

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 des effets de la silymarine et des acides aminés
soufrés sur la toxicité du nickel**

Présentée par: Mme **BOUHALIT Samira**

Directeur de thèse : Pr. KECHRID ZINE

Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : Pr. MESSARAH Mahfoud

Université d'Annaba

Examineurs : Pr. NOUADRI Tahar

Université de Constantine -1

Pr. OULDJAOUI Abdellah

Univ. Larbi Ben Mhidi-Oum El Bouaghi

N° DBCH...../2018

Année universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENT

Je remercie en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de cette thèse.

*Mon respect et reconnaissance sont adressés à Monsieur **Mahfoud MESSARAH**; Professeur à l'université d'Annaba, qui ma fait l'honneur de présider ce jury Je le remercie sincèrement pour l'intérêt qu'il porte pour mon travail.*

*J'exprime mes remerciements à Monsieur **Tahar NOUADRI**; professeur à l'université des frères Mentouri-Constantine -1, à Monsieur **Abdellah OUALDJAOUI**; professeur à l'université Larbi Ben Mhidi-Oum Elbouaghi, Je les remercie pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner ce travail, un immense merci.*

*Mes sincères remerciements vont à mon encadreur: Monsieur **Zine KECHRID**; professeur à l'université d'Annaba, pour les conseils judicieux et constants qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail, pour sa disponibilité et son indulgence qui m'ont permis de mener à bien cette étude, qu'il trouve ici l'expression de mes plus profonds respects et toutes mes gratitudes.*

*Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à Madame **Purificacion Corchete**, Professeur à la Faculté de pharmacie de Salamanca, Espagne. Pour toutes les connaissances qu'elle m'a apportées sur les plantes médicinales. J'ai grandement bénéficié de sa grande expérience, de sa rigueur scientifique et de ses qualités humaines. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.*

*Je remercie Monsieur **Abdelfetteh EL-FEKI**; Professeur et directeur du laboratoire d'Ecophysiologie animale à la faculté des Sciences de Sfax-Tunisie, de m'avoir facilitée l'accès à son laboratoire et de m'avoir permis de bénéficier d'un stage. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et sincère gratitude.*

Mes remerciements s'adressent aussi aux personnels et aux techniciens du laboratoire d'Ecophysiologie animale à la faculté des Sciences de Sfax, notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et les autres simplement pour les bons moments partagés.

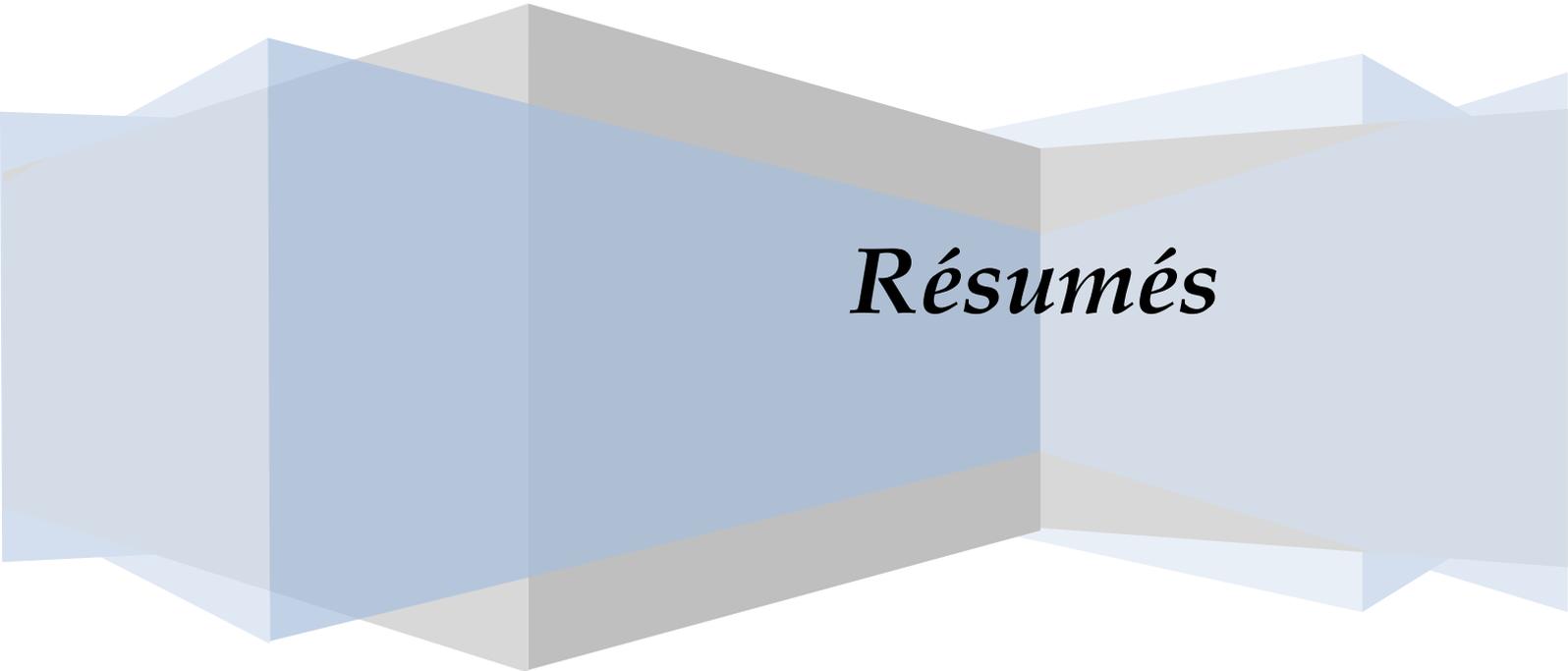
*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier, Madame **Samira**, technicienne au service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de Guelma, pour leur aide au cours de la réalisation de certaines coupes histologiques.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le professeur **Tarek REBAI**, chef de service de laboratoire Embryologie à la Faculté de Médecine de Sfax, Tunisie. Professeur de physiologie animale à la faculté des sciences de Sfax et directeur d'une UR "stress*

oxydant et santé '' , de m'avoir accueillie pour la lecture des coupes histologiques, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance infinie.

J'adresse enfin ma plus profonde gratitude a mes parents, qui n'ont jamais reculé devant aucun sacrifice pour me voir réussir et qui à je dois tout mon bonheur ; A mon mari, pour sa patience et son soutien; A mes petits fils, ma sœur et mes frères qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances.

Que tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail trouvent dans ces lignes mes remerciements les plus chaleureux.



Résumés

Résumé

La présente étude consiste à évaluer les effets éventuellement protecteurs de la silymarine, extraite des graines séchées du chardon-Marie (*Silybum marianum* L.), et des acides aminés soufrés (L-méthionine et L-cystéine), contre la cytotoxicité et le stress oxydatif induits par le sulfate de nickel chez les rats blancs mâles de la souche Wistar.

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant des extraits du *Silybum marianum*, dans la première partie de ce travail une étude phytochimique préliminaire a été effectuée, initiée par une analyse quantitative des composés phénoliques et suivie par des testes anti-radicalaires. Les résultats obtenus révèlent la présence des taux importants des phénols totaux et des flavonoides avec un pouvoir antioxydant élevé contre le radical DPPH.

Dans une seconde partie, nos résultats ont montré que l'administration du nickel pendant trois semaines provoque des altérations graves au niveau de l'organisme se traduisant par; un déficit pondéral, perturbation métaboliques (augmentation de glucose, des lipides totaux, de triglycérides et cholestérol), un effet hépatotoxique (augmentation de TGO, TGP, PAL et du LDH), néphrotoxique (augmentation de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique), hématotoxique (diminution du taux des globules rouges, des globules blancs, l'hémoglobine et l'hématocrite). De plus, nous avons noté que l'utilisation du nickel est à l'origine de l'apparition d'un état de stress oxydant, ceci est révélé par une augmentation de la peroxydation lipidique, des perturbations dans les systèmes de défense antioxydant; taux de glutathion réduit, les activités enzymatiques de la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase tissulaires.

Cependant, la supplémentation en silymarine ou en acides aminés soufrés aux rats traités par le nickel, ont atténué certains effets cytotoxiques de nickel.

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition au nickel provoque des perturbations au niveau de l'organisme, qui sont atténuées par l'utilisation des extraits de chardon-marie, de L-méthionine ou L-cystéine, à fort potentiel antioxydant pour contracter le stress oxydant induit par le nickel.

Mots-clés: Nickel; Stress oxydant; *Silybum marianum*; Méthionine; Cystéine.

Abstract

The present study undertaken to evaluate the possibly protective effects of silymarin extracted from milk thistle dried seeds (*Silybum marianum* L.) and sulfur amino acids (L-methionine and L-cysteine), against cytotoxicity and oxidative stress induced by nickel sulphate in male white rats of the Wistar strain.

In order to determine the antioxidant potential of the extracts of *Silybum marianum*, in the first part of this work a preliminary phytochemical study was carried out, initiated by a quantitative analysis of the phenolic compounds and followed by anti-radical tests. The results obtained reveal the presence of high levels of total phenols and flavonoids with a high antioxidant capacity against the DPPH radical.

In a second part, our results showed that the administration of nickel for three weeks caused serious alterations in the organism resulting in; weight loss, metabolic disturbance (increase in glucose, total lipids, triglycerides and cholesterol), hepatotoxicity (increase of GOT, GPT, ALP and LDH activities), nephrotoxicity (increase in urea, creatinine and uric acid), hematotoxicity (decreased red blood cell count, white cells, hemoglobin and hematocrit). Moreover, the findings showed that the use of nickel resulted in the appearance of an oxidative stress state, this is revealed by an increase in lipid peroxidation, perturbations in antioxidant defense systems including; reduced glutathione, enzymatic activities of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase.

However, the treatment with silymarin or sulfur-containing amino acids reduced certain cytotoxic effects of nickel.

In conclusion, this study demonstrated that exposure to nickel led to disturbances in the organism, which are mitigated by the use of milk thistle extracts, L-methionine or L-cysteine, with high potential antioxidant for contracting nickel-induced oxidative stress.

Keywords: Nickel; Oxidative stress; *Silybum marianum*; Methionine; Cysteine.

الملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم التأثير الوقائي الممكن للسيليمارين المستخرج من البذور المجففة لنبتة شوك الجمل (*Silybum marianum*)، والأحماض الأمينية الكبريتية (L-ميثيونين وL-السيستين) ضد السمية الخلوية و الإجهاد التأكسدي الناجمة عن المعاملة بكبريتات النيكل عند ذكور الفئران البيضاء من سلالة Wistar .

من أجل تحديد النشاط المضادة للأكسدة للنوع *Silybum marianum* في الجزء الأول من هذا العمل تم إجراء دراسة كيميائية نباتية أولية ، بدأت بتحليل كمي للمركبات الفينولية تلتها اختبارات القدرة علي اسر الجذور الحرة. أظهرت النتائج المتحصل عليها وجود مستويات عالية من مركبات الفينول الكلية والفلافونيدات مع القدرة العالية المضادة للأكسدة ضد جذور DPPH .

في الجزء الثاني، أظهرت نتائجنا أن المعالجة بالنيكل لمدة ثلاثة أسابيع قد أدت إلى العديد من التأثيرات الخطيرة في العضوية المتمثلة في؛ نقص الوزن، اضطراب الأيض (زيادة الجلوكوز، الدهون الكلية والدهون الثلاثية والكوليسترول في الدم)، تسمم كبدي (زيادة نشاط ناقلات الامين(TGO, TGP)، الفوسفات القلوي وLDH)، تسمم كلوي (زيادة تركيزا ليوريا، الكرياتينين وحمض اليوريك) التأثير السمي علي بعض المؤشرات الدموية (انخفاض عدد خلايا الدم الحمراء، خلايا الدم البيضاء، الهيموغلوبين والهيماتوكريت). بالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أن استخدام النيكل عمل على ظهور حالة الإجهاد التأكسدي والمتمثلة في زيادة مستوى فوق الأكسدة الليبيدية، واختلال في أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة وذلك من خلال انخفاض معدل الجلوتاثيون، ونشاط بعض الأنزيمات مضادات الأكسدة المتمثلة في (GSH-Px, CAT, SOD). في حين أن المعالجة بالسيليمارين أو الأحماض الأمينية الكبريتية للفئران المعاملة بالنيكل ، أدت إلي تخفيف بعض مؤثراته الخلوية السامة.

عموما ما يمكن استنتاجه من هذه الدراسة أن التعرض للنيكل يسبب اضطرابات في العضوية، يمكن تحسينها باستخدام مستخلصات شوك الجمل، الميثيونين والسيستين، والتي لها القدرة العالية المضادة للتقليل من الإجهاد التأكسدي الناجم عن النيكل.

الكلمات الرئيسية: النيكل؛ الإجهاد التأكسدي؛ *Silybum marianum* ؛ ميثيونين؛ السيستين.

TABLE DES MATIERES

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale..... 1

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: LE NICKEL 4

1. Généralités : 4

2. Identification et caractérisation 4

3. Sources d'exposition..... 5

4. Secteur d'utilisation..... 5

5. Métabolisme du nickel 6

6. Evaluation toxicologique :..... 7

6.1. Toxicité aiguë 7

6.2. Toxicité sub-chronique et chronique 9

6.2.1. Effets systémiques 9

6.2.2. Effets sur la reproduction et tératogénèse 10

6.2.3. Effets cancérigènes du nickel 10

6.2.4. Mutagénicité, et génotoxicité du nickel 11

6.2.5. Manifestations allergiques 12

Chapitre II : LE STRESS OXYDATIF 13

1. Les radicaux libres 13

2. Les sources de production des radicaux libres 14

3. Les conséquences du stress oxydatif 16

3.1. La peroxydation lipidique 16

3.2. Oxydation des protéines 17

3.3. Dommages oxydatifs de l'ADN 18

4. Mise en évidence d'un stress oxydant 19

4.1. Les Marqueurs du statut 19

4.2. Les systèmes antioxydants 20

4.2.1. Système antioxydant enzymatique 20

4.2.2. Système antioxydant non-enzymatique 22

Chapitre III: <i>Silybum marianum</i> L.	26
1. Généralités sur le chardon-Marie	26
1.1. Présentation et origine du chardon-Marie	26
1.2. Nomenclatures et Systématique	26
1.3. Description botanique	27
2. Composition chimique du chardon-Marie	28
3. Activités pharmacologiques	29
4. Mode d'action de la silymarine	31
5. Pharmacocinétique	33
6. Toxicité, effets secondaires, interactions	34
Chapitre IV: LES ACIDES AMINES SOUFRES	36
1. Le soufre	36
2. Les acides aminés soufrés et leurs métabolismes.....	36
3. Source, apport alimentaire, absorption intestinale	38
4. Devenir et voies d'utilisation de la cystéine	39
5. Régulation du métabolisme des acides aminés soufrés	41
6. Le rôle et l'importance des AAS dans l'organisme	42
7. Toxicité et effets indésirables des acides aminés soufrés.....	43

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I: MATERIELS ET METHODES	45
I. MATERIEL.....	45
1. Matériel biologique	45
1.1. Choix des animaux et conditions d'élevage	45
1.2. Le matériel végétal	45
2. Produits et réactifs chimiques	45
II. METHODES.....	46
1. Etude de l'extrait des graines du <i>Silybum marianum</i>	46
1.1. Préparation de l'extrait méthanolique des graines	46
1.2. Analyse des extraits des graines	47
1.2.1. Dosage des composés phénoliques	47
1.2.2. Dosage des flavonoïdes	47
1.2.3. La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)	47
1.3. Tests <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	48

2. Expérimentation animale	49
2.1. Protocole expérimental	49
2.2. Sacrifices et prélèvements des organes	50
2.3. Dosage des paramètres biochimiques	52
2.3.1. Dosage du glucose	52
2.3.2. Dosage des lipides totaux	52
2.3.3. Dosage du cholestérol	52
2.3.4. Dosage des triglycérides	53
2.3.5. Dosage de l'urée	53
2.3.6. Dosage de la créatinine	54
2.3.7. Dosage de l'acide urique	54
2.3.8. Dosage des protéines totales	55
2.3.9. Dosage de la bilirubine totale	55
2.3.10. Dosage de l'aspartate aminotransferase (ASAT/TGO).....	56
2.3.11. Dosage de l'alanine aminotransferase (ALAT/ GPT).....	56
2.3.12. Dosage de l'alcalin phosphate (ALP)	57
2.3.13. Dosage de lactate dehydrogenase (LDH).	57
2.4. Evaluation de la toxicité hématologique	57
2.5. Dosage des paramètres du stress oxydatif	58
2.3.1. Préparation de l'homogénat	58
2.3.2. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire	58
2.3.3. Dosage de malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire	58
2.3.4. Dosage de la glutathion (GSH)	60
2.3.5. Dosage de l'activité enzymatique du (GSH-Px)	61
2.3.6. Dosage de l'activité enzymatique (CAT)	61
2.3.7. Dosage de l'activité enzymatique de la (SOD)	63
2.6. Étude histologique	64
2.7. Analyse statistique	65
Chapitre II: RESULTATS	66
I. Composition phytochimique et activités antioxydantes des extraits	66
1. Préparation des extraits à partir des graines de <i>Silybum marianum</i>	66
2. Analyse des extraits des graines de <i>Silybum marianum</i>	67
2.1. Teneur en polyphénols totaux, des flavonoïdes.....	67
2.2. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)	67

3. Tests <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	69
II. Activité antioxydante du <i>Silybium marianum</i> , de la L-cystéine, et de la L-méthionine contre la toxicité du nickel: étude <i>in vivo</i> ; Exploration des fonctions vitales et du stress oxydant	72
1. Etude pondérale	72
1.1. Influence du traitement sur la croissance corporelle	72
1.2. Influence du traitement sur les rapports organo-corporels	74
2. Effet sur les paramètres biochimiques	77
2.1. Influence du traitement sur la glycémie	77
2.2. Influence du traitement sur le profil lipidique	77
2.3. Influence du traitement sur la fonction hépatique	79
2.4. Influence du traitement sur la fonction rénale	84
3. Etude hématologique	86
4. Influence de traitement sur la variation de paramètres du stress oxydant	88
4.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)	88
4.2. Taux du glutathion réduit (GSH)	88
4.3. Activité de la glutathion peroxydase (GSHPx)	91
4.4. Activité de la catalase (CAT)	91
4.5. Activité de Superoxyde dismutase (SOD)	91
5. Etude histologique	96
5.1. Impact sur l'histoarchitecture hépatique	96
5.2. Impact sur l'histoarchitecture rénale	98
Chapitre III: DISCUSSION	100
I. Evaluation des effets cytotoxiques de nickel chez les rats Wistar: Effets sur certains facteurs de croissance et sur la variation des paramètres biochimiques, hématologiques, histopathologie et le profil du stress oxydant	100
II. Activité antioxydante du chardon-Marie contre la toxicité de nickel: étude <i>in vivo</i> ; exploration des fonctions vitales et du statut oxydant	105
III. Effets de la L-met et de la L-cys contre la toxicité de nickel: étude <i>in vivo</i> ; exploration des fonctions vitales et du statut oxydant	109
Conclusion générale et perspectives.....	117
Références bibliographiques.....	119

ANNEXES

Liste des figures

Figure 01: Interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchioalveolar du poumon.....	12
Figure 02 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	14
Figure 03: Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons mitochondriale et des sites de production des ROS.....	16
Figure 04 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	17
Figure 05 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	18
Figure 06: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	19
Figure 07: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	20
Figure 08. Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase.....	22
Figure 09. Photos montrant les différents aspects de la plante <i>Silybum marianum</i> L.....	28
Figure 10: Flavanolignanes majeures de la silymarine	29
Figure 11 : Diagramme récapitulatif des effets favorables de la silibinine chez les patients présentant une affection hépato-biliaire.....	30
Figure 12 : Effets anti-cancérigènes potentiels de silymarine (les différentes cibles moléculaires).....	33
Figure 13 : Acides aminés soufrés.....	37
Figure 14: Principales voies du métabolisme des acides aminés soufrés	37
Figure 15: Les voies d'utilisation de la cystéine.....	40
Figure 16: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	51
Figure 17 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.....	59

Figure 18: Photos de chromatogramme résultant de l'analyse de différents extraits et les standards.par CCM	69
Figure 19 : Activité antiradicalaire des extraits polaires des graines de <i>Silybum marianum</i> et des standards	70
Figure 20 : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml.....	71
Figure 21: Profil de la croissance corporelle chez les lots expérimentaux en fonction de la durée du traitement.....	72
Figure 22: Variation des poids absolus (PA) des organes chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	75
Figure 23 : Variation du poids relatif de certains organes (Foie, reins et testicules) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	76
Figure 24: Variation de la concentration sérique du glucose chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	77
Figure 25: Variation de la concentration sérique des triglycérides, du cholestérol, et des lipides totaux chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	78
Figure 26 : Représente la concentration sérique des protéines totales et de la bilirubine totale chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	80
Figure 27 : Variation des activités enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) chez les lots expérimentaux.....	81
Figure 28: Variation des activités enzymatiques du lactate déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline (PAL) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	83
Figure 29: Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine, et de l'acide urique chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	85
Figure 30: Variation malondialdéhydedans les organes (Foie, reins et testicules) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	89

Figure 31: Variation de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes (Foie, rein et testicule) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	90
Figure 32: Variation d l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie, le rein, et les testicules, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	93
Figure 33: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie, le rein, et les testicules, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	94
Figure 34: Variations de l'activité de superoxyde dismutase (SOD) au niveau des organes (foie, reins et testicules) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.....	95
Figure 35: Observation microscopique des hépatocytes chez les rats témoins (A) et traités par la silymarine (B), cysteine (C), méthionine (D), le sulfate de nickel (E) et les combinaisons ; Ni+Sil (F), Ni+Cys (G) et Ni+Met (H) après 21 jours de traitement (Gr x 400). Coloration à l'Hématéine-éosine.....	97
Figure 36: Observation microscopique des capsules de Bowman et des tubes rénaux chez les rats témoins (A) et traités par la silymarine (B), cysteine (C), méthionine (D), le sulfate de nickel (E) et les combinaisons ; Ni+Sil (F), Ni+Cys (G) et Ni+Met (H) après 21 jours de traitement (Gr x 400). Coloration à l'Hématéine-éosine.....	99

Liste des tableaux

Tableau 01 : Représente les valeurs de DL ₅₀ des composés de nickel.....	8
Tableau 02. Rendements des extractions exprimés en g de matière sèche et en % par rapport au poids des graines.....	66
Tableau 03. Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux dans l'extrait méthanolique de chardon marie.....	67
Tableau 04. Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique du <i>Silybum marianum</i> dans le système chloroforme/acétone/acide formique (75 :16,5:8,5) (V/V/V) Adsorbant : gel de silice. Révélation sous UV (254 nm).....	68
Tableau 05: Variation de poids corporel (g) et le gain de poids (g) chez les rats expérimentaux après 21 jours de traitement... ..	73
Tableau 06 : Variation du nombre des globules rouges (nGR), globules blancs(nGB), du taux moyen d'hémoglobine(Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht), du volume globulaire moyen(VGM), de la concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH) et de la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH), chez les lots expérimentaux	87
Tableau 07: Variation de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px), du catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD) au niveau de foie, rein et testicule chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement	92

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALAT : Alanine Amino Transférase

ASAT : Aspartate Amino Transférase

ASS : Acides Aminés Soufrés

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

CDO : Cystéine dioxygénase

CSD : Cystéine sulfinatase décarboxylase

CSAT : Cystéine sulfinatase aminotransférase

Cu/Zn-SOD: Superoxyde dismutase aux ions cuivre et zinc.

CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 : Les isoenzymes du cytochrome P450

DL50 : Dose létale 50

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

Fd : Facteur de dilution

fL : femtolitres

F 2-6P₂ : Fructose 2,6-bisphosphate

GCL : Glutamate-cystéine ligase

GPx : Glutathion peroxydase

GS : Glutathion synthétase

GSSG : Disulfure de glutathion (Glutathion oxydé)

GR : Glutathion réductase.

GST : Glutathion S-transférase

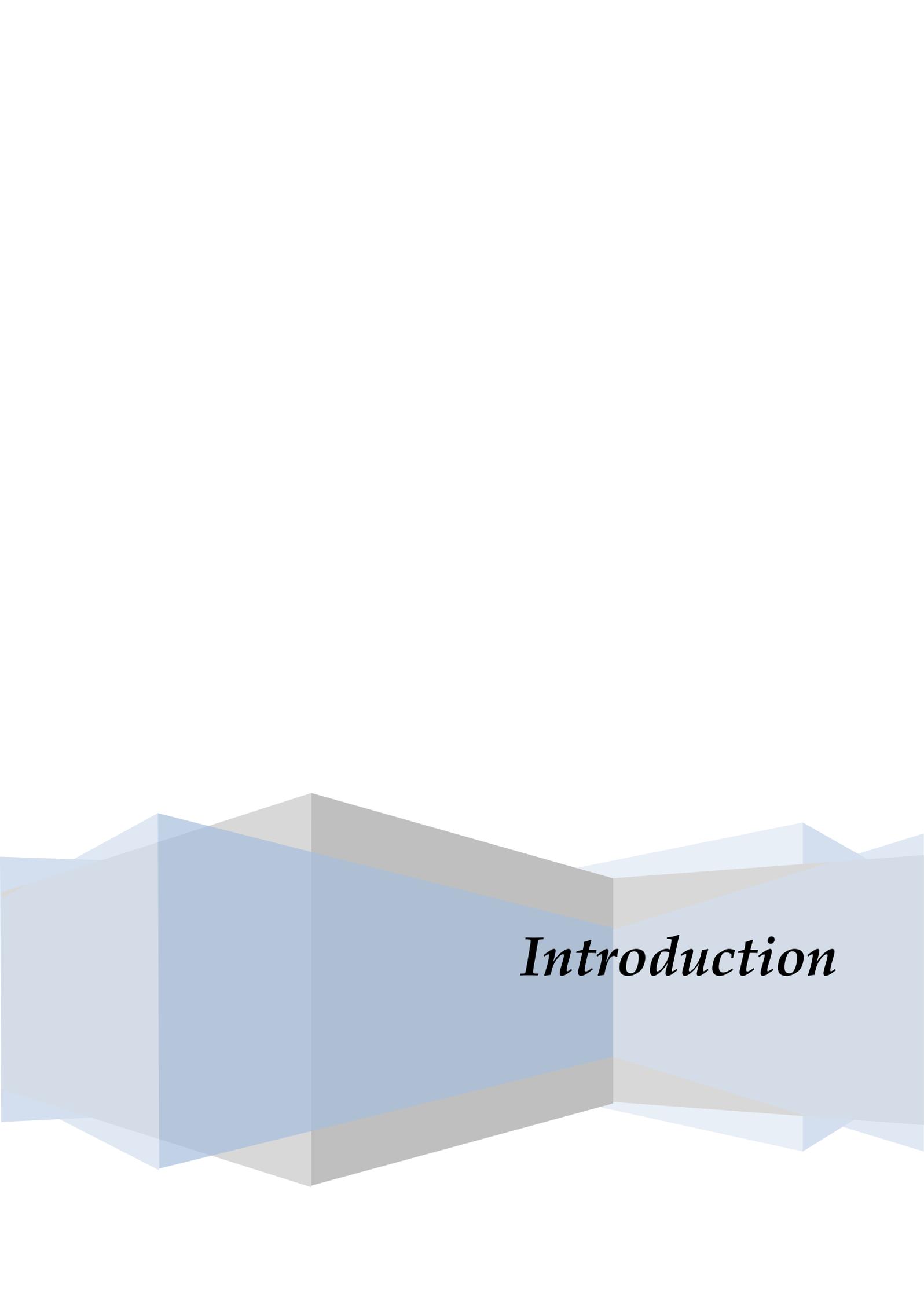
H₂S :Sulfure d'hydrogène

HDL : High density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)

IC₅₀ :Concentration inhibitrice de 50 %

IgA : Immunoglobuline A

IgE : Immunoglobuline E
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
LDL : Low density lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)
LPO : Peroxydation lipidique
MTHFR : Méthylènetétrahydrofolate réductase,
NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO· : Monoxyde d'azote
NOO- : Peroxynitrite
ONOOH: Acide peroxynitreux
S9 : Surnageant 9000 tours/min (cytosol)
SAM :S-adenosylméthionine
TBARS: Thiobarbituric acid reactive species
TBS : Tris buffered saline (tampon tris/NaCl)
VLDL : Very low density lipoprotein.



Introduction

Introduction générale

Le développement des activités humaines depuis le début de l'ère industrielle s'est traduit, pour la biosphère, par un accroissement et une diversification des pollutions, lourdes de menaces pour notre équilibre futur et le bien être de notre espèce.

La pollution métallique pose un problème particulier, car les métaux ne sont pas biodégradables. Ils s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Par ailleurs, plusieurs métaux sont essentiels au fonctionnement de nos enzymes, notamment le zinc, le fer, et le cuivre. Néanmoins, au delà d'une certaine concentration, tous les métaux deviennent toxiques (INERIS, 2006). Certains appelés métaux lourds, sont toxiques aux concentrations auxquelles on les trouve dans l'environnement. Des émissions naturelles et anthropiques contribuent à la charge des différents métaux dans l'air, l'eau, le sol, et les organismes vivants. Parmi les composés métalliques polluants de l'environnement, figure le nickel.

Le nickel est fortement répandu dans les industries modernes. Plusieurs procédés industriels peuvent être à l'origine de la présence du nickel dans l'environnement, dont l'exploitation et le raffinage de ce dernier, la production de batteries cadmium/nickel, la combustion de carburant et l'incinération des déchets, la transformation du plomb dans les fonderies et la production de boues de station de traitement des eaux usées (Statistiques Canada, 2012). C'est un polluant environnemental potentiellement carcinogène, l'exposition au nickel peut provoquer des effets toxiques sur de nombreux tissus en l'occurrence, les reins, le foie, les poumons, sur l'hématopoïèse, la reproduction et sur le développement (Boulila *et al.*, 2015).

Le nickel du fait de son affinité pour les protéines, les acides aminés et l'ADN, présente de nombreux effets cytotoxiques, parce qu'il augmente la concentration des oxydants dans les cellules. Il induit la production des radicaux libres et peut provoquer une peroxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques, il peut ainsi altérer le statut antioxydant de la cellule en causant des dommages au niveau de la cellule (Chen *et al.*, 2003).

De ce fait, de nombreuses enquêtes épidémiologiques ont montré l'importance d'augmenter le pouvoir antioxydant de l'organisme avec les antioxydants exogènes, qu'ils

soient naturels ou de synthèse ; comme les vitamines, les acides aminés soufrés, les oligoéléments et les substances naturelles comme celles extraites des végétaux.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant. Dans ce cadre, la présente étude s'est intéressée, à l'effet protecteur des extraits d'une seule plante médicinale; le chardon-marie (*Silybum marianum*) riche en silymarine, et est utilisée dans le traitement d'un grand nombre de désordres hépatiques incluant la cirrhose, des stéatoses alcooliques, des empoisonnements du foie ou des hépatites virales, elle favorise la reconstitution du foie après destruction des cellules en augmentant la synthèse protéique et possède également une action anti-radicalaire (Jalali *et al.*, 2017). Aujourd'hui, des pouvoirs hépatoprotecteur, sédatif, digestif, hémostatique, anti-inflammatoire et diurétique ont été attribués à ce végétal et des études récentes ont démontré que cette plante possède des propriétés anti-tumorales et anti-cancérogènes (Eldemerdash *et al.*, 2016).

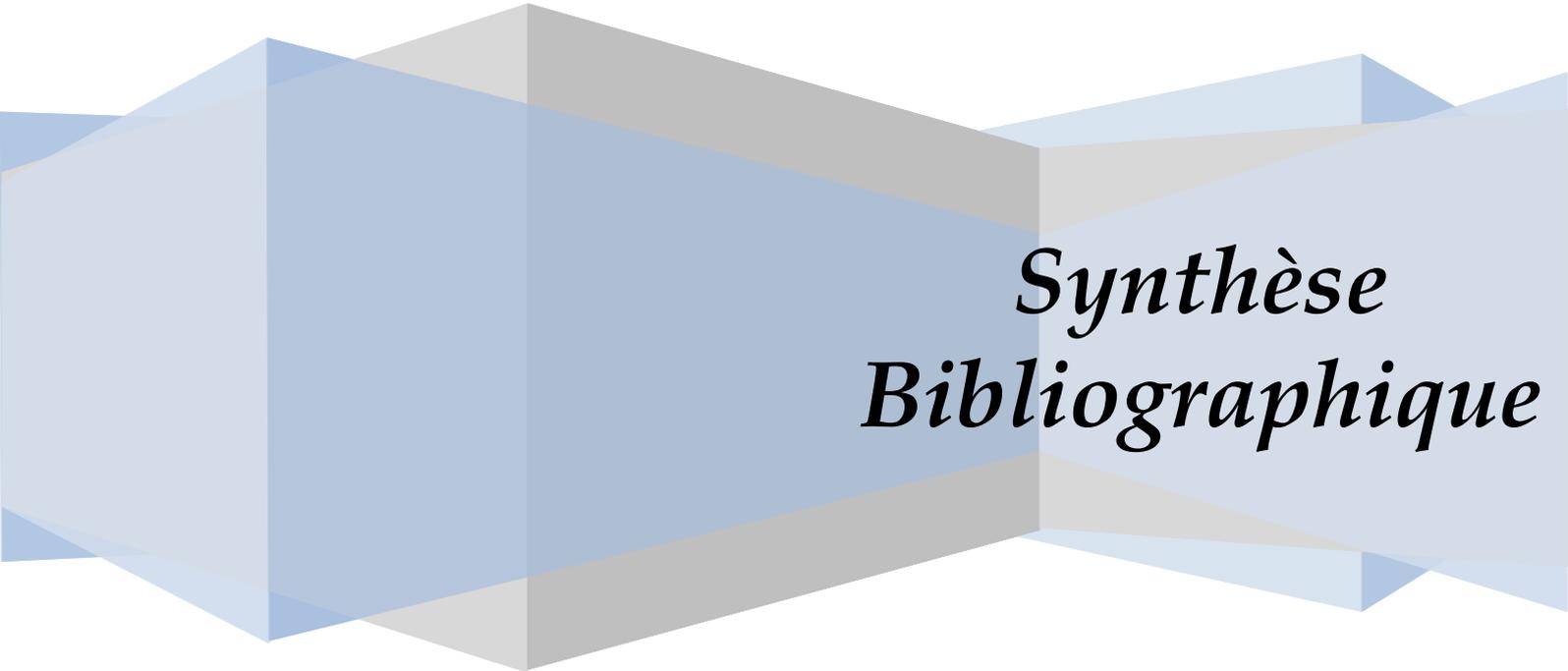
Les acides aminés soufrés jouent un rôle central dans le maintien de l'intégrité des systèmes cellulaires en influençant l'état redox cellulaire et la capacité à détoxifier les composés toxiques. La L-méthionine et la L-cystéine sont des précurseurs du glutathion, qui est considéré comme pivot pour la désintoxication du stress oxydatif cellulaire et sont capables de piéger et de neutraliser les radicaux libres et leurs effets toxiques. Ce sont d'excellents chélateurs, grâce à la présence d'un atome de soufre, et sont impliquées dans l'élimination des métaux lourds (Hg, Pb) (Nada *et al.*, 2015).

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail qui a pour objectif d'étudier d'une part les effets cytotoxiques du sulfate de nickel sur certaines fonctions vitales et sur le stress oxydant, chez le rat, et d'autre part, de tester les effets modulateurs de deux acides aminés soufrés; la L-méthionine et L-cystéine, ainsi que l'effet des extraits de la plante *Silybum marianum* L. contre la toxicité de nickel.

Afin de présenter l'étude menée dans ce domaine, nous allons dans un premier temps rappeler l'état des connaissances bibliographiques sur le nickel, le stress oxydatif et l'action des acides aminés soufrés ainsi que l'extrait du chardon-marie. L'étude expérimentale utilisant comme support animal le rat blanc de la souche «Wistar ». Notre investigation a comporté deux parties :

- La première partie présente une étude phytochimique et pharmacologique des extraits de *Silybum marianum* pour avoir quelques informations concernant ses constituants et ses activités antioxydantes in vitro.
- La deuxième partie expérimentale, consiste à évaluer les effets modulateurs de la supplémentation en extrait organique du *Silybum marianum* ou en deux AAS (L-met ou L-cys) vis-à-vis le stress oxydant induit par le sulfate de nickel in vivo au niveau de certains organes. L'influence des différents traitements ont été analysés par :
 - ✓ La détermination de quelques paramètres de croissance ;
 - ✓ L'évaluation de certains paramètres biochimiques et hématologiques ;
 - ✓ L'étude histologique de deux organes cibles (Foie et rein) ;
 - ✓ L'exploration du profil du stress oxydant hépatique et rénal : MDA, GSH, GSH-Px, SOD et CAT.

Et enfin, nous discuterons l'ensemble de résultats obtenus dans ce manuscrit, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.



*Synthèse
Bibliographique*

I. NICKEL

1. Généralités :

Le chimiste suédois Alex Cronstedt a été le premier à isoler le nickel en 1751, il est le vingt-quatrième élément naturel en abondance dans la croûte terrestre et distribué largement dans l'environnement (Kazimerz *et al.*, 2003). La croûte terrestre contient environ 0,009 % de nickel. Les sources naturelles de nickel atmosphérique incluent les poussières d'émissions volcaniques, l'érosion des roches et des sols, la combustion des carburants, l'émission lors d'extraction et de raffinage. La consommation importante de produits contenant du nickel conduit inévitablement à la pollution dans l'environnement par le nickel et ses dérivés à tous les stades de la production, utilisation et distribution. L'inhalation de particules et de vapeurs de nickel et l'absorption cutanée de nickel sont les principales formes d'exposition professionnelle à cet agent. Les principaux types d'ouvriers exposés au nickel sont ceux qui travaillent dans les raffineries ou les usines de traitement du nickel (Sunderman, 1989). L'exposition humaine au nickel se produit à l'origine par inhalation et l'ingestion et elle est particulièrement haute parmi les travailleurs de métallurgie de nickel.

2. Identification et caractérisation

Le nickel est un métal d'un blanc argenté qui possède des propriétés métalliques typiques, sa conductivité électrique et sa conductivité thermique sont élevées, son point de fusion est de 1452 C° et il peut être étiré, laminé, forgé et poli. Il résiste à l'action de l'air et de l'eau aux températures ambiantes (-20 à 30°C) et il est donc souvent utilisé comme revêtement électrolytique de protection. Il est magnétique, mais pas autant que le fer (Cotton et Wilkinson, 1988). Sa concentration moyenne étant d'environ 75 mg/g, son numéro atomique est 28 et il a une masse atomique de 58,71.

Il existe sous les états d'oxydation allant de -1 à +4, mais son état de valence le plus courant dans l'environnement est Ni²⁺. Il est présent dans la nature en tant que constituant trace d'une grande variété de minéraux, particulièrement ceux qui contiennent beaucoup de fer et de magnésium comme l'olivine et les pyroxènes (Avias, 1972). Le nickel forme couramment des complexes stables avec des ligands contenant de l'oxygène, du soufre, du phosphore ou de l'arsenic, qui jouent le rôle d'atomes donneurs. Le nickel métallique ne se rencontre pas fréquemment dans la nature, mais il existe (sous forme d'un alliage (fer-nickel) dans certaines roches ultramafiques riches en fer et en magnésium (Duke, 1980).

3. Sources d'exposition :

Il existe des sources naturelles de nickel mais il est principalement obtenu à partir de minerais de nickel sulfurés (pyrrhotite, nickeliferreuse, pentlandite, chalcopyrite) dans lesquels sont également présents le fer et le cuivre. Les niveaux ambiants de nickel sont bas, typiquement 1-20 ng/m³ dans l'air des régions urbaines et rurales sans évident sources. Cependant, que les niveaux de 100-250 ng/m³ ont été rapportés dans les places proches de raffinerie de nickel (Chau et Kulikovskiy-Cordeiro, 1995). La cigarette peut augmenter la quantité de nickel par inhalation, autant que 4 µg par paquet de cigarettes (Labstat, 1991). Les aliments les plus riches en nickel sont les végétaux (légumes et céréales) et en particulier le cacao et le chocolat, le soja, les légumes secs, les noix et les céréales.

Les composés du nickel sont le plus souvent présents sous forme de particules dans l'atmosphère, excepté le nickel tétracarbonyle que l'on retrouve exclusivement sous forme de vapeur. Le nickel est un des constituants naturels des poussières en suspension dans l'atmosphère et provient de la croûte terrestre, sa concentration est de l'ordre de 0,03 % (INERIS, 2006). Il est dispersé sous diverses formes à la suite de phénomènes naturels (ex.: feux de forêts, embruns de mer, éruptions volcaniques). L'altération et l'érosion naturelles de matériaux géologiques libèrent du nickel dans les eaux superficielles et les sols.

Les principales sources anthropiques sont la combustion de charbon ou de fuel, l'incinération des déchets, l'épandage des boues d'épuration, l'extraction et la production de nickel, la fabrication de l'acier, le nickelage et les fonderies de plomb (Mac Latchy, 1993).

4. Secteur d'utilisation

Les applications du nickel à l'état pur sont beaucoup moins importantes que celles sous forme d'alliage avec d'autres composants. Ainsi, la majorité de tout le nickel entre dans la fabrication d'environ 3000 alliages qui ont plus de 250000 applications industrielles ; dans les secteurs de la fabrication d'automobiles et de la construction navale ainsi que dans les industries électrique, pétrolière, alimentaire et chimique. Ces alliages et composés de nickel sont utilisés dans la fabrication de la monnaie, de bijoux, de placages, de batteries et de couleurs céramiques, armement, des prothèses médicales, et des composants électriques, tels que les piles ainsi que pour réaliser des revêtements électrolytiques des métaux (nickelage) (USAF, 1990).

5. Cinétique du nickel:

5.1. Absorption :

Le nickel et ses composés sont absorbés par les voies respiratoires et dans une moindre mesure par le tube digestif, proportionnellement à la solubilité des composés (PISSC, 1991). Environ 20 à 35 % du nickel inhalé (sous forme de composés peu solubles) sont absorbés (ATSDR, 1997). Les composés solubles du nickel (chlorure, sulfate) sont plus facilement absorbés par le tractus respiratoire, alors que de 1 à 10 % seulement du nickel ingéré est absorbé, cette proportion dépendant largement de la composition de l'alimentation (PISSC, 1991). L'absorption du nickel existe également par voie cutanée (Denkhaus *et al.*, 2001). Cette voie est peu significative quantitativement mais importante cliniquement dans la pathogénie de la dermatite de contact.

5.2. Distribution :

Le nickel est distribué aisément partout dans le corps mais peut être affecté par la voie d'exposition, la forme chimique, et le temps après exposition. Bien que les reins et les poumons soient les sites fondamentaux d'accumulation de nickel (Ishimatsu *et al.*, 1995), autres organes tels que la rate, le foie, le cœur, les testicules et les tissus adipeux, ainsi que dans les tissus du système nerveux périphérique et du cerveau peuvent accumuler aussi le métal à une ampleur beaucoup moindre (Oskarsson *et al.*, 1979).

Le nickel est su pour lier aux protéines spécifiques et/ou acides aminés, il est lié dans le sérum à l'albumine, la L-histidine et l' α 2 macroglobuline, une faible fraction est liée aux acides aminés (cystéine et histidine). Ces ligands sont instrumentaux dans le transport et la distribution de nickel dans le corps (INERIS, 2006).

5.3. Excrétion :

Après administration intra-trachéale, la voie d'élimination du nickel chez les rats dépend de la solubilité des composés; Pour les composés solubles (chlorure, sulfate), environ 70 % de la dose administrée est excrétée dans l'urine en 3 jours. Pour les composés moins solubles (oxyde, sulfure de nickel), une grande partie de la dose est excrétée dans les fèces (ATSDR, 1997).

Les estimations de la demi-vie d'élimination urinaire de nickel allant de 20 à 60 h pour les composés solubles et de plusieurs semaines à années pour les composés insolubles (particules retenues au niveau pulmonaire) (Denkhaus *et al.*, 2001).

