three strains of bacteria. It was suggested that *M. spicata* E.O could be used as a strong antibacterial agent.

53  
56  
58  
59  
60  
61  
62

Author Proof

UNCORRECTED