6. Evaluation toxicologique :

Les effets sur la santé de l'exposition au nickel dépendent du type, de la concentration et de la durée de l'exposition. Il faut également tenir compte de certains facteurs comme l'âge, le sexe, l'alimentation, les antécédents familiaux, le style de vie et la santé de la personne. En général, les concentrations typiques de nickel n'ont pas d'effets nocifs sur la santé.

6.1. Toxicité aiguë :

6.1.1. Etude chez l'homme

Les intoxications aiguës par le nickel sont exceptionnelles chez l'homme. Les doses ingérées associées à des effets toxiques étaient très élevées, au-delà de 7 mg/kg. pc (Sunderman *et al.*, 1989). La toxicité aigue se décompose 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 (INERIS, 2006).

Un décès par syndrome de détresse respiratoire a été observé chez une personne qui pulvérisait du nickel lors d'un procédé de soudure sans porter d'équipement de protection (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/m³. Un arrêt cardiaque est survenu 4 heures après l'ingestion accidentelle de 570 mg nickel/kg (sous forme de sulfate de nickel) chez un enfant de 2 ans (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 (7,1 et 35,7 mg de nickel/kg). Les symptômes incluent des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales), maux de tête, sensations d'ébriété et une augmentation transitoire des érythrocytes, de la bilirubine sérique et de l'albumine urinaire (Sunderman *et al.*, 1988).

Des composés solubles du nickel ont induit une irritation de la peau à la suite d'une application cutanée dans plusieurs études cliniques (Wahlberg, 1990; Kolokitha et Chatzistavrou, 2009).

6.1.2. Etude chez l'animal

Les données de toxicité aiguë du nickel par voie orale indiquent que les composés solubles du nickel (acétate, sulfate) sont plus toxiques que les composés moins solubles (monoxyde et sous sulfure de nickel). Les principaux signes observés incluent :

- ✓ des troubles rénaux (rat, souris et chien) ;
- ✓ des effets cardiovasculaires, gastro-intestinaux, hématologiques et hépatiques (rat) ;
- ✓ une atteinte pulmonaire (chien et rat) ;
- ✓ des troubles neurologiques, à type de léthargie, ataxie, prostration (rat).

Après administration orale unique, les DL₅₀ s'échelonnent de 39 à 141 mg/kg de poids corporel chez le rat et la souris pour l'acétate de nickel et le sulfate de nickel (ATSDR, 2005). La DL₅₀ de l'oxyde de nickel ou du disulfure de trinickel (sous sulfure de nickel) est supérieure à 3600 mg/kg de poids corporel chez le rat (Tab. 01).

Chez 28 rats soumis par inhalation à une exposition unique de 36,5 mg de nickel/m³(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.

Tableau 01 : Représente les valeurs de DL₅₀ des composés de nickel (INERIS, 2006).

	Composés	DL ₅₀ (mg/kg)	Espèces	Références
Inhalation	Tétracarbonyl-nickel	0,100	Rats, 20 minutes	OMS IPCS, 1991
		0,240	Rats, 30 minutes	
		0,067	Souris, 30 minutes	
Voie orale	Sulfate de nickel	39	Rats Sprague-Dawley (F)	Mastromatteo,1986
	Acétate de nickel	116	Rats Fischer 344 (F)	Haro <i>et al.</i> , 1968
		136	Souris Swiss-Webster (M)	
	Monoxyde de nickel	>3930	Rats Sprague-Dawley	Mastromatteo,1986
Sous sulfure de nickel	> 3665	Rats Sprague-Dawley		

6.2. Toxicité sub-chronique et chronique :

6.2.1. Effets systémiques:

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel par inhalation. Le nickel qui parvient au niveau pulmonaire a tendance à persister au niveau des poumons. La rétention dépend notamment de la solubilité des composés et du captage cellulaire. La muqueuse nasale peut retenir du nickel pendant de nombreuses années (Torjussen *et al.*, 1979). Les formes insolubles, après phagocytose par les macrophages, peuvent générer des quantités très importantes d'espèces réactives de l'oxygène, surtout avec le sous-sulfure Ni_3S_2 (Huang *et al.*, 1994).

Des cas d'asthme ont été décrits à la suite d'une exposition professionnelle au nickel (Shirakawa *et al.*, 1990). Une augmentation de l'incidence des décès par pathologie respiratoire a été trouvée chez des travailleurs exposés chroniquement à des concentrations supérieures à 0,04 mg de nickel/m³, sous forme de monoxyde ou de métal (Doll *et al.*, 1990). Les effets respiratoires étaient de type bronchite chronique, emphysème, diminution de la capacité vitale. Cependant, la toxicité observée ne peut être uniquement attribuée au nickel puisque les travailleurs étaient également exposés à d'autres métaux.

Chez l'animal, après l'administration à des chiens, pendant 2 ans, des doses de 3,29 ou 70 mg Ni/kg/jour, Ambrose et ses collaborateurs (1976), observent des retards de développement corporel et des atteintes histologiques au niveau pulmonaire avec une augmentation du poids des reins et du foie. Une étude de deux ans a montré que le monoxyde de nickel et le sous sulfure de nickel (0,97 mg de nickel/m³) étaient cancérogènes par inhalation chez le rat (Dunnick, 1995).

On a observé des effets immunologiques, y compris une diminution de la réponse mixte des lymphocytes, de l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires et de l'activité des cellules tueuses naturelles de la rate, ainsi qu'une augmentation du nombre des cellules formatrices d'anticorps dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons, chez des souris exposées à du disulfure de tri nickel à des concentrations de nickel de 0,45 mg/m³ ou plus (Benson *et al.*, 1990). 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 (Shannon *et al.*, 1991). Par ailleurs, une augmentation significative d'autres protéines sérique pouvant être impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire (alpha1-antitrypsine, alpha2-macroglobuline) a été observée. Ces modifications suggèrent que le système immunitaire a été stimulé par l'exposition au nickel.

6.2.2. Effets sur la reproduction et tératogénèse

On note l'absence d'études chez l'homme quand aux effets du nickel par voie orale ou cutanée, sur la reproduction et sur le développement. Une augmentations apparentes dans les avortements spontanés et les malformations structurelles des nouveaux nés, chez 356 femmes employées dans une raffinerie de nickel, exposées par inhalation à des concentrations de 0,084 à 0,196 mg de nickel/m³ (sous forme de sulfate de nickel) (Chashschin *et al.*, 1994).

Différentes études menées sur des souris et/ou rats exposés par voie orale à différentes formes de nickel mettent en exergue l'impact sur la descendance : létalité des nouveaux nés, tailles et poids corporels des nouveaux nés réduits (Smith *et al.*, 1993; Sli, 2000). L'exposition aux sels de nickel par voie cutanée (sulfate de nickel à 60 mg de nickel/kg/jour pendant 30 jours) induit des effets dégénératifs de l'épithélium germinatif du testicule et de l'épididyme et altère la spermatogénèse (Benson *et al.*, 1988), une atteinte de la spermatogénèse, une apparition de cellules apoptotiques au niveau de la paroi des tubes séminifères et une tératospermie (Laila *et al.*, 2003). Ainsi, chez le rat le nickel agit directement sur les cellule Leyding en réduisant l'activité de la stéroïdogénèse testiculaire et des concentrations plasmatiques en testostérone et en augmentant celles du cholestérol et de l'acide ascorbique dans le testicules de rat (Das *et al.*, 2002) et diminue le nombre de spermatogonies et augmente les concentrations des tubes séminifères (Käkelä *et al.*, 1999).

Chez la femelle cyclique le nickel affect le développement et la maturation des follicules de l'ovaire, réduit également la stéroïdogénèse ovarienne et perturbe la fonction hypophysaire (Wang et Zhu, 2003). L'exposition des femelles gestantes est associée à une diminution de l'implantation, à un développement embryonnaire retardés, une augmentation des résorptions et à une augmentation des malformations structurales.

La concentration du chlorure de nickel augmente dans le liquide amniotique au début de la gestation et dans le placenta allantochorial à la fin de la gestation (Mas *et al.*, 1986). De plus, chez la rate lactante le nickel transféré vers le nourrisson par le lait et provoque une altération de la composition du lait maternel par augmentation des lipides et diminution des protéines et de lactose (Dostal *et al.*, 1989).

6.2.3. Effets cancérigènes du nickel

En 1990, le nickel et les composés du nickel ont été classés par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 1 « cancérigène potentiel pour l'homme ».

Les différentes études épidémiologiques portant sur les effets cancérigènes du nickel ont été basées sur des études de cohorte de travailleurs de raffineries et ont mis en évidence une augmentation du risque de cancer des voies aériennes supérieures et des poumons (Doll *et al.*, 1990; Woźniak et Błasiak, 2004). Le risque de cancer des voies respiratoires est accru lorsque la concentration atmosphérique du nickel soluble supérieure à 1 mg Ni/m³ et celle de dérivés insolubles supérieure à 10 mg Ni/m³ (Oller *et al.*, 1997). L'exposition en milieu professionnel au sous-sulfure de nickel a été responsable de cancers primitifs de l'ethmoïde et des sinus de la face ainsi que de cancers bronchiques primitifs (INRS, 1992). Chez des rats Fisher 344 l'exposition chronique à des poussières de nickel a entraîné une augmentation des tumeurs pulmonaires (Dunnick *et al.*, 1995).

6.2.4. Mutagénicité, et génotoxicité du nickel

Plusieurs études expérimentales et épidémiologiques ont montré que le nickel (Ni²⁺) est génotoxique (Costa *et al.*, 2002). Les mécanismes de cette génotoxicité sont multiples soit des cassures mono brins et double brins de l'ADN pour des concentrations de 0.1-10 µM (soit environ 6-600 µg/l) avec activation de la Poly ADP-ribose polymérase qui est normalement induite en présence de lésions dans l'ADN (Lei *et al.*, 2001), soit par la production d'espèces réactives de l'oxygène tel que le radical hydroxyle (Chen *et al.*, 2003), ou par inhibition des processus de réparation des lésions de l'ADN causées entre autres par les UV (Hu *et al.*, 2004).

Les particules non hydrosolubles du Ni(II) (Ni₃S₂ et NiO) entrent dans la cellule par phagocytose et l'ion de Ni(II) est ensuite libéré de vésicules phagocytaires dans le cytoplasme et le noyau. Les ions des composés solubles du nickel (ex., NiSO₄, NiCl₂, Ni (II) acétate) est transporté dans la cellule via les canaux du calcium, le système transporteur cationique divalent DMT-1 (Nramp 2) et la diffusion. Dans la cellule, le nickel forme des complexes avec différents ligands et catalyse la production d'OH à partir d'H₂O₂ (Li et Zamble, 2009) (figure 01).

Les ROS générés par Ni (II) et Ni (II) nucléaire interagissent avec l'ADN et les histones, provoquant ainsi des dommages promutagénique à l'ADN et des altérations épigénétiques, la perturbation de l'homéostasie du fer cellulaire et l'activation de la voie de signalisation de l'hypoxie, toutes associées étroitement au stress oxydatif, sont considérés comme les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse induite par Ni (Lee *et al.*, 2012).

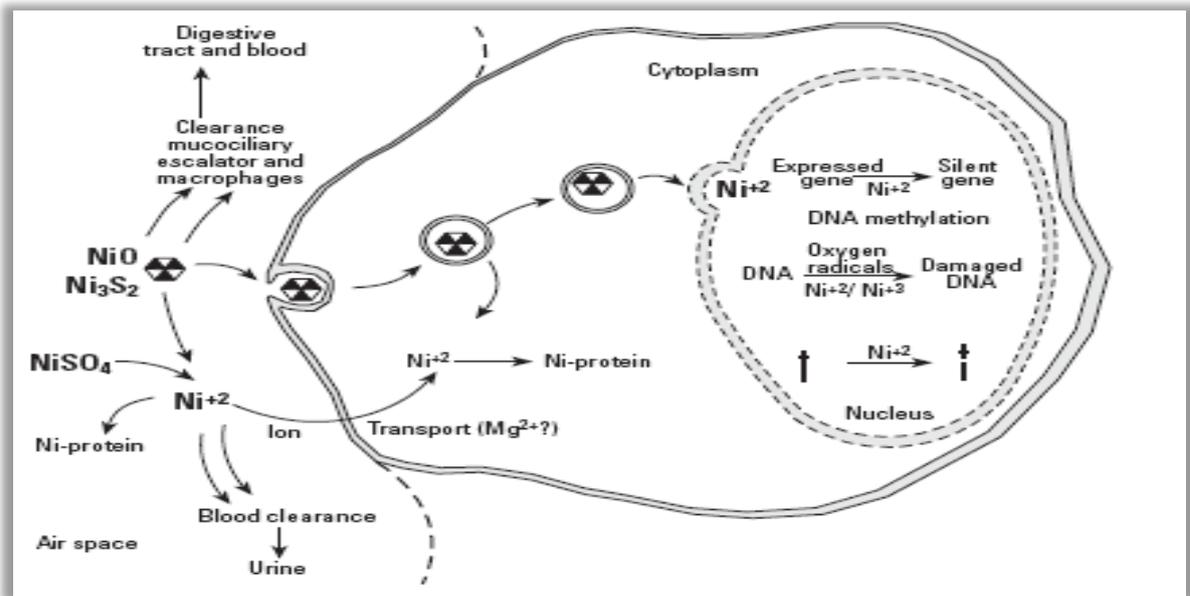


Figure 01: Interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchioalveolar du poumon (Oller *et al.*, 1997).

6.2.5. Manifestations allergiques :

Le nickel est un allergène, responsable de dermatites de contact. Globalement, l'incidence de l'allergie au nickel est de l'ordre de 8 à 14 % dans la population féminine, et de 1% dans la population masculine (UKWIR, 1996). Un certain nombre d'études ont démontré des effets dermiques chez les populations sensibilisés suite à l'ingestion de nickel. Certaines études indiquent que l'ingestion de nickel peut aggraver un eczéma. Dans leur travail Haber et ses collaborateurs (2000) citent trois études qui fournissent des informations intéressantes sur les doses provoquant un eczéma chez les personnes sensibilisées sans pour autant pouvoir formellement définir un seuil de déclenchement. La majorité des individus, voir tous réagissent au plus fortes dose de nickel testées (soit 2,5 ou 5,6 mg en prise unique). Quelques individus réagissent à des doses de 1,2 mg de nickel.

La plus faible dose par voie orale, donnée à 15 individus (3 exclus) sensibilisés au nickel et exacerbant un eczéma sur les mains était proche de 4,9 mg (Nielsen *et al.*, 1990). La dose de provocation varie de 0,5 à 20 mg, avec une dose moyenne de 6,19 mg. Un total de 15 patients (8,11%) ont réagi à la dose minimale de 0,5 mg et 21 (11,35%) à la dose maximale de 20 mg (Antico et Soana, 2015).

II. LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydant peut être défini comme étant le résultat d'un déséquilibre profond de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense, avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Favier, 2003).

Dans les circonstances normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus de réactions énergétiques ou de défense contre des agents pathogènes (bactéries, virus), cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux génère un «stress oxydant» (Halliwell et Whiteman, 2004).

La production excessive de radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acide nucléiques (Angelos *et al.*, 2005). L'exposition chronique au stress oxydatif peut favoriser l'apparition de, dépôt de lipides oxydés fibrose, cancers et maladies cardiovasculaires, mutation ...etc (Favier, 2003).

1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome ou molécules) ayant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés sur la loge extérieure. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules qui devient alors déséquilibrée donc instable (Delattre *et al.*, 2005). Leur hyperréactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formants des produits très instables. Cependant de faibles concentrations de ces espèces réactives sont paradoxalement indispensables pour assumer les fonctions physiologiques normales comme l'expression des gènes, prolifération cellulaire, la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (Defraigne et Pincemail, 2007).

Parmi les différentes classes de radicaux libres, on peut distinguer les radicaux primaires qui jouent un rôle particulier en physiologie. Les autres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) (Valko *et al.*, 2006).

Généralement les espèces réactives de l'oxygène ERO sont divisées en des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde (O_2^\bullet), les radicaux hydroxyles (HO^\bullet), peroxyde (ROO^\bullet), alcoxyde (RO^\bullet)), et des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Fig. 02).

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) appartiennent à une autre classe de radicaux libres, les espèces réactives de l'azote (RNS). Ils peuvent être convertis en espèces réactives non radicalaires telles que ; le nitroperoxyde ($ONOOH$), Acide nitreux (HNO_2), le peroxydinitrite ($ONOO^-$) et l'ion nitronium (NO^{2+}). Les espèces réactives du chlore RCS comme l'acide hypochlorique ($HOCl$).

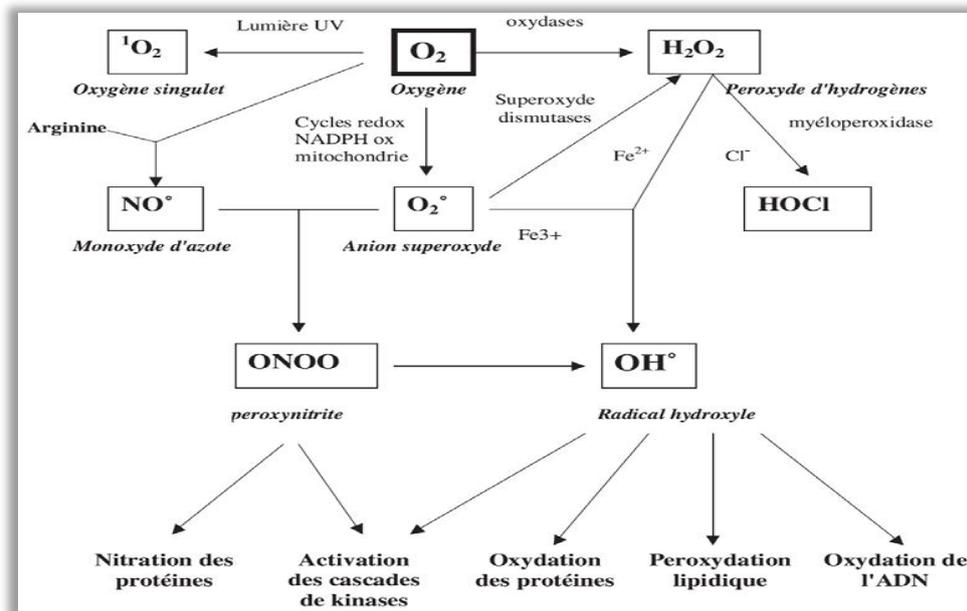


Figure 02 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

2. Les sources de production des radicaux libres :

Les sources de production des radicaux libres sont nombreuses. Dans les cellules la production des ERO est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P) H oxydase membranaire, qui génèrent O_2^\bullet en utilisant NADH ou NADPH comme substrat, et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, c'est principalement au niveau du complexe I (NADH déshydrogénase) et du complexe III (cytochrome b-c) que la production s'opère (Fig. 03). Cependant, certains électrons échappent des complexes de la chaîne de transport et sont captés par la molécule d' O_2 . Il y a

alors formation d' $O_2^{\cdot-}$ qui est libéré soit au niveau de la matrice mitochondriale, soit au niveau de l'espace inter membranaire (Sivitz et Yorek, 2010).

D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme:

- ✓ La xanthine oxydase, qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde,
- ✓ Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par lipoxygénases, soit par cyclo-oxygénases pour former entre autres des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.
- ✓ Enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxysomes source cellulaire de H_2O_2 . Les NO synthases sont, quant à elles, à l'origine de la synthèse du radical $^{\circ}NO$, mais elles peuvent aussi dans certaines conditions (faible concentration en L-arginine ou en cosubstrat réduit, la tétrahydrobioptéine...) produire des anions superoxyde (Beaudeau *et al.*, 2006). L'auto-oxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine et norépinéphrine), des flavines et de l'hémoglobine, en présence de traces de métaux, peut également être à l'origine de la production d'ERO (Théron et Denis, 2005).

Il existe également de nombreuses sources exogènes responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme en incluant une large variété de xénobiotiques (métaux lourds, toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) (Valko *et al.*, 2007).

Aussi l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels..), ainsi qu'une alimentation chimique (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre ainsi que la consommation d'alcool...) sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

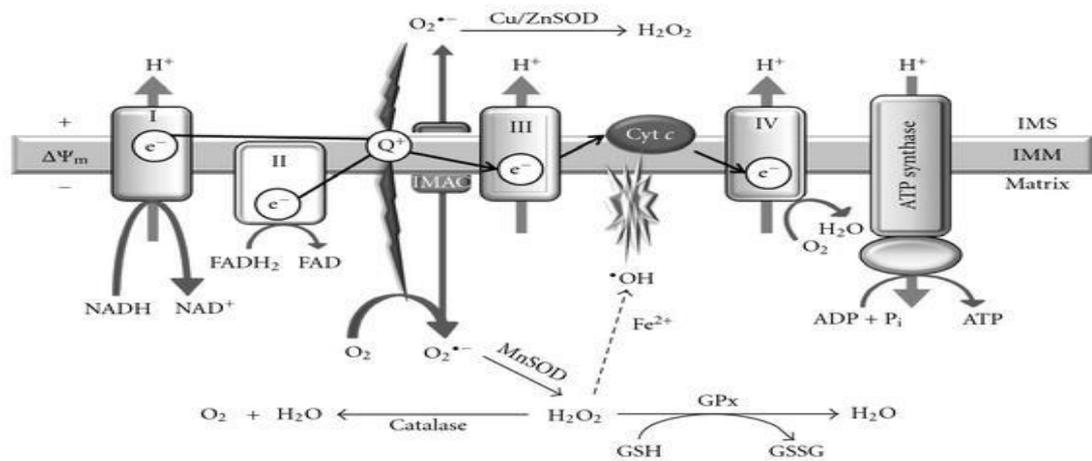


Figure 03: Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons mitochondriale et des sites de production des ROS (Ma *et al.*, 2011).

3. Les conséquences du stress oxydatif:

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques, les plus vulnérables sont les protéines, les lipides, l'acide désoxyribonucléique et les glucides, aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

3.1. La peroxydation lipidique

Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs, et cela par une attaque de radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (Tweeddale *et al.*, 2007). Du fait de leur instabilité, les peroxydes issus des AGPI se décomposent et libèrent de nombreux produits tels que des aldéhydes toxiques dont le malonate-dialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Durand et Beaudeau, 2011) (Fig. 04). L'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité, la perméabilité et l'excitabilité des membranes (Al-Mutairi *et al.*, 2007) et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux. Il est important de noter que la peroxydation lipidique des constituants membranaires des érythrocytes a de lourdes conséquences et peut mener à une hémolyse oxydative grave.

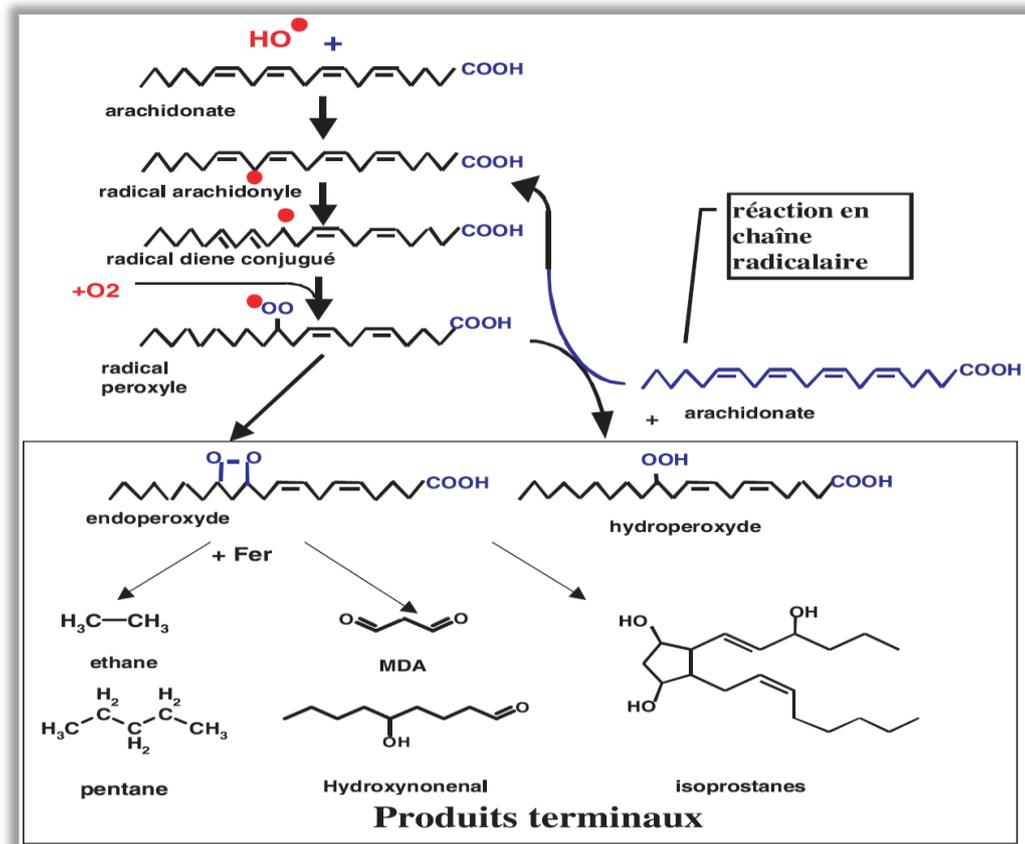


Figure 04 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

3.2. Oxydation des protéines

En présence des ERO, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaire et secondaire. Les dommages oxydatifs au niveau des protéines et des acides aminés, conduisent à la formation de produits carbonylés ou hydroxylés et des pontages provoquant une dégradation de l'activité protéique pouvant aller jusqu'à une perte complète de fonction ou une agrégation protéique.

Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés (Phe, Tyr, His) en cas d'agressions modérées (Davies, 1987) (Fig. 05).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés.

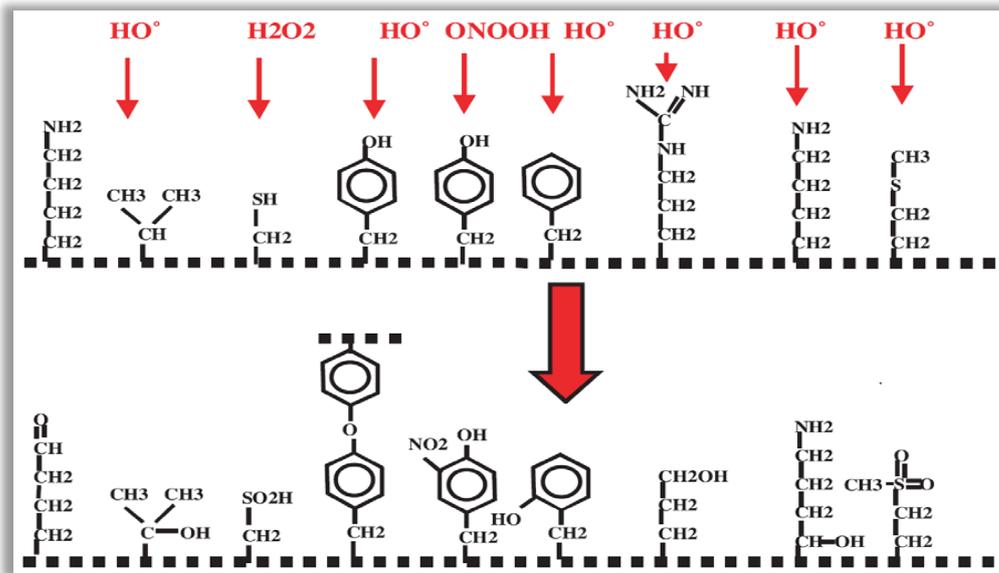


Figure 05 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

3.3. Dommages oxydatifs de l'ADN:

L'ADN est très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Les ERO, et plus spécifiquement le radical hydroxyle, peuvent provoquer des dégâts au niveau des acides nucléiques. Ils peuvent provoquer des cassures, des pontages ADN-protéines, des mutations ou endommager le processus de réparation de l'ADN (Cadet *et al.*, 2002). De plus, les ERO peuvent induire des modifications au niveau des processus de réplication, de transcription et de traduction de l'ADN, provoquant un arrêt des synthèses et pouvant mener à la mort cellulaire (Lenzi, 2011). Ces modifications peuvent aboutir à une mutagenèse, ou à un vieillissement accéléré. Le stress oxydant accélère et amplifie toutes les lésions spontanées produites sur l'ADN (Tissier, 2011).

L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées: 8 nitro-guanine, formamidopyrimidine, 5 hydroxy cytosine, thymine diol..., mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Fig. 06).

Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés (Nair, 1999).

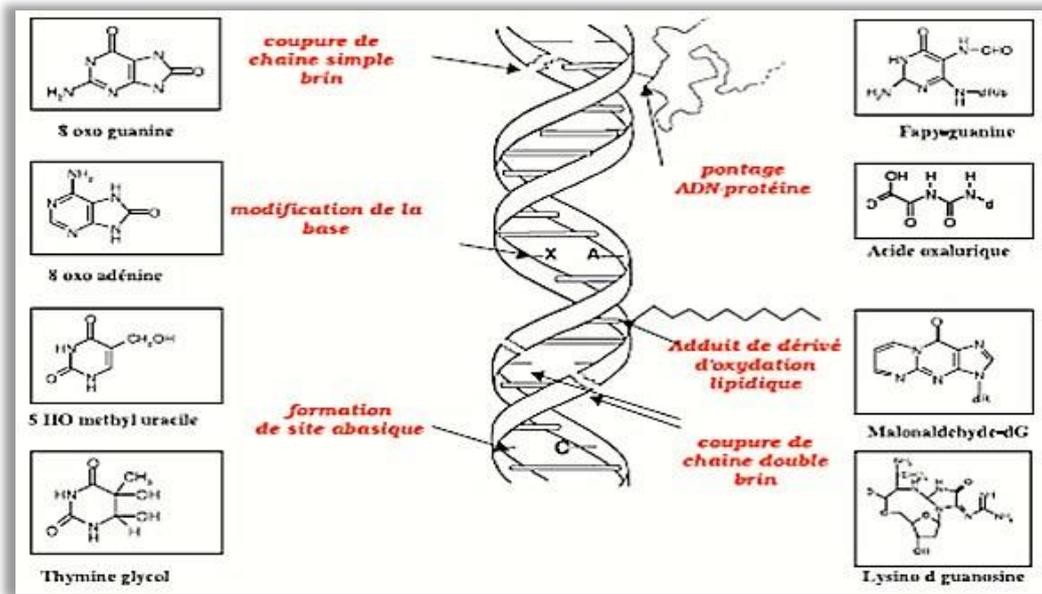


Figure 06: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

4. Mise en évidence d'un stress oxydant :

La plupart des études mettant en évidence le stress oxydatif comme l'un des facteurs étiologique de certaines pathologies ou d'exposition à un facteur environnemental (alcool, tabac, métaux ...) ou évaluant l'efficacité de micronutriments dans la prévention de ce stress oxydatif. Le terme de biomarqueur concerne aussi bien les produits dérivés des lipides que ceux impliquant l'ADN ou les protéines pouvant être décelés dans le plasma, le sérum ou l'urine. Ont utilisé les marqueurs biologiques suivants :

4.1 Les marqueurs du statut :

L'évaluation d'un état nutritionnel peut être faite par l'analyse du statut plasmatique, érythrocytaire, leucocytaire (plus délicat) pour les micronutriments antioxydants (vit E, vit C, caroténoïdes, Zn, Se). Etant donné que certains micronutriments sont des facteurs co-enzymatiques des enzymes appartenant aux systèmes de défense, l'activité enzymatique de la GSHPx, de la SODCu-Zn, peuvent renseigner sur le statut antioxydant. La mesure du rapport GSH/GSSG est un bon reflet de l'état rédox. La mesure du pouvoir anti-oxydant total du plasma (TRAP: total radical trapping parameter) peut se révéler un marqueur du stress oxydant.

Les lésions dues au stress oxydatif, peuvent être évaluées: tant au niveau des protéines par le dosage des groupements thiols (SH: marqueur d'une non oxydation) ou des

groupements carbonyles ($C=O$: marqueurs d'une oxydation) ; qu'au niveau des lipides par le dosage des produits de dégradation des lipides oxydés (HNE, MDA, TBARS, isoprostanes) ; qu'au niveau de l'ADN par le dosage des bases oxydées ou des cassures de brins.

4.2 Les systèmes antioxydants :

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Les défenses antioxydantes permettent de prévenir la génération des ERO, d'inactiver ceux-ci ou encore de limiter les effets délétères des ERO (Cheeseman et Slater, 1993). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002)

4.2.1 Système antioxydant enzymatique:

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces enzymes peuvent être augmentées lors d'un stress oxydant (De Zwart *et al.*, 1999). Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases, la catalase et plusieurs formes de peroxydases à glutathion (Menon et Goswami, 2007) (Fig. 07).

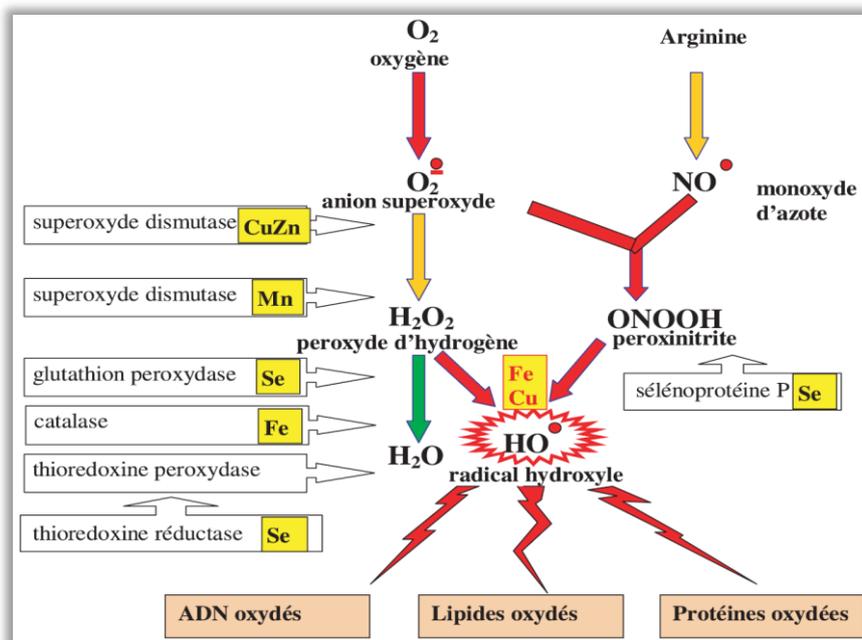


Figure 07: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

- **Les superoxydes dismutases (SOD) (Ec 1.15.1.1)**

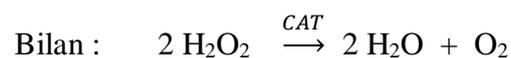
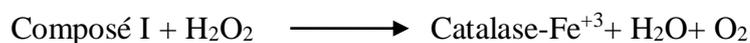
Ce sont des metalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène 10000 fois plus rapidement que la dismutation spontanée de l'anion superoxyde (Halliwell *et al.*, 1999). Elles comportent un métal de transition (Fe, Mn, Cu, Zn) au niveau de leur site actif. Dans la réaction de dismutation, l'ion métallique capte un électron de l'anion superoxyde et le transfère au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif :

$$2 \text{O}_2^{\circ-} + 2 \text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$$

La SOD existe sous plusieurs isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Abreu *et al.*, 2010).

- **La catalase (CAT): (EC 1.11.1.6)**

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée dans les peroxysomes. Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et des hépatocytes. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (généralement produit par SOD) en eau et oxygène moléculaire pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Valko *et al.*, 2006). La réaction se déroule en deux étapes:

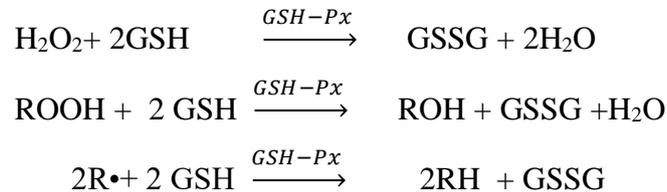


La CAT est un tétramère de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec Fe^{+3} lié au site actif et une molécule de NADPH^+ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

- **Le glutathion peroxydase: (EC 1.11.1.9)**

Les glutathion peroxydases ont en commun une structure tétramérique, chaque tétramère possédant un atome de sélénium dans son site actif, très fortement fixé à la chaîne peptidique, puisqu'il est incorporé sous forme de sélénocystéine dans la séquence primaire (Milane, 2004). Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGSH-Px) dans le plasma (pGSH-Px), au niveau de la membrane cellulaire (HPGSH-Px). Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure.

Ces enzymes sont, sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion (Favier, 2003). Elle accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase (GR) qui agit par oxydation du $NADPH, H^+$, formé principalement par la voie des pentoses phosphates (Thérond et Denis, 2005). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant (Fig. 08):

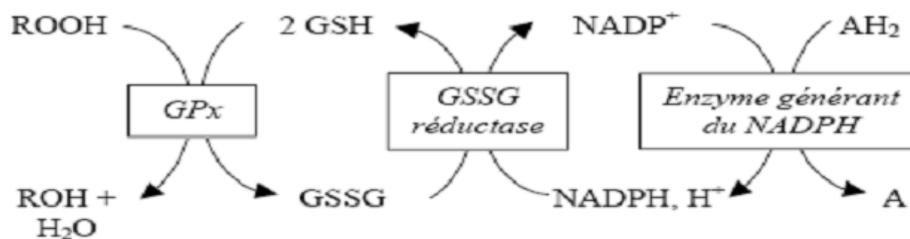


Figure 08. Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase

4.2.2 Système antioxydant non-enzymatique:

La plupart de ces composants sont des micronutriments exogènes apportés par l'alimentation ou des constituants endogènes. On distingue les antioxydants hydrosolubles comme le glutathion, l'acide ascorbique, l'acide urique, l'albumine et les antioxydants liposolubles: l'alpha tocophérol (vitamine E), l'ubiquinone (CoQ10), les caroténoïdes.

4.2.2.1 Molécules anti-oxydantes endogènes

▪ Glutathion

Le glutathion, sous sa forme réduite, est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) naturel synthétisé par les cellules et doté d'un groupement réducteur représenté par la fonction thiol de sa cystéine (Vamecq *et al.*, 2004). Il intervient dans la défense contre l'oxydation via leur rôle comme cofacteur de certaines enzymes antioxydantes telles que les glutathions peroxydases et les glutathions transférases (Valko *et al.*, 2006). Il participe à la neutralisation de certains radicaux libres directement ($OH\cdot$, $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $HOCl$) et d'agir comme un agent chélateur de cuivre. Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques

(mercure, arsenic, plomb,...) (Lyn Patrick, 2006). Il agit en synergie avec la vitamine C, la vitamine E et intervient également dans leur cycle de régénération (Powers et Jackson, 2008). Il est directement impliqué dans la réparation des atteintes oxydatives à l'ADN. Le glutathion est aussi capable de protéger les groupements –SH- des protéines contre l'oxydation et de régénérer les antioxydants oxydés comme les vitamines E et C. La régénération de la fonction thiol GSH à partir de la forme oxydée se fait grâce à l'activité de la glutathion réductase (GR) (Théron et Denis, 2005).

Son action antioxydante s'exerce : soit, directement en piégeant les radicaux libres R° pour former le disulfure GSSG par oxydation, soit, en participant à la réduction des hydroperoxydes lipidiques ROOH comme co-substrat des glutathion peroxydases (GSH-Px). Sous sa forme GSH, GSSG et de son ratio GSH/GSSG, le glutathion est utilisé comme marqueur du système antioxydant et du stress oxydant, analysé par spectrophotométrie (De Moffarts *et al.*, 2007)

- **les métallothionéines (MTs)**

Les (MTs) sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (<7000 Da), présentes dans le cytosol essentiellement au niveau du foie, des reins et de l'intestin. Elles sont des dérivées métalliques d'une protéine: la thionéine, très riches en soufre (23-33% de cystéines), ce qui en fait de très bons ligands pour les métaux. Leur rôle principal consiste à séquestrer des métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...) sous une forme non toxique, mais elles jouent également un rôle dans la régulation des métaux essentiels à l'état de trace, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante (Diana, 1999). Lorsqu'elles fixent un métal physiologique elles sont activées et exercent une fonction mais lorsqu'elles fixent un métal toxique, elles sont alors inactivées et éliminées. À cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydriques, les MTs peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles (Lazo et Pitt, 1995). La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoïdes, les cytokines ou dans des conditions de stress (diète, infection, irradiation) (Andrews, 2000 ; Haq *et al.*, 2003).

- **Autres composés endogènes**

L'ubiquinone (coenzyme Q10), outre son rôle de transporteur électronique, joue le rôle d'antioxydant dans sa forme totalement réduite (ubiquinol) (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol contenu dans les LDL, protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy ou en régénérant de la vitamine E (Packer *et al.*, 1997).

Le cytochrome c est présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il y assure un rôle de scavenger en convertissant le superoxyde en oxygène (l'action inverse de la semi ubiquinone) (Pereverzev, 2003). L'électron capté par le cytochrome c nouvellement réduit est transféré à l'oxygène via le cytochrome oxydase (complexe IV) formant du cytochrome c oxydé et de l'H₂O.

L'acide urique comme un déchet cellulaire qui provient de l'oxydation d'hypoxanthine et de xanthine par la xanthine oxydase et déhydrogénase, il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydante totale du plasma *in vivo* (Waring *et al.*, 2003). Au pH physiologique, il est majoritairement présent sous la forme ionisée (urate) pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire UrH•- stable. Celle-ci est à sa tour réduite par l'ascorbate régénérant l'urate. L'urate protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxydite. Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique (Whiteman *et al.*, 2002).

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes et résultant du catabolisme de l'hémoglobine. Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux ROO• et contre le H₂O₂ (Powers et Jackson, 2008) et de piéger l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993). Elle est alors transformée en biliverdine, oxydée, qui sera recyclée grâce à la biliverdine reductase aux dépens d'une molécule de NADPH (Liu, 2006).

4.2.2.2 Molécules anti-oxydantes exogènes

Toutes les défenses précédentes peuvent être renforcées par des composants exogènes apportés par l'alimentation. Ces antioxydants nutritionnels incluent principalement les vitamines, les caroténoïdes, les composés phénoliques et certains éléments minéraux.

▪ Vitamines E et C

Les vitamines E et C semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E (α -tocophérol) étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique induite par le stress oxydant, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂• (Khalil, 2002).

La vitamine C (acide ascorbique), hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire; elle agit directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, oxygène singulet, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'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 essentielle dans la génération de la vitamine E oxydée (Singh *et al.*, 2005).

▪ **Les oligoéléments**

Les oligoéléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres, ont aussi des propriétés antioxydantes. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GSHPx et la thiorédoxine de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

▪ **Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont des pigments naturels que l'on trouve dans tous les fruits et légumes colorés. Ce sont les molécules de base du système de défense des plantes contre les radicaux libres. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seul un nombre limité d'entre eux ont été identifiés dans le plasma et les tissus humains, les principaux sont l' α - et le β -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la β -cryptoxanthine et le lycopène (Seifried *et al.*, 2007). En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet 1O_2 , ce qui leur permet d'exercer une protection vis à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Milane, 2004).

▪ **Les polyphénols**

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. 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, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005). Les flavonoïdes occupent une place privilégiée parmi les polyphénols alimentaires. Ils cumulent des propriétés antioxydantes antiradicalaires et anti-inflammatoires. Ils sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C_3OH) fortement réactif (Ghedira, 2005). Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique.

1. Généralités sur le chardon-Marie

1.1. Présentation et origine du chardon-Marie

Le chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) est une plante annuelle ou bisannuelle herbacée appartenant à la famille des Astéracées. Son nom latin *Silybum* signifie chardon, *marianum* fait référence à la Vierge-Marie. Dans la légende, lors de son voyage de Judée en Égypte, aurait donné le sein à l'enfant Jésus près d'un bosquet de chardons. Les nervures blanches caractéristiques des feuilles de cette espèce seraient le vestige des gouttes de lait de la Vierge d'où le terme de «milk » en anglais (Morazzoni et Bombardelli, 1995). Cette légende est peut-être également à l'origine d'une indication traditionnelle, qui veut que le chardon-Marie favorise la lactation, son efficacité n'a jamais été démontrée scientifiquement.

La plante, endémique à la région méditerranéenne, elle est cosmopolite et s'étend de la mer à 700-1100 m d'altitude, sur les terrains incultes secs et rocailleux de toutes l'Europe occidentale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du nord, sur tout le continent américain, en Asie Mineure et au sud de l'Australie, on la trouve dans les champs, les décombres et les bords des routes (Abenavoli *et al.*, 2010). En Algérie d'après Quizel et Santa (1963), le chardon marie est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides.

Le chardon-marie fût utilisé dès l'Antiquité puis au Moyen-âge, pour les problèmes hépatiques et les troubles biliaires tels que les hépatites, la cirrhose et la jaunisse, ainsi que pour prévenir l'hépatotoxicité attribuable aux toxines environnementales (telles que les morsures de serpents, les piqûres d'insectes, l'empoisonnement aux champignons et à l'alcool) (Kren et Walterova, 2005). Puis pour certains troubles menstruels, comme les règles abondantes, mais aussi les varices et les congestions de la vésicule biliaire et des reins.

1.2. Nomenclatures et Systématique

Les différentes appellations de la plante sont les suivants: en français ; chardon-Marie, artichaut sauvage, chardon argenté, chardon de Notre-Dame, silybum marial (Brouillet, 2002), lait de Notre-Dame, silybe de Marie, chardon marbré, épine blanche (Wiersema et léon, 1999). Les noms étrangers sont: en allemand Mariendistel; en anglais milk thistle, holy thistle, Marian thistle, silybum ; en italien cardo mariano (cardo di Santa Maria) et en chinois Shui

Fei Ji (Michael, 2003). Sa nomenclature en arabe est: Bôq, Chouk el Djemel, Bou-Zerwal ou Sùk Ez-zerwal, Bùzerwal, Hacoub et Lichilik. Ses noms vernaculaires targui ou berbère sont : Tawra, Douj-n'ilour man (Beloued, 1998). Selon Guignard (1998), la systématique du chardon-Marie se résume comme suit :

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

1.3. Description botanique

Il peut atteindre 1,50 m de hauteur. Ses longues tiges sont aisément reconnaissables: elles ont des feuilles vertes, luisantes, présentent des nervures bordées d'un liseré blanc et des dents épineuses à la périphérie du limbe. Le chardon-marie possède des fleurs de couleur pourpres, réunies en un capitule terminal à bractées épineuses, pouvant mesurer jusqu'à 8 cm (Caremes, 1990). La tige est épineuse. D'après Sindel (1991), la plante Chardon marie est caractérisée par une racine pivotante, forte, longue, épaisse et fibreuse. Le fruit est constitué d'akènes luisants, ovoïdes et obliques, de 6-8 mm, de couleur beige ou brune, lisses ou finement ridées, ils sont entourés d'une coquille (Guittonneaire et Huon, 1983) et couronnées avec les touffes plumeuses; chacune d'elles est insérée sur une sorte de disque (formé par le pédoncule très réduit, d'apparence cornée et portant au centre une sorte de cylindre court de 3 à 5 mamelons (Bezanger, 2003). Le poids de mille akènes est d'environ 28 à 30 grammes (Andrzejewska *et al.*, 2010).

Une plante produit en moyenne un peu moins de 7 000 akènes. Les akènes ne présentent pas ou peu de dormance. La floraison a lieu en avril et en mai. La plante est hermaphrodite, majoritairement auto-pollinisatrice. Les akènes sont mûrs en juillet (Karkanis *et al.*, 2011).

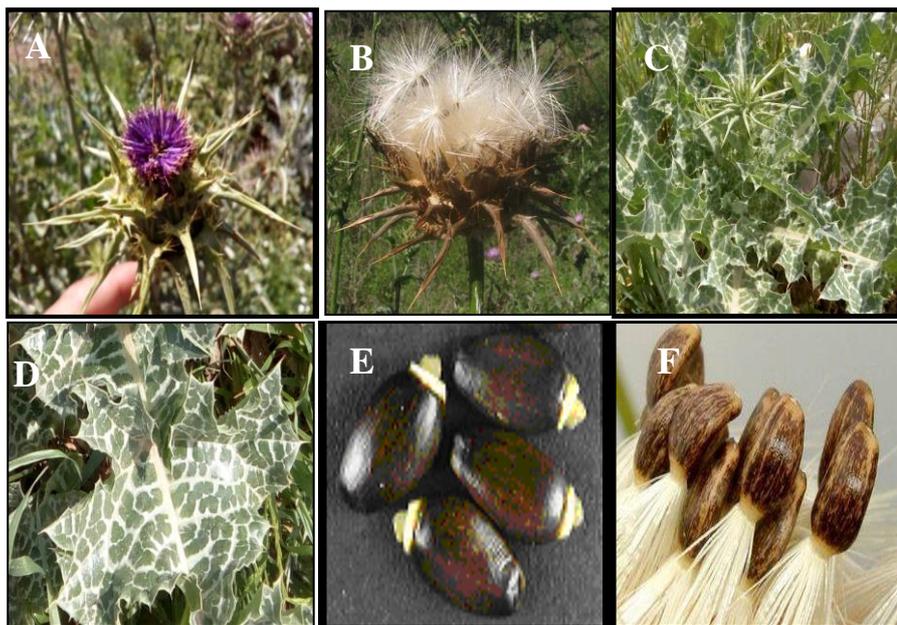


Figure 09 : Photos des différentes parties de la plante *Silybum marianum* : (A, B) fleurs fraîches et sèches, (C, D) Feuilles de chardon Marie, (E, F) Akènes libres et avec aigrettes

2. Composition chimique du chardon-marie

Le fruit renferme 15 à 30 % de lipides, avec prédominance d'acide linoléique 60 %, 30 % d'acide oléique avec 9 % d'acide palmitique, environ 25 à 30 % de protéines, ainsi que du tocophérol (0.038 % environ), des dérivés phénoliques et des stérols (0.063 % environ) dont ducampestérol, dustigmastérol et du sitostérol. Quelques sucres (arabinose, rhamnose, xylose, glucose) et du mucilage sont aussi présents (Abenavoli *et al.*, 2010). Il contient aussi des flavonoïdes: quercétol, taxifoline, éryodictyol, chrysoériol et quelques autres notamment du dihydrokaempférol, du kaempférol, de l'apigénol et du naringétol qui présentent eux aussi des propriétés intéressantes. Selon Bruneton (1999), elles ne jouent qu'un rôle minoritaire dans les propriétés attribuées au chardon-marie.

L'akène contient aussi 1,5 à 3% de flavanolignanes dont la fraction principale porte le nom de silymarine, qui constitue les molécules les plus actives du chardon-marie, dont les composants majoritaires sont la silybine (constituant majoritaire du mélange 50-60%), silydianine (environ 10%) et 20% de la silychristine et leurs nombreux dérivés stéréoisomériques ; isosilybine environ 5%, dihydrosilybine, la silimonine, et d'autres composés: silandrine, silhermine, néosilhermines A et B, 2,3-dehydrosilibinine et tri-pentamères desilibinine (silybinomères) (Fig. 10). Certaines de ces flavanolignanes minoritaires ne sont présentes que chez les variétés à fleurs blanches.

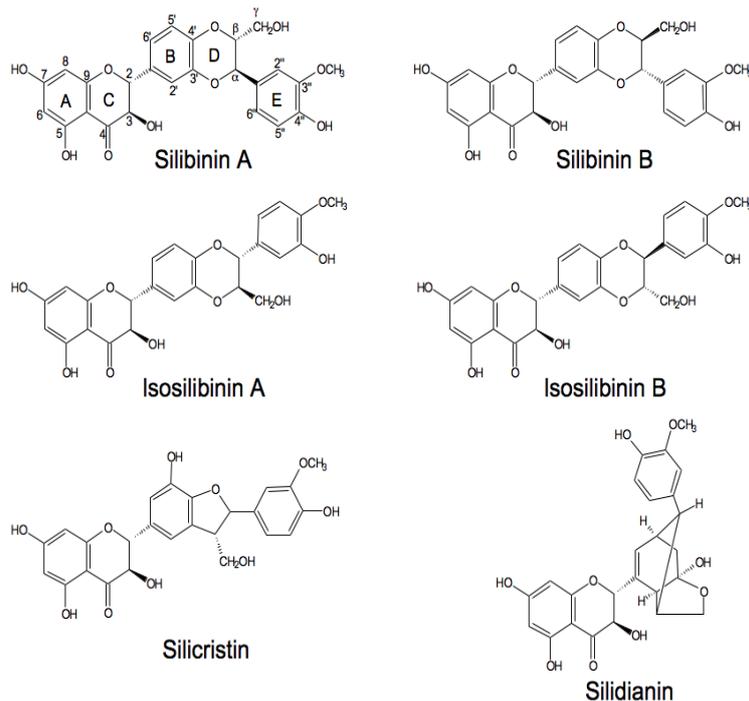


Figure 10: Flavanolignanes majeures de la silymarine (Karimi *et al.*, 2011)

3. Activités pharmacologiques :

De multiples travaux expérimentaux tendent à démontrer la capacité de la silymarine et de ses constituants à lutter contre les affections hépatiques et la cirrhose du foie en empêchant les dommages du foie provoqués par l'alcool, les drogues, les pesticides et quelques toxiques ; le tétrachlorure de carbone, le paracétamol, la galactosamine, la phalloïdine, la phénylhydrazine, le thioacétamide, cisplatine ou de doxorubicine (Fraschini *et al.*, 2002; Saller *et al.*, 2008), elle est aussi capable de traiter l'empoisonnement par certains champignons venimeux notamment la phalloïdine et l'amanitine produites par le champignon *Amanita phalloides*, et empêcher la carcinogenèse (Huet et Fleurentin, 2013). Dans tous les cas, la silymarine agit à titre préventif ou même à titre curatif. La silibinine (silybine) semblerait procurer la plus grande activité pharmacologique des constituants de la silymarine (Fig. 11).

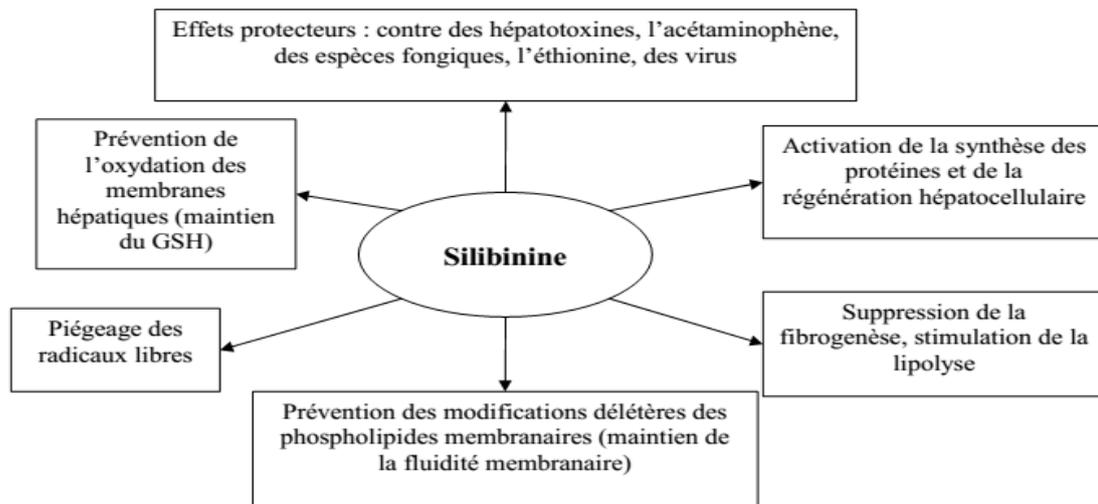


Figure 11 : Diagramme récapitulatif des effets favorables de la silibinine chez les patients présentant une affection hépto-biliaire (Center, 2000)

La silymarine agit également pour protéger d'autres organes vitaux; les reins, le cerveau, le pancréas... Il traite les réactions allergiques, réduit l'inflammation et favorise la cicatrisation. Il contribue également à émulsionner les graisses et améliorer le flux de la bile. Ce qui en fait un bon remède contre l'indigestion (Saller *et al.*, 2008).

Les effets antitoxiques de la silymarine ou de la silibinine étaient à attribuer à leurs propriétés anti-oxydantes et à leurs capacités à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène incluant les radicaux ; hydroxyle et peroxyde ainsi que l'ion hypochlorite. Ainsi que sa capacité d'augmenter les niveaux intracellulaire en glutathione de 35% dans le foie des sujets sains et 50% dans le foie de rats. Cette augmentation se produit de façon sélective dans le foie, l'intestin et l'estomac (Valenzuela *et al.*, 1989), Elles augmentent l'activité des enzymes superoxyde dismutase ainsi que celle de la glutathion peroxydase après l'incubation *in vitro* avec des érythrocytes et des lymphocytes provenant de patients présentant une cirrhose alcoolique cellules (Altorjay et Altorjay, 1992). Le traitement *in vivo* a, quand à lui, permis de restaurer l'activité faible de la SOD et l'immuno-réactivité altérée dans les lymphocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique du foie (Feher *et al.*, 1988)

La silymarine, inhibitrice de la lipo-péroxydation des membranaires et antiradicalaire, inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires. Elle aurait un effet régulateur de la perméabilité des membranes mitochondriales et favorise la stabilité des membranes et, dans le cas de la toxine des amanites, interagirait de façon compétitive avec les sites impliqués dans la capture de cette toxine (Saller *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il agit comme un promoteur de la synthèse de l'ARN ribosomal, ce qui stimule la synthèse protéique et la régénération du foie, seulement lorsque le foie a subi des lésions (Magliulo *et al.*, 1973), et comme inhibiteur de la transformation des hépatocytes stellaires en myofibroblastes, à l'origine du dépôt des fibres de collagène conduisant à la fibrose hépatique. La silymarine agit de façon concentration dépendante sur la production de NO, elle inhibe l'activation du facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B), lui-même responsable de l'activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Kang *et al.*, 2002). C'est par ailleurs un immunostimulant, stimulant la sécrétion d'interféron- γ et d'interleukines par les lymphocytes en culture. Elle peut freiner la formation de prostaglandines pro-inflammatoires (PGE-2) à forte concentration (Kang *et al.*, 2004), et inhibe la voie de la 5-lipoxygénase et en particulier la synthèse des leucotriènes B₄, de dangereux composants inflammatoires, elle exerce donc une activité anti-inflammatoire (Dehmlow *et al.*, 1996).

Des données montrent que la silymarine inhibe, *in vitro*, la prolifération de diverses lignées de cellules tumorales. C'est un protecteur à l'encontre d'agents cancérigènes tels que le diméthylbenzanthracène ou des esters du phorbol, un inhibiteur de la sécrétion de facteurs proangiogéniques par les cellules tumorales, etc (Ramasamy et Agarwal, 2008).

4. Mode d'action de la silymarine.

La capacité du chardon marie à protéger le foie et améliorer sa fonction est largement due à sa capacité à inhiber certains facteurs qui entraînent des dommages au foie. Les plus importants d'entre eux sont les leucotriènes ou les radicaux libres. Les effets hépato-protecteurs de silymarine sont censés être accomplis par plusieurs mécanismes; ceux-ci inclus:

- Inhibition de la peroxydation lipidique à la suite du balayage des radicaux libres (Mirguez *et al.*, 1994) ;
- La stimulation de l'ARN polymérase ribosomique et la synthèse subséquente des protéines, entraînant une régénération améliorée des hépatocytes (Sonnenbichler et Zetl, 1986) ;
- Amélioration de la désintoxication du foie par inhibition de la désintoxication de phase I (Baer-Dubowska *et al.*, 1998) ;
- Amélioration de la glucuronidation et de la protection contre l'appauvrissement du glutathion (Campos *et al.*, 1989) ;

- Les effets anti-inflammatoires, y compris l'inhibition de la synthèse du leucotriène et de la prostaglandine, l'inhibition des cellules de Kupffer, la stabilisation des mastocytes et l'inhibition de la migration des neutrophiles (Dehmlow *et al.*, 1996) ;
- Ralentir ou même inverser la fibrose par réduction de la conversion des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes (Fuchs *et al.*, 1997) ;
- Anticarcinogène par inhibition des kinases cyclin-dépendantes et arrêt de la croissance des cellules cancéreuses ;
- des effets immunomodulateurs sur le foie malade (Lang *et al.*, 1990).

De nombreuses publications montrent des effets anticancéreux de la silymarine ou de ses composés chez l'animal ou sur culture cellulaire à différentes étapes des processus de cancérisation (Fig. 12) (Huet et Fleurentin, 2013) :

- inhibition de la carcinogénèse: sur l'apparition d'un cancer de la vessie induit par la nitrosamine chez la souris (Tyagi *et al.*, 2007), mais aussi vis-à-vis de cancers de la peau (Gu *et al.*, 2006), du côlon (Velmurugan *et al.*, 2010), du poumon (Yan *et al.*, 2005) de la prostate (Kohno *et al.*, 2005), du foie (Ramakrishnan *et al.*, 2006) et de la langue (Yanaida *et al.*, 2002);
- inhibition de la croissance tumorale : cancer de la prostate (Tyagi *et al.*, 2008), du poumon non à petites cellules (Mateen *et al.*, 2010), de l'ovaire, du sein (Wang *et al.*, 2008), de la vessie (Singh *et al.*, 2008) et du foie (Varghese *et al.*, 2005). Le mécanisme évoqué est un blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose;
- inhibition de l'angiogénèse: une diminution de la formation de microvaisseaux est obtenue sur des lignées de cancers du sein (Kim *et al.*, 2009), du côlon et du poumon (Yang *et al.*, 2003). Cet effet est lié à la diminution de l'expression du VEGF;
- inhibition des métastases : diminution de la mobilité et de l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate, du sein, du poumon, de l'ostéosarcome et de la cavité buccale (Deep et Agarwal, 2010). Cette action est liée à l'inhibition des métalloprotéases favorisant l'invasivité observée sur des modèles *in vivo*;
- potentialisation des anticancéreux : elle a été mise en évidence avec la doxorubicine, le paclitaxel (Colombo *et al.*, 2011), le cisplatine et le carboplatine (Dhanalakshmi *et al.*, 2003). On observe une augmentation de la rétention des toxiques dans les cellules et l'induction de l'apoptose. Des résultats contradictoires avec une réduction de l'action des

médicaments ont aussi été observés avec le docétaxel et la mitomycine C (Jiang *et al.*, 2009) ;

➤ s'oppose aux résistances : sur des cellules résistantes à la doxorubicine.

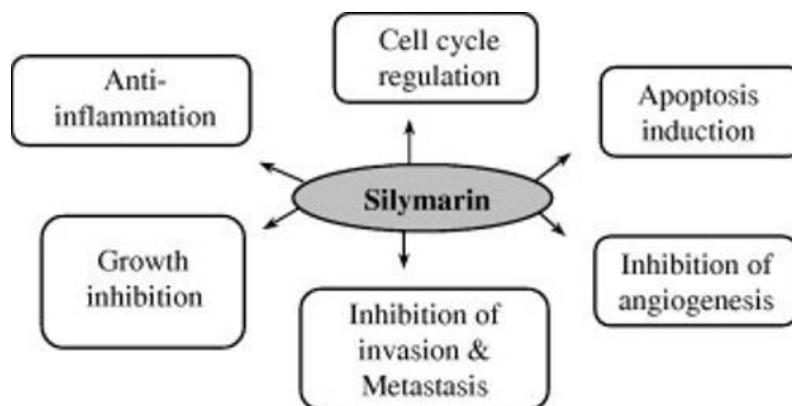


Figure 12 : Effets anti-cancérigènes potentiels de silymarine (les différentes cibles moléculaires) (Fehér et Lengyel, 2012)

La silymarine pourrait agir en synergie avec les traitements de chimiothérapie conventionnels (doxorubicine, taxanes, sels de platine, mitoxantrone) et ainsi en augmenter l'efficacité. Les mécanismes d'action pouvant expliquer la synergie, sont le blocage du cycle cellulaire et une plus grande rétention des molécules cytotoxiques dans les cellules (Colombo *et al.*, 2010). Il a été mis en évidence que la silibinine augmentait le nombre de cellules en phase G2-M et en apoptose (Dhanalakshmi *et al.*, 2003).

5. Pharmacocinétique

La biodisponibilité de la silibine, molécule de référence dans les études pharmacocinétiques, prise par voie orale est faible et dépend d'autres substances dans l'extrait et des concentrations de l'extrait (Flatland, 2003). Elle peut être augmentée par complexation avec la phosphatidylcholine (silipide) ce qui facilite le passage des membranes cellulaires (Anon, 2009), et par incorporation dans un système automicroémulsionnable (SMEDDS®) ou des liposomes semble augmente considérablement (~ 2-3 fois) l'absorption orale de silymarine (Li *et al.*, 2010). La concentration plasmatique est un indicateur de cette biodisponibilité et reflète l'absorption intestinale.

La silymarine est peu absorbée au niveau intestinal (23-47 %), chez des hommes en bonne santé, la concentration plasmatique maximale est atteinte au bout de deux à neuf heures

et se situe entre 200 et 1400 µg/L pour une dose ingérée de 100 à 360 mg. Le temps de demi-vie est d'environ six heures. La silymarine est excrétée principalement dans la bile 20 à 40 % sous forme de conjugués glucuronide et sulfate, avec une excrétion biliaire continue plus de 24 h après une seule prise orale, alors que l'excrétion urinaire est d'environ 3 à 8 %, le reste est excrété dans les fèces (Minton, 2004).

Chez le rat, les études effectuées montrent des résultats proches de ceux des humains en terme de T_{max} de la concentration plasmatique et des formes d'excrétion biliaire (Center *et al.*, 2004). La silibinine est principalement excrétée dans les 48 h suivant son ingestion, l'excrétion se fait majoritairement par voie biliaire.

Elle est d'environ 76% dans le cas d'une administration intraveineuse, et de 20 à 35% de la quantité totale de silibinine ingérée avec des doses variant de 2 à 120 mg/kg, après une administration par voie orale (Bülles *et al.*, 1975). La silibinine est excrétée en quantités minimales dans l'urine au cours des 48 heures après l'administration orale (2 à 5%) ou intraveineuse (8%) (Fraschini *et al.*, 2002).

6. Toxicité, effets secondaires, interactions

Le chardon-marie est une plante dont la sécurité d'emploi est bien reconnue et ne présente aucun risque particulier de toxicité, même à haute dose (Saller *et al.*, 2008), même si la procédure de recueil des effets n'est pas toujours explicitée. On peut occasionnellement noter des troubles gastro-intestinaux légers (effet laxatif) et quelques cas d'allergie ont été rapportés (Grunkemeyer, 2010). Une élévation des enzymes hépatiques et des acides biliaires sont aussi possibles pendant les premiers jours d'utilisation du chardon-marie (Ness, 2007).

Des études de toxicité aiguë après des perfusions intraveineuse de silymarine ont été réalisées chez la souris, le rat, le lapin et le chien. Les valeurs de LD_{50} étaient de 400 mg/kg

(souris), 385 mg/kg (rat) et 140 mg/kg (chien et lapin). La valeur varie selon la vitesse de perfusion. Avec une perfusion étalée sur 2 à 3 heures, LD_{50} monte à 2 g/kg chez le rat et en cas d'administration orale, LD_{50} est de 10 g/kg. D'autres études ont utilisé de la silymarine sous forme de sel d'hémisuccinate de sodium par voie intraveineuse pour des études de toxicité aiguë. La dose létale 50 était de 1050 mg/kg (souris male), 970 mg/kg (souris femelle), 825 mg/kg (rat male), 920 mg/kg (rat femelle), et 300 mg/kg (chien et lapin). Ces

études démontrent que la toxicité aiguë, mais aussi la toxicité subaiguë et la toxicité chronique, sont très faibles. (Dixit *et al.*, 2007).

In vitro, La silymarine est un substrat inhibiteur des enzymes spécifiques du cytochrome P450. Plusieurs études *in vitro* ont suggéré que les extraits de silymarine et divers constituants individuels inhibent CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 et CYP2C8 (Zuber *et al.*, 2002 ; Sridar *et al.*, 2004). Il pourrait donc modifier la pharmacocinétique de divers médicaments donc nuire à son efficacité ou à sa sécurité. Cependant, des essais cliniques ont par ailleurs constaté que même à ces concentrations relativement élevées, la silymarine ou la silibinine n'interféraient pas avec le cytochrome P450, et ils ont montré l'absence de traduction clinique de cette inhibition dans les cas étudiés : midazolam, la debrisoquine, la chlorzoxazone, la nifédipine et la rosuvastatine (Deng *et al.*, 2008; Kawaguchi-Suzuki *et al.*, 2014).

IV. LES ACIDES AMINES SOUFRES :

1. Le soufre:

Le soufre est un élément chimique essentiel pour tous les êtres vivants, une molécule sur six contient un atome de soufre (hormis l'eau), tandis qu'une protéine contient, en moyenne, onze atomes de soufre, dans une cellule humaine (Glover, 2003). Cet atome, créant une fonction thiol (R-SH), permet aux protéines de prendre un repliement caractéristique et assure leur stabilité avec une structure tridimensionnelle en créant des ponts disulfures après liaison entre deux fonctions thiols (R-SS-R). Au niveau enzymatique, la fonction thiol joue un rôle dans le mécanisme catalytique de l'enzyme (Lehninger, 2000).

Le soufre se distingue aussi par sa capacité à pouvoir être aussi bien un oxydant qu'un réducteur au niveau redox, ce qui fait de lui un atome de choix pour la régulation des potentiels d'oxydoréduction et pour la détoxification (Greenwood, 1997).

Physiologiquement, les propriétés du soufre sont exploitées au travers des acides α -aminés soufrés protéinogènes (désignés ci-après acides aminés soufrés), la méthionine et la cystéine, qui sont les précurseurs des diverses biomolécules soufrées.

2. Les acides aminés soufrés et leurs métabolismes:

Le sulfate, source majoritaire inorganique de soufre, facilement accessible pour différentes bactéries, les champignons et les plantes. Cependant, cette source de soufre n'est pas utilisée par les mammifères pour effectuer la biosynthèse de leurs acides aminés soufrés. Ils doivent donc inclure dans leur alimentation une source de soufre organique qu'ils pourront cataboliser, notamment à partir de protéines, contenant de la méthionine et de la cystéine, qui seront hydrolysées (Brosnan et Brosnan, 2006).

Dans l'organisme, les acides aminés soufrés sont au nombre de quatre: la méthionine, la cystéine, l'homocystéine et la taurine (Fig. 13). Seuls les deux premiers sont contenus dans les protéines animales et végétales. Ils jouent un rôle important dans la synthèse des protéines en leur conférant une bonne assise structurale et fonctionnelle. Leur catabolisme engendre deux autres: l'homocystéine et la taurine, et met en jeu une molécule de versatilité métabolique remarquable la S-adénosylméthionine.

L'homocystéine est un intermédiaire métabolique entre la méthionine et la cystéine, et n'est pas présente dans notre alimentation. Enfin, la taurine est un acide β -amino-sulphonique synthétisé à partir de la cystéine et retrouvé dans un nombre important d'aliments d'origine animale (Huneau *et al.*, 2008).

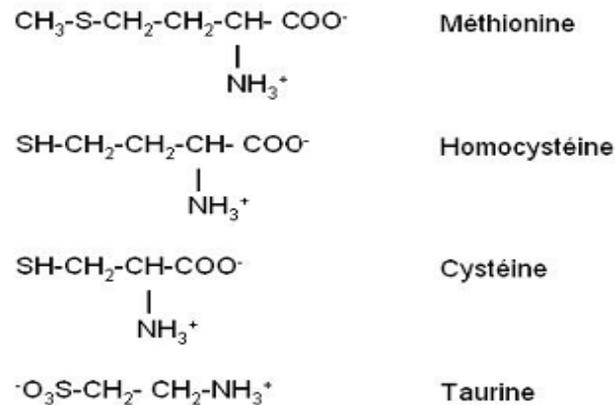


Figure 13 : Acides aminés soufrés

Parmi ces quatre acides aminés, seule la méthionine, qui ne peut être synthétisée de *novo*, est indispensable chez l'Homme. Les trois autres peuvent tous être produits à partir de ce précurseur, grâce à un métabolisme complexe et finement régulé (Fig. 14).

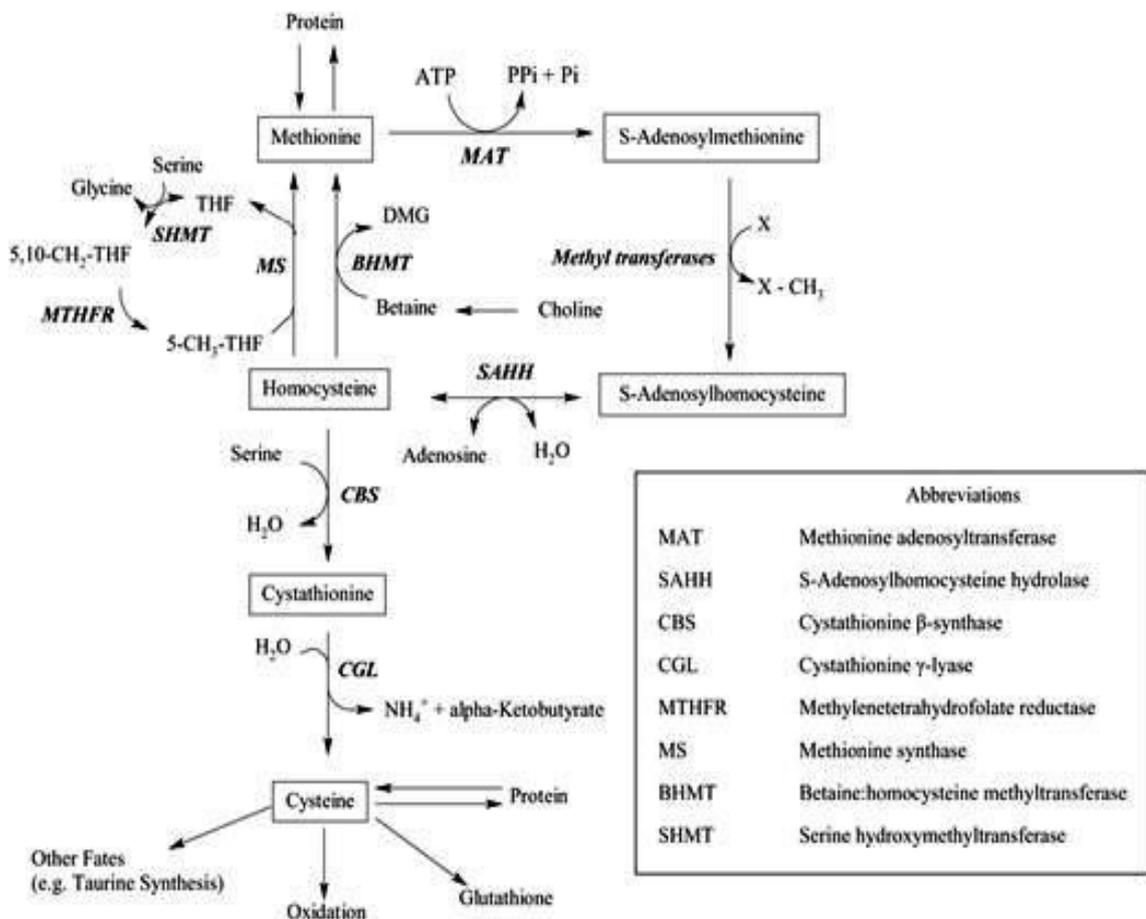


Figure 14: Principales voies du métabolisme des acides aminés soufrés

(Brosnan et Brosnan, 2006)

Trois voies métaboliques principales régulent le métabolisme de la méthionine : la transméthylation (catabolisme de la méthionine), la reméthylation (anabolisme de la méthionine) et la transsulfuration (anabolisme de la cystéine):

- la transméthylation consiste en un transfert du groupement méthyle de la méthionine vers un accepteur de nature biochimique variée (acide aminé, protéine, alcool...), générant de l'homocystéine, après condensation de la méthionine avec une molécule d'ATP pour donner de la S-adénosylméthionine (SAM), l'élément clé des réactions de méthylation dans l'organisme (Niculescu et Zeisel, 2002), La SAM est un donneur de groupement méthyle dans de très nombreuses réactions catalysées par des enzymes de la famille méthyltransférases. La perte du groupement méthyle produit de la S-adénosylhomocystéine (SAH), hydrolysée en homocystéine en libérant de l'adénosine;
- L'homocystéine peut ensuite être reméthylée en méthionine sous l'action de méthyltransférases en présence de 5-méthyltétrahydrofolates ou de bêtaïne (c'est le cycle de la méthionine) (Stipanuk, 2004), ou bien être orientée vers une voie irréversible, la synthèse de cystéine ;
- la transsulfuration, présente dans le foie et le pancréas et de façon moindre dans l'intestin, le rein, le tissu adipeux et le cerveau (Mudd *et al.*, 1965), est la voie métabolique qui permet ensuite le transfert de groupement thiol de la chaîne latérale de l'homocystéine sur la sérine, pour produire la cystathionine, qui est ensuite clivée par la cystathionine γ -lyase pour produire la cystéine.

Outre le rôle de la méthionine et de la cystéine dans la synthèse protéique, les acides aminés soufrés interviennent dans de nombreuses fonctions vitales, soit directement, soit par l'intermédiaire de composés qu'ils engendrent: le glutathion, la carnitine, la créatine, le coenzyme A, l'hydrogène sulfureux et le sulfate.

3. Source, apport alimentaire, absorption intestinale:

Les acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) sont retrouvés dans les protéines alimentaires avec des teneurs comprises entre 2 et 5 %. Les protéines de céréales (riz, maïs, blé) et les protéines animales sont plutôt riches en acides aminés soufrés (3,5 à 5%), comparativement aux protéines de légumineuses qui ne contiennent que 2 à 3,5% de méthionine + cystéine.

Le ratio méthionine/cystéine de l'alimentation varie selon la nature des protéines consommées mais reste typiquement compris entre 1:1 et 2:1. L'apport alimentaire en cystéine est environ 9 $\mu\text{moles.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de poids corporel chez l'homme, alors que le taux de disparition du glutathion, qui ne représente qu'environ 65 % de l'utilisation de cystéine chez

l'homme sain, est de 25 $\mu\text{mole/kg/h}$ (Lyons *et al.*, 2000). Une part importante de la cystéine nécessaire à la synthèse de glutathion et à celle des protéines provient donc de la synthèse endogène de cystéine par la transsulfuration ou du catabolisme protéique. De fait, une partie du besoin alimentaire en méthionine est liée aux flux de synthèse de cystéine.

Lorsque l'apport en acides aminés soufrés est adéquat, l'apport en cystéine exerce un effet d'épargne sur les besoins en méthionine qui pourrait être de l'ordre de 50 %, en réduisant la transsulfuration et augmentant le pourcentage d'homocystéine utilisé pour la synthèse de méthionine (Kurpad *et al.*, 2004). Pour cette raison, le besoin en méthionine est désormais exprimé sous la forme d'un besoin combiné en méthionine+cystéine. Celui-ci a été dernièrement évalué par la FAO à 13 mg/kg/jour (Raguso *et al.*, 2000 ; Di Buono *et al.*, 2001).

La méthionine alimentaire est libérée dans l'intestin grêle au cours des processus digestifs et captée par l'épithélium sous la forme de di- et tripeptides, par l'intermédiaire du transporteur PepT1 (Adibi, 2003), ainsi que sous la forme d'acide aminé libre, par la biais de co-transport avec l'ion Na^+ impliquant les systèmes de transport b^0 et $\text{b}^{0,+}$ (Seow *et al.*, 2004). Alors que, pour la cystéine l'absorption est sous forme réduite (CySSCy), et di- et tripeptides. La captation de cystine par les entérocytes s'effectue par le biais du système $\text{b}^{0,+}$, qui catalyse l'échange entre un acide aminé neutre intracellulaire et un acide aminé cationique ou une molécule de cystine (Palacin *et al.*, 2001).

4. Devenir et voies d'utilisation de la cystéine

La cystéine est utilisée pour la production des protéines, elle est le précurseur de certains composés non protéiques essentiels à l'organisme; la taurine, le glutathion, l'hydrogène sulfureux, pyruvate et le coenzyme nucléotidique CoA, par l'intermédiaire de trois voies métaboliques (Fig. 15).

La première est son oxydation en cystéine sulfinat aboutit à la production de taurine ou de sulfite, catalysée par la cystéine dioxygénase (CDO), une enzyme exprimée presque exclusivement dans le foie (Haesler *et al.*, 1994) ensuite la cystéine sulfinat peut être convertie en hypotaurine par action de la cystéine sulfinat décarboxylase (CSD), ou bien en β -sulfinyl pyruvate par la cystéine sulfinat aminotransférase (CSAT) et libèrera spontanément du sulfite et du pyruvate (Stipanuk, 2004).

La glutamate-cystéine ligase (GCL) catalyse la formation d'une liaison γ -peptidique entre le groupement γ -carboxylique du glutamate et la fonction amine de la cystéine pour former la γ -glutamylcystéine, Le glutathion est ensuite synthétisé par la création d'une liaison peptidique entre cystéine et glycine sous l'action de la glutathion synthétase (GS). Toutes les

cellules sont capables de synthétiser du glutathion, mais ce peptide est majoritairement produit dans le foie, qui l'exporte dans l'ensemble l'organisme. Il est important pour la détoxification de certaines molécules et pour son activité antioxydante (Rahman et Nee, 2000) et joue un rôle central dans le maintien du potentiel redox intracellulaire et extracellulaire (Schulz-Lindenau *et al.*, 2000).

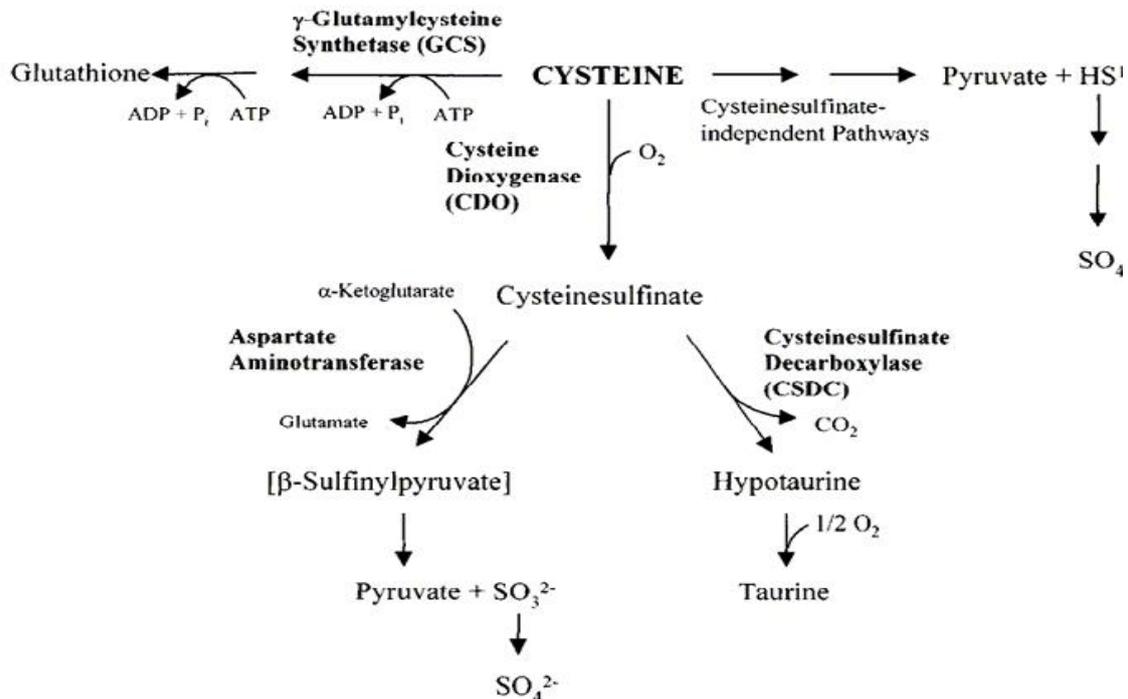


Figure 15: Les voies d'utilisation de la cystéine (Bella *et al.*, 1999).

Le sulfure d'hydrogène est le troisième gasotransmetteur découvert, au même titre que le NO et le CO (Gadalla et Snyder, 2010). Cette molécule a des propriétés antioxydantes et pourrait contrôler les concentrations de calcium et le pH dans le système nerveux central (Hu *et al.*, 2011), il relaxe les muscles lisses, agit comme vasodilatateur (action cardioprotectrice), et augmente la réponse du récepteur NMDA (N-méthyle D-aspartate), important dans la mise en mémoire des données. Si de nombreuses études tendent à prouver qu'H₂S est neuroprotecteur (Lee *et al.*, 2010), il est admis qu'H₂S joue un rôle modulateur complexe. Expérimentalement, H₂S s'est révélé un agent scavenger de H₂O₂, mais aussi du peroxy-nitrite. Le H₂S a aussi un rôle dans l'inflammation, mais des rôles anti- et pro-inflammatoires lui sont attribués (Calvert *et al.*, 2010).

Le sulfure d'hydrogène issu de l'étape précédente est oxydé de manière non enzymatique par des composés hémiques en thiosulfate. Cette molécule est réduite par le thiosulfate sulfurtransférase (TST) en présence de glutathion en anion sulfure, sulfite et

glutathion oxydé. Ces sulfites sont ensuite oxydés par la sulfite oxydase (SO) ce qui libère des sulfates. Des taux élevés de H₂S sont neurotoxiques: risque de détérioration de la paroi intestinale, de développement de polypes, dégâts cérébraux... mais surtout des douleurs musculaires, fatigue chronique, perte de mémoire, états inflammatoires chroniques (comme la maladie de Crohn) et intolérances alimentaires.

5. Régulation du métabolisme des acides aminés soufrés

Les enzymes-clés de ces voies métaboliques sont régulées en réponse aux variations du besoin intracellulaire en cystéine et ses métabolites, et de l'apport alimentaire en cystéine et/ou en acides aminés soufrés. Les variations de régulation de GCL et de la CDO déterminent le flux de cystéine entre la voie de catabolisme irréversible et la voie de synthèse du glutathion. Ce sont principalement les modulations de l'activité CDO qui assurent le maintien des concentrations en cystéine libre circulante, tandis que l'activité GCS varie de façon beaucoup moins importante. Cette dernière assure toutefois la régulation des pools de glutathion, source extra-hépatique majeure de cystéine (Mc Bean, 2017).

les données obtenues chez le rat indiquent que l'activité CDO hépatique augmente d'un facteur de 35 au cours des 24 h suivant le passage d'une alimentation hypoprotéique à une alimentation hyperprotéique ou une supplémentation en méthionine ou cystéine, via un contrôle traductionnel ou post-traductionnel (Lee *et al.*, 2004). A l'inverse, les mêmes conditions induisent une réduction de l'activité CSD, sans pour autant réduire la synthèse de taurine, du fait de la plus grande quantité de substrat disponible (Stipanuk, 2004). L'activité CSD apparaît limitante dans la biosynthèse de taurine (Reymond *et al.*, 1996). Dans les autres tissus, les modifications de la teneur en protéines de l'alimentation induisent peu de modifications de l'activité CDO, ce qui pourrait être la conséquence de l'absence d'augmentation des concentrations extra-hépatiques en cystéine, le foie assurant la régulation des excès d'AAS (Stipanuk *et al.*, 2002). Toutefois, la synthèse rénale de taurine varie en fonction de la teneur en protéines du régime: elle augmente dans des conditions hypoprotéiques et assure ainsi l'approvisionnement en taurine de l'organisme dans des conditions où la synthèse hépatique de taurine est très faible; dans des conditions hyperprotéiques, la synthèse rénale de taurine est inhibée et le rein excrète la taurine libérée en excès par le foie (Stipanuk *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). La taurine joue un rôle dans l'élimination du cholestérol via la synthèse de sels biliaires conjugués.

La synthèse de GSH est contrôlée par le stock de glutathion et la disponibilité en acides aminés soufrés. Elle est principalement contrôlée au travers d'une modification de

l'activité et de l'expression de la GCL (Lu, 1999). L'expression des sous-unités de la GCL est activée par le stress oxydant, les cytokines inflammatoires ou l'insuline (Lu *et al.*, 1992 ; Cai *et al.*, 1995 ; Krzywanski *et al.*, 2004). GSH exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse en inhibant de façon compétitive l'activité GCL. Il a également été montré que l'expression de la sous-unité GCLm dans les hépatocytes diminue en réponse à une augmentation de l'apport en acides aminés soufrés, la cystéine constituant le signal métabolique de cette réponse (Kwon et Stipanuk, 2001 ; Cresenzi *et al.*, 2003). Du fait de l'augmentation de la quantité de substrat disponible, cette moindre expression de la GCLm ne s'accompagne pas d'une réduction de la concentration de glutathion mais prévient une éventuelle surproduction de ce peptide. Elle s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la cystéine dioxygénase, reflétant l'activation du catabolisme de la cystéine (Stipanuk, 2004).

Le contrôle du métabolisme de la méthionine est complexe. L'équilibre de l'homocystéine entre reméthylation et transsulfuration serait déterminé par la disponibilité en groupements méthyles (Mudd et Poole, 1975). Dans le foie, il apparaît que cet équilibre est régulé par les niveaux cellulaires en SAM par des mécanismes allostériques. La méthionine adénosyltransférase est activée par son produit et, ainsi, les concentrations hépatiques de SAM seraient élevées lors d'apports importants en méthionine. La SAM agit comme activateur de la cystathionine bêta-synthase, stimulant ainsi la transsulfuration mais aussi comme inhibiteur de la méthylène tétrahydrofolate réductase MTHFR, réduisant simultanément, la disponibilité des groupements méthyles pour la reméthylation (Preynat, 2009).

6. Le rôle et l'importance des AAS dans l'organisme:

La méthionine est un acide aminé soufré essentiel, doté de puissantes propriétés antioxydantes, de par sa capacité à produire des liaisons soufrées, en associant avec les vitamines du groupe B, peut contribuer à réduire les inflammations, soulager les douleurs et stimuler la formation du tissu cartilagineux: un acide aminé incontournable en cas d'arthrose, ou pour assurer un cartilage en bonne santé (Yamagishi *et al.*, 2012). Elle permet la synthèse de carnithine ou la mélatonine et dissout les graisses et limite le dépôt de graisse dans le foie. Par voie orale, la méthionine est utilisée pour prévenir les dommages au foie et pour tester les individus pour une hyperhomocystéinémie. Il est également utilisé pour abaisser le pH urinaire, traiter les troubles hépatiques et améliorer la cicatrisation des plaies. La

méthionine est également utilisée par voie orale pour traiter la dépression, l'alcoolisme, les allergies, l'asthme, les effets secondaires du rayonnement, la schizophrénie, la maladie de Parkinson et pour neutraliser les métaux lourds (Mohanty *et al.*, 2014).

Cependant, La cystéine a des propriétés anti oxydantes et désintoxiquantes, présenté sous forme de L-cystine, et peut se fixer à une deuxième molécule pour former de la cystine dépourvue de propriétés antioxydantes et présentant un risque accru de calculs rénaux. Elle stimule le système immunitaire et répare l'ADN, la peau et les cheveux, ainsi elle favorise la cicatrisation rapide des plaies et brûlures (Fernández *et al.*, 2015 ; Goluch-Koniuszy, 2016 ; Clemente Plaza *et al.*, 2018).

La L-cystéine joue un rôle intense dans un grand nombre de réactions intracellulaires, dont la production de glutathion, de taurine et d'autres acides aminés soufrés, aide à prévenir l'athérosclérose et l'arthrite grâce à son apport en soufre, participe à la synthèse des acides gras par la combustion des graisses (Weiss-Sadan *et al.*, 2017 ; Clemente Plaza *et al.*, 2018). Elle est le précurseur du CoA SH et H₂S, améliore l'assimilation du zinc et intervient dans la chélation d'amalgames (Mc Bean, 2017).

7. Toxicité et effets indésirables des acides aminés soufrés

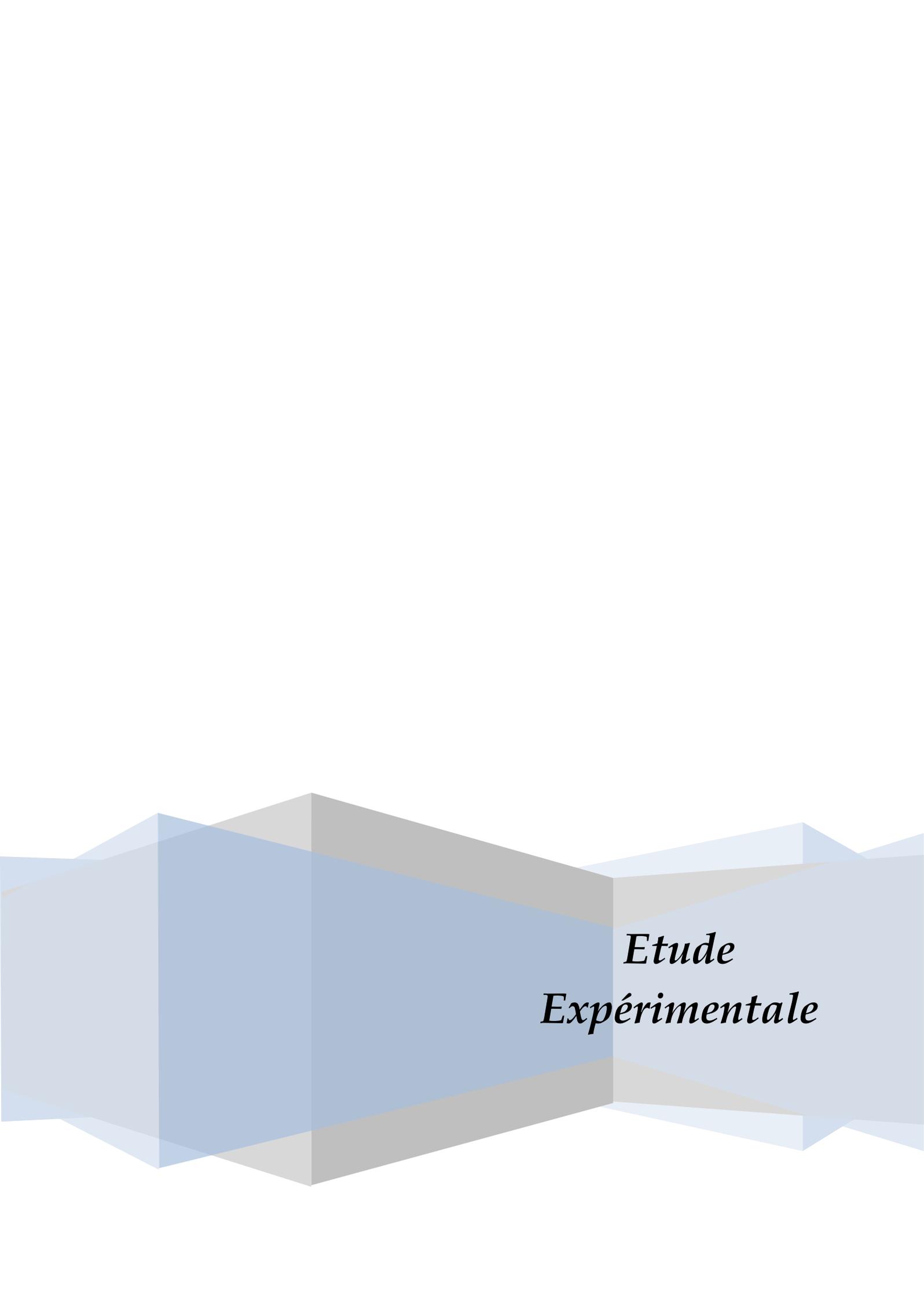
Malgré la fonction de la méthionine comme précurseur de l'homocystéine et le rôle de l'homocystéine dans les dommages vasculaires et les maladies cardiovasculaires (Austin *et al.*, 2004 ; Zylberstein *et al.*, 2004), il n'y a aucune preuve que l'apport alimentaire de méthionine dans des limites raisonnables causera des dommages cardiovasculaires. Une dose unique de 100 mg/kg de poids corporel, environ 7 fois la demande quotidienne pour les acides aminés soufrés, ne provoque pas de complications graves sauf dans le cas extrême où un excès de 10 fois de méthionine, et chez les patients atteints de schizophrénie, peut induire des hallucinations, ou d'erreurs innées du métabolisme des acides aminés soufrés, tels que l'hyperméthioninémie (Cohen *et al.*, 1982 ; Garlick, 2006).

Dans les études animales, la méthionine est considérée comme un des acides aminés les plus toxiques (Health and Welfare Canada, 1990). Une dose de méthionine égale à 2,7 % du régime pendant 20 jours provoque un ralentissement de la croissance chez le rat (Benevenga *et al.*, 1976). Une dose de méthionine comprise entre 2 et 4 % diminue le contenu en fer hépatique (Klavins *et al.*, 1963) et augmente le dépôt de fer au niveau de la rate après

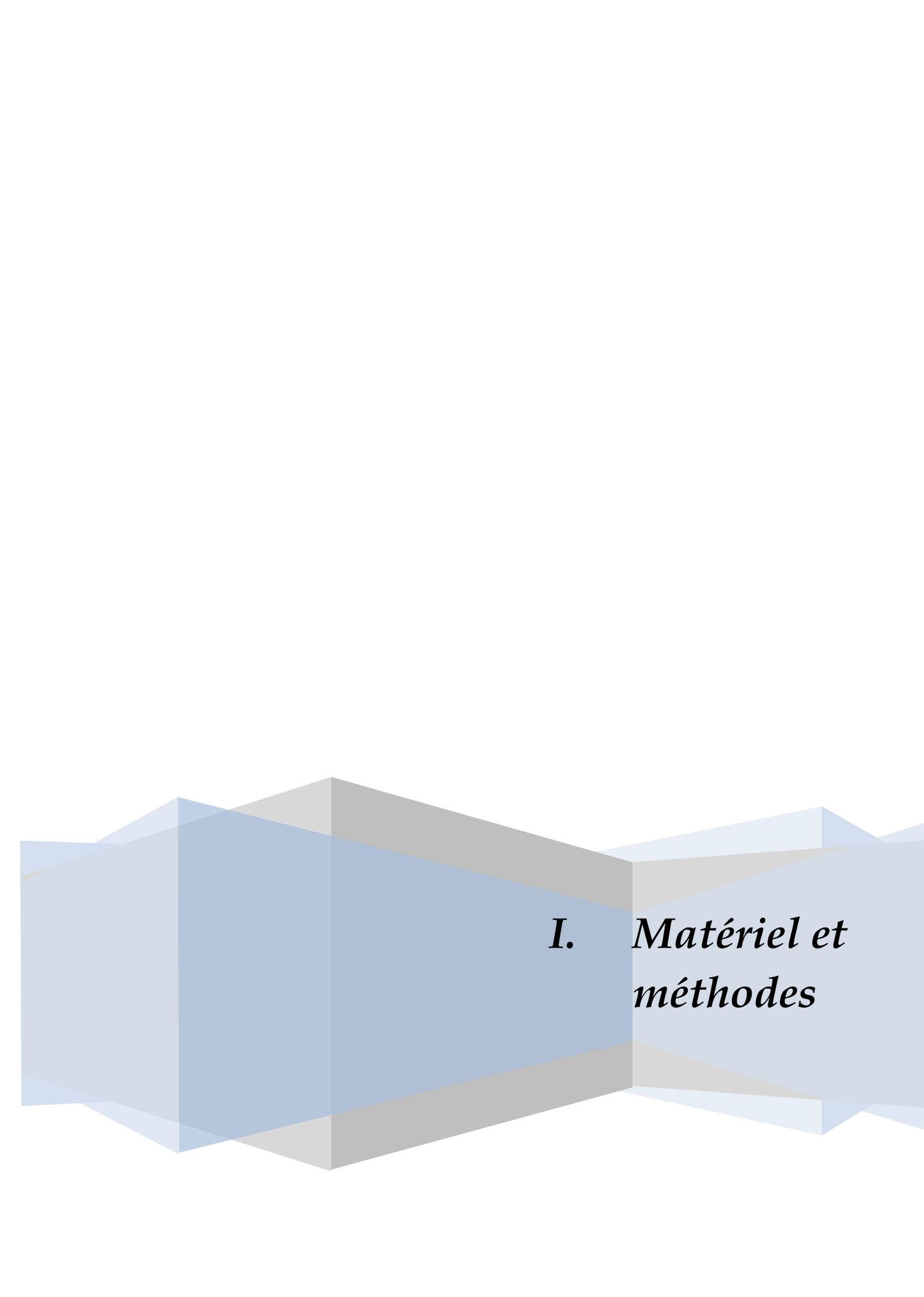
28 jours de traitement (hémosidérose) (Celander et George, 1963). Chez la rate gestante, 4 % de méthionine affecte le poids du placenta (Viau et Leathem, 1973).

La méthionine est nécessaire pour une croissance et un développement adéquats des mammifères, mais un régime élevé de méthionine (HM) a eu des effets toxiques sur plusieurs organes tels que le foie (Toborek *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 2006), le coeur (Chang *et al.*, 2004) et les vaisseaux (Troen *et al.*, 2003). On a signalé que l'équilibre antioxydant/prooxydant a changé dans le foie des rats après le régime HM, ces changements dépendent également de la quantité et de la durée de la méthionine appliquée (Mori et Hirayama, 2000 ; Robin *et al.*, 2004). Le régime HM n'a pas induit de stress oxydatif dans le foie des rats suite à un régime de HM à court terme (Toborek *et al.*, 1996; Mori et Hirayama, 2000). Par voie orale ou intraveineuse, la méthionine peut causer des nausées, des vomissements, des étourdissements, une somnolence, une hypotension et une irritabilité.

La cystéine peut interagir avec les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NDMA). Chez le souriceau nouveau-né, une dose unique de cystéine égale à 3 g/kg de poids corporel induit après 5 heures des effets neurotoxiques tels la nécrose des neurones hypothalamiques et des lésions rétiniennes (Olney, 1994). L'injection subcutanée de L-cystéine de 1,2 g/kg de poids corporel produit chez le rat une dystrophie permanente de la rétine (Karlsen et Pedersen, 1982). Une administration aiguë de L-cystéine à la dose de 1,9 g/kg chez le rat résulte en des altérations ultrastructurales des cellules de Sertoli et des spermatozoïdes (Bernacchi *et al.*, 1993). Chez l'homme, une dose unique de 5 et 10 g de L-cystéine provoque des nausées chez des volontaires sains (Carlson *et al.*, 1989).



*Etude
Expérimentale*



I. Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Matériel biologique

1.1. Choix des animaux et conditions d'élevage :

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles blancs de la souche Wistar, âgés de 8-9 semaines et ayant un poids corporel entre 180-220 g, procurés auprès de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie). Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux semaines, aux conditions de l'animalerie, à une température et une photopériode naturelle.

Les animaux sont répartis en fonction de leur traitement dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée chaque jour jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par ONAB-Annaba, équilibré en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux. Les animaux sont pesés quotidiennement pendant toute la période de traitement.

1.2. Le matériel végétal

Notre étude est réalisée sur les graines d'une plante : *Silybum marianum*, dont la cueillette a lieu durant le mois de Mai- Juin 2012 au niveau de site Ain-Gargour dans la région de Guelma. Les graines sont pulvérisées à l'aide d'un broyeur domestique pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des différents extraits.

2. Produits et réactifs chimiques

Les solvants organiques utilisés dans cette étude sont d'aspect analytique (le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, l'éther de pétrole, l'hexane et l'acétate d'éthyle) ont été fournis par Sigma et Aldrich. Les différents acides sont: L'acide acétique ($C_2H_4O_2$), l'acide sulfurique (H_2SO_4), l'acide formique (CH_2O_2) du Biochem sont fournis par Merck. Les réactifs chimiques sont le DPPH diphenylpicryl β hydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), le Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) ont été fournis par Fluka. Les sels sont : bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), chlorure de sodium ($NaCl$) fournis par Prolabo, chlorure de calcium ($CaCl_2$) de Sigma-Aldrich, sodium phosphate dibasique (Na_2HPO_4), phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) de Sigma. D'autres produits chimiques utilisés: l'acide

gallique, la silymarine, la cystéine, la méthionine, la silymarine sigma, la silibinine, naranginine, toxifoline et l'alcool coniférylique ont été fournis par Sigma, le chlorure de fer (FeCl_3), ferricyanide de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})$ par Aldrich, le butyl hydroxytoluène (BHT), l'acide thiobarbiturique (TBA), DTNB et NBT, GSH réduit et l'acide trichloracétique (TCA) fournis par Sigma. Les kits utilisés pour les dosages enzymatiques (glucose, cholestérol, ASAT, créatinine...): kits de Spinreact.

II. METHODES

1. Etude de l'extrait des graines du *Silybum marianum*

1.1. Préparation de l'extrait méthanolique des graines

L'extraction est faite en premier temps par épuisement de la poudre végétale (100 g) avec le n-hexane à 95% (200 ml) selon la méthode de Wallace *et al.* (2003). Après décantation la phase organique supérieure est récupérée. Le marc a été repris dans un mélange hydro-méthanoliques (80%) 3x pendant 24 heures. Les solutions obtenues sont réunies dans un même récipient pour subir une filtration afin d'obtenir une solution limpide. Après la filtration, le résidu est ensuite concentré sous vide, par évaporation rotative dans un Rotavapeur (BÜCHI) à une température comprise entre 40 à 45°C. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut des graines de *Silybum marianum*. Les poudres obtenues sont pesées pour la détermination du rendement.

➤ Détermination du rendement

C'est la quantité des composés ou substances pouvant être extraites par un solvant typique dans des conditions spécifique (Diallo, 2005) ; $\mathbf{R\% = Me/Mv \times 100}$

Considérons ;

R% : rendement par rapport au poids de la matière végétale utilisée.

Me : poids en gramme de l'extrait sec.

Mv : poids en gramme de la poudre végétale utilisée.

1.2. Analyse des extraits des graines

1.2.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007) basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolibdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue (oxyde de tungstène et de molybdène). Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des phénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005). 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 400 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (2%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc. La manipulation est réalisée trois fois pour chaque échantillon, ce qui nous a permis d'obtenir une moyenne représentative avec un écart type.

Les concentrations des phénols totaux sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage linéaire établie à son tour avec l'acide gallique (0-500 µg/ml) à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG /g_{ext}).

1.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Silybum marianum*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 µg/ml) et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

1.2.3. La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique simple utilisée dans le but de séparer différents constituants d'un mélange complexe en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Le but de cette étape est d'avoir une idée générale sur le contenu en flavonoïdes de l'échantillon à analyser et de choisir le système de solvants

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

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

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

Nous avons retenu celui ayant donné les meilleures séparations (migrations) ; le deuxième (chloroforme/acétone/acide formique 75/16,5/8,5). La visualisation des taches (spots) de flavonoïdes a été faite à l'œil nu ou sous lampe UV à 254 nm et 366 nm, dans une chambre noire, puis elles ont été révélées avec FeCl₃.

Pour chaque tache nous avons calculé le facteur de rétention ou rapport frontal (R_f) et comparé à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants d'extrait.

$$R_f = d / D$$

d : Distance parcourue par la substance

D : Distance parcourue par le solvant

1.3. Tests *in vitro* de l'activité antioxydante : Effet scavenger du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des extraits du *Silybum marianum* nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri et ses collaborateurs (2005).

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. 50µL des solutions d'extraits ou standards (taxifoline, naringinine, alcool coniférylique, silymarine et silibinine) (2 mg ext/standards/ml dans le MeOH 96%) sont ajoutés à

1,95 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%), le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min, la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

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

Où :

DO contrôle est l'absorbance du DPPH à t_0 .

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

Les concentrations des antioxydants standards le milieu réactionnel (silymarine, silibinine, taxifoline, naringinine, alcool coniférylique) sont comprises entre 50-200 $\mu\text{g/ml}$.

Calcul des IC50 :

IC50 ou concentration inhibitrice de 50% est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH• Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

2. Expérimentation animale

2.1. Protocole expérimental

Les rats mâles ont été repartis en 8 groupes de 7 rats chacun, les traitements ont été effectués chaque deux jours pendant 21 jours comme suite :

- **Lot 1:** rats témoins ;
- **Lot 2:** rats traités par l'extrait du *Silybum marianum* à raison de 100 mg/kg de poids corporels par gavage (Shaker *et al.*, 2010) ;
- **Lot 3:** rats traités par L-cystéine à raison de 100 mg/kg de poids corporels. L-cystéine est administré aux rats par gavage (Omar *et al.*, 2012) ;
- **Lot 4:** rats traités par L-méthionine à raison de 100 mg/kg de poids corporels par gavage (Caylak *et al.*, 2008) ;
- **Lot 5:** rats traités par le sulfate de nickel à raison de 20 mg/kg de poids corporel par injection i.p dans des jours alternatifs (Bordes et Papillion, 1983) ;
- **Lot 6:** rats traités par 20 mg/kg p.c de sulfate de nickel plus 100 mg/kg p.c de l'extrait du *Silybum marianum* (Ni+Sil) ;

- **Lot 7:** rats traités par 20 mg/kg p.c de sulfate de nickel plus 100 mg/kg p.c de la cystéine (Ni+Cys) ;
- **Lot 8:** rats traités par 20 mg/kg p.c de sulfate de nickel plus 100 mg/kg p.c de la méthionine (Ni+Met).

2.2. Sacrifices et prélèvements des organes

- **Prélèvement sanguin**

Le sang est prélevé après décapitation rapide, le sang artério-veineux a été recueilli, sur des tubes: - EDTA pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS) ;

- Sans anticoagulant puis centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes, les échantillons obtenus ont été stockés au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse des paramètres biochimiques.

- **Prélèvement des organes :**

Après la dissection, le foie, les reins et les testicules sont prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9% puis pesés.

- ✓ Des échantillons de foie et de rein ont été fixés dans le formol 10% pour la confection des coupes histologique ;
- ✓ Des échantillons (foie, reins et testicules) ont été stockés à -80°C utilisées pour faire le dosage du MDA (indice de la peroxydation lipidique) et la détermination des antioxydants; non-enzymatiques (GSH) et enzymatiques (SOD, CAT et GSH-Px).

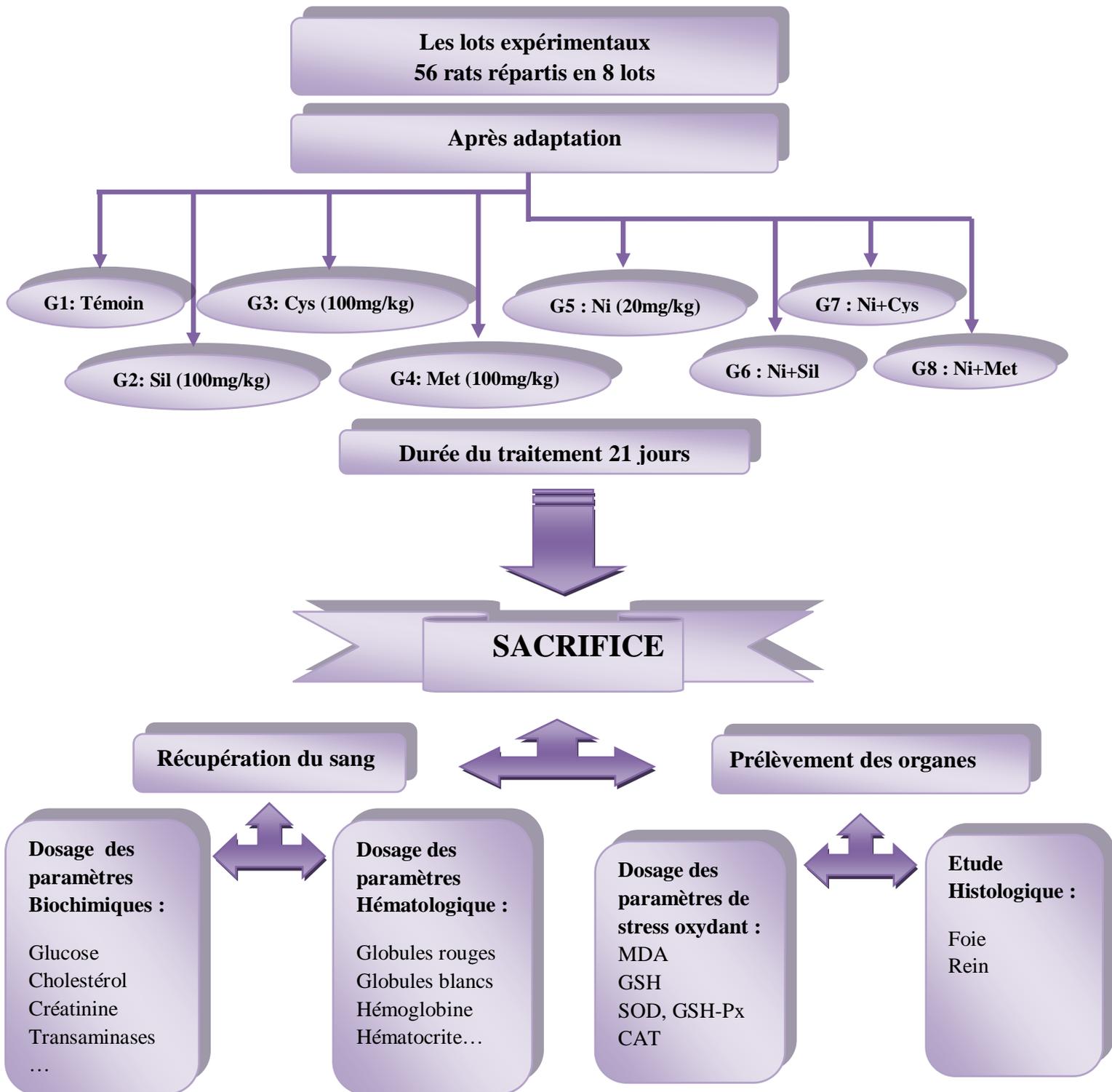


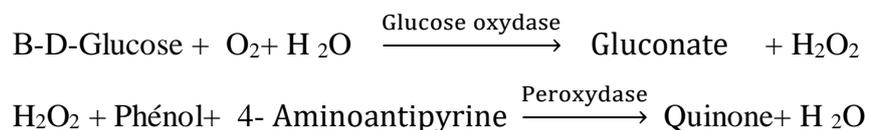
Figure 16: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.3. Dosage des paramètres biochimiques:

Le dosage des paramètres biochimiques est réalisé par des kits fournis par Spinreact, Espagne.

2.3.1. Dosage du glucose :

Le glucose subit des réactions couplées décrites ci-dessous pour donner une quinone de couleur rose évaluée au spectrophotomètre. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.



10 µl d'échantillon sérique ou de la solution standard sont ajoutés à 1 ml du réactif contenu dans des tubes à essai. Les préparations sont mélangées et incubées pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance du standard et des échantillons est lue à 500 nm, le complexe coloré est stable pendant 30 min. Les valeurs de la glycémie sont calculées grâce à un standard dont la concentration est de 100 mg/dl contre un blanc qui sert à régler le zéro du spectrophotomètre.

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

2.3.2. Dosage des lipides totaux :

Les lipides totaux forment avec la phosphovainilline et en présence de l'acide sulfurique un complexe coloré. L'intensité de sa couleur est proportionnelle à la concentration des lipides totaux présentés dans l'échantillon.

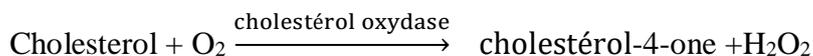
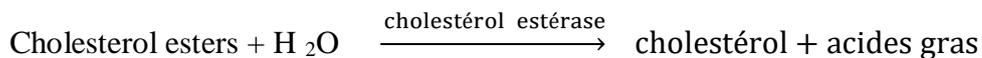
100 µl d'échantillon sérique ou de la solution standard sont ajoutés à 2.5 ml du H₂SO₄ contenu dans des tubes à essai. Après mélange et incubation de 10 min dans un bain marie à 100°C, refroidir les tubes dans l'eau glacée. 1 ml de phosphovainilline est ajouté à 50 µl de préparation réactionnelle. Les préparations sont mélangées et incubées pendant 15 min à 37°C. L'absorbance du standard et des échantillons est lue à 520 nm contre le blanc, la couleur est stable après 1 heure.

$$\text{Lipides totaux (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (750 mg/dl)}$$

2.3.3. Dosage du cholestérol :

Le cholestérol est mesuré après hydrolyse enzymatique puis oxydation. L'indicateur quinoneimine est formé à partir peroxyde d'hydrogène et de l' amino-4-antipyrine en présence

du phénol et de peroxydase. La détermination enzymatique s'effectue selon les réactions suivantes:

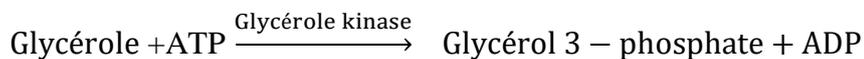
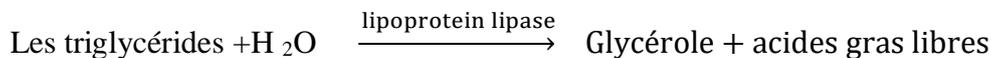


10 µl d'échantillon sérique ou de la solution standard sont ajoutés à 1 ml du réactif contenu dans des tubes à essai. La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol et doit être évaluée au spectrophotomètre à 505 nm contre le blanc. La stabilité de la coloration est de 60 min.

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{(\text{A})\text{échantillon}}{(\text{A})\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (200 mg/dl)}$$

2.3.4. Dosage des triglycérides:

Les triglycérides présents dans l'échantillon forment un complexe coloré selon la réaction suivante :

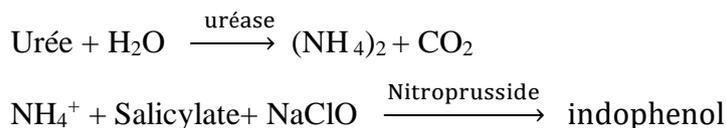


10 µl d'échantillon sérique ou de la solution standard sont ajoutés à 1 ml du réactif contenu dans des tubes à essai. Le tube blanc ne contient qu'un ml du réactif. Après mélange, les échantillons sont incubés pendant 30 min. Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505 nm contre le blanc, la couleur est stable après 30 min.

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(\text{A})\text{échantillon}}{(\text{A})\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (200 mg/dl)}$$

2.3.5. Dosage de l'urée :

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



Les ions d'ammonium peuvent réagir avec le salicylate et di hypochlorite de sodium pour donner un complexe coloré en vert. L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée présentée dans l'échantillon.

1 ml de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 10 µl de l'échantillon. Mélanger, incubé 5 min, à 37°C ou 10 min à 25°C. Mesurer l'absorbance (A) de l'échantillon à 580 nm et de l'étalon contre le blanc, la couleur est stable après 30 min à 15-25°C.

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration de l'urée (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (50 mg/dl)}$$

2.3.6. Dosage de la créatinine :

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

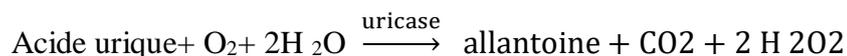
▪ Mode opératoire :

A 1 ml de la solution de travail on ajoute 100 µl de l'échantillon, ensuite, mélanger et lire les densités optiques DO1 après 30 sec. Lire ensuite DO2 exactement 1 minute après à 492 nm. Calculer $\Delta\text{DO} = \text{DO}_2 - \text{DO}_1$ pour le standard et les échantillons.

$$\text{Concentration de la créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta\text{DO échantillon}}{\Delta\text{DO standard}} \times \text{concentration de l'étalon (2 mg/dl)}$$

2.3.7. Dosage de l'acide urique :

L'acide urique présent dans l'échantillon donne selon la réaction décrite ci-dessous un complexe coloré, quantifiable par spectrophotométrie:



L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon.

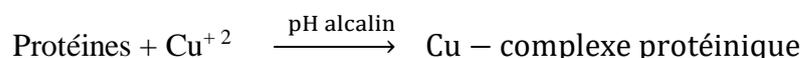
1 ml de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 25 µl de l'échantillon. Mélanger, lire les DO après une incubation de 5 min à 37° C ou de 10 min à 20- 25°C. La coloration est stable 30 min. Les densités optiques ont été mesurées à 520 nm.

La concentration en acide urique est évaluée par la formule suivante:

$$\text{Concentration de l'acide urique (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (6 mg/dl)}$$

2.3.8. Dosage des protéines totales :

Les protéines du sérum forment dans un milieu alcalin avec les ions de cuivre, un complexe coloré en bleu. L'intensité de couleur violette est proportionnelle à la quantité des protéines présentées dans l'échantillon.



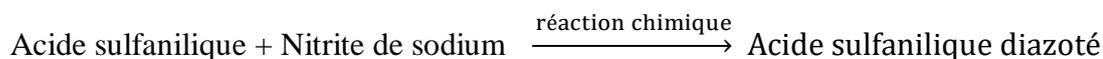
1 ml de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 25 µl de l'échantillon. Mélanger, lire les DO après une incubation de 5 min à 37° C ou de 10 min à 20- 25°C. La coloration est stable 30 min. Les densités optiques ont été mesurées à 540 nm.

La concentration des protéines est évaluée par la formule suivante:

$$\text{Concentration des protéines (g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dl)}$$

2.3.9. Dosage de la bilirubine totale:

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment dans le sérum réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine quantifiable par spectrophotométrie.



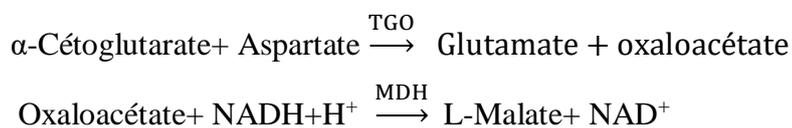
L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans l'échantillon

100 µl d'échantillon sérique ou de la solution standard sont ajoutés à 1.5 ml du réactif contenu dans des tubes à essai. Mélanger et lire les DO après une incubation de 15 min à 25°C à 555 nm. La concentration la bilirubine totale est évaluée par la formule suivante:

$$\text{Bilirubine totale (mgdl)} = \frac{(A)\text{ech} - (A)\text{blanc ech}}{(A)\text{etalon} - (A)\text{blanc etalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

2.3.10. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO) :

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



Le taux de diminution de la concentration de NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate amino-transférase dans l'échantillon.

1ml de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 100 μ l de l'échantillon sérique, ensuite, le mélange est incubé pendant 1minute et la densité optique est mesurée chaque minute pendant 3 minutes à 340 nm.

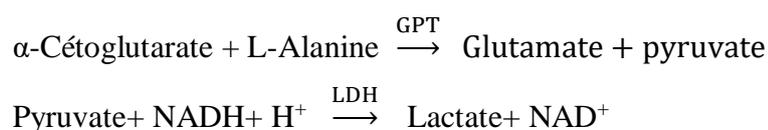
La concentration en ASAT est déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Activité (ASAT/ TGO) UI/l} = \Delta\text{DO} \times 1750$$

2.3.11. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT/ GPT) :

L'alanine aminotransférase (ALAT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H⁺.

Ce principe est présenté selon la réaction suivante :



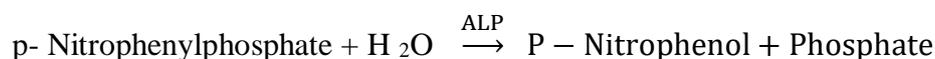
Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine transférase dans l'échantillon.

Un volume de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 100 μ l de l'échantillon sérique, ensuite, le mélange est incubé pendant 1minute et la densité optique est mesurée chaque minute pendant 1 à 3 minute à 340 nm. La concentration en ALAT est déterminée par la formule suivante:

$$\text{Activité (ALAT/GPT) UI/l} = \Delta\text{DO} \times 1750$$

2.3.12. Dosage de l'alcalin phosphate (ALP) :

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



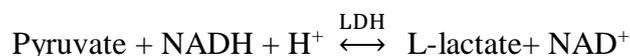
Le taux de la formation de p-Nitrophenol quantifiable par spectrophotométrie, est proportionnel à la concentration catalytique de l'alcalin phosphate présent dans l'échantillon.

1.2 ml de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 20 µl de l'échantillon sérique, ensuite, le mélange est incubé pendant 1 minute et la densité optique est mesurée chaque minute pendant 3 min à 340 nm.). La concentration en ALP est déterminée par la formule suivante:

$$\text{Activité (ALP) UI/l} = \Delta\text{DO} \times 3300$$

2.3.13. Dosage de lactate dehydrogenase (LDH) :

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



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH dans l'échantillon.

Trois volume de la solution de travail est pré incubé à 37°C auquel on ajoute 50 µl de l'échantillon sérique, ensuite, le mélange est incubé pendant 1 minute et la densité optique est mesurée chaque minute pendant 3 min à 340 nm. La concentration en LDH est déterminée par la formule suivante:

$$\text{Activité (LDH) UI/l} = \Delta\text{DO} \times 9690$$

2.4. Evaluation de la toxicité hématologique :

La toxicité hématologique à été mise en évidence à travers la détermination de la formule numérique (FNS) à l'aide d'un Coulter automatique (couler, Counter T540).

Les paramètres mesurés selon le principe de Coulter sont : Les globules rouges et blancs, la teneur moyen d'hémoglobine, la teneur moyen en hématocrite, le volume globulaire moyen en hémoglobine(CCMH), la teneur globulaire moyen en hémoglobine (TGMH).

2.5. Dosage des paramètres du stress oxydatif

2.5.1. Préparation de l'homogénat

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

2.5.2. Dosage des protéines totales au niveau tissulaire:

▪ Principe :

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines.

▪ Mode opératoire :

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat et ajouter 5 ml du réactif coloré (BBC).
- ✓ Agiter et laisser 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ✓ Mesurer l'absorbance optique à 595 nm, contre le blanc.

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

2.5.3. Dosage de malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire

▪ Principe :

Le dosage du MDA consiste à faire réagir dans un milieu acide et à chaud, la substance réactive de TBA avec l'un des produits finaux de la peroxydation lipidique: le malondialdéhyde (MDA). La réaction entraîne la formation d'un complexe de coloration rose, qui est d'autant plus foncée que la quantité de MDA est importante (Fig. 17).

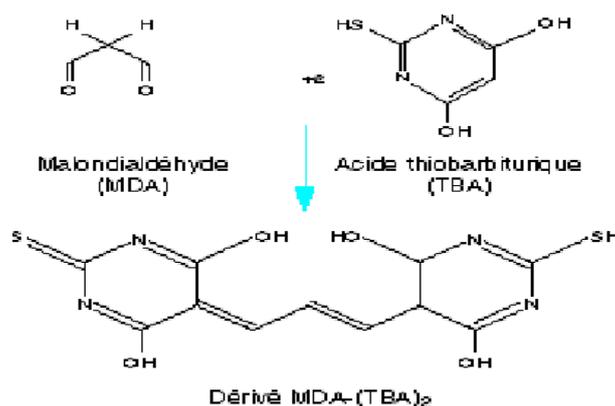


Figure 17 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

▪ Mode opératoire

- ✓ relever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- ✓ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- ✓ Prélever 400 µl du surnageant.
- ✓ Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M.
- ✓ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.

La densité optique a été enregistrée à $\lambda = 530$ nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés (Buege et Aust, 1984). La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$):

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot L \cdot \chi \cdot Fd}$$

- C: Concentration en nmoles/mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

2.5.4. Dosage de la glutathion (GSH) :

▪ Principe du dosage :

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. On procède ensuite à la déprotéinisation de l'homogénat (par l'acide sulfosalicylique 0.25%) tout en conservant les groupements -SH spécifique du glutathion (Jollow *et al.*, 1974).

▪ Mode opératoire

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique à 0.25% (SSA).
- ✓ Mélanger, laisser dans un bain de glace pendant 15 min.
- ✓ Centrifugé pendant 5 min à 1000 tours/min. Le surnageant récolté est utilisé pour doser la GSH par les étapes suivantes ;
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA à 0.4 M et 0.025 ml de DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) à 0.01M (dissous dans le méthanol absolu 99%).
- ✓ Laisser pendant 5 min dans la température ambiante pour la stabilisation de la couleur, la réaction colorimétrique se développe instantanément.
- ✓ Mesurer l'absorbance optique à 412 nm, contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg de protéines)} = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13.1 \times 0.8 \times 0.5 \times mg \text{ prt}}$$

- **D₀**: Densité optique.
- **1**: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 homogénat+0.2 ml SSA).
- **1.525**: Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant +1 ml Tris-EDTA +0.025 ml DTNB).
- **13.1**: Coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 412 nm).
- **0.8**: Le volume de l'homogénat.
- **0.5**: Le volume du surnageant.

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

L'activité de GSH-Px a été mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :



▪ Mode opératoire :

- ✓ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4).
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- ✓ Ajouter 0.2 ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- ✓ Prélever 0.48 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
- ✓ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

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

$$\text{GSH-Px } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \frac{(\text{DO } \text{échantillon} \times \text{DO } \text{étalon}) \times 0.04}{\text{DO } \text{étalon}} \times \frac{5}{\text{mg protéine}}$$

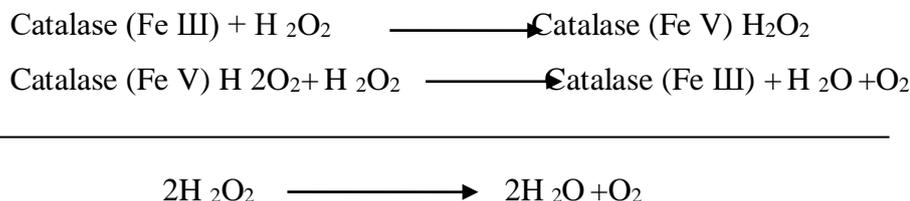
- D₀ échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- D₀ étalon: Densité optique de l'étalon.
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

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

▪ Principe :

Les catalase sont présentés dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes

tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Aebi, 1984). La réaction se fait en deux étapes :



L'activité catalase a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH=7.8, 200 μl de H_2O_2 (500 mM) sur 20 μl du S9 à une température d'incubation de 25°C. Les résultats ont été exprimés en μmol d' H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

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

Les réactifs utilisés	Essai (μl)	Blanc (μl)
Tampon phosphate (100 Mm. pH7.5)	780	800
H_2O_2 500 Mm	200	200
S9 (1à 1.5 mg prt/mL)	20	0

- ✓ La quantité des S9 doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 à 20 μl de S9.
- ✓ La lecture de l'absorption se fait après 15sec de délai et durant 60 sec de mesure.

L'activité CAT peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg prt}) = \frac{(\Delta DO \times 10)}{(\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Fd)}$$

- ΔDO : variation de la densité optique par minutes ;
- ϵ : Coefficient d'extinction, $\epsilon_{H_2O_2} = 0.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- L : Trajet optique de la cuve = 1 cm ;
- X : quantité de protéines en mg/ml ;
- Fd : 0.02 (facteur de dilution pour le H_2O_2 dans le tampon).

2.5.7. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

▪ Principe :

La méthode spectrophotométrique de dosage de l'activité de la SOD par le test NBT «nitroblue tetrazolium » est une méthode de photoréduction du complexe riboflavine/méthionine qui génère des l'anion superoxyde. La réduction du NBT par l'anion superoxyde O_2^- est utilisé comme base de détection de la présence de SOD. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre est mesurée à 560 nm (Asada *et al.*, 1974).

Mode opératoire : Pour le milieu réactionnel, on a procédé le protocole expérimental suivant :

Les réactifs	Cuve illuminée		Concentration dans le milieu réactionnel
	Blanc (µl)	Essai (µl)	
EDTA-Met	1000	1000	EDTA (0.1 mM) Met (13 mM)
Tampon phosphate	892.2	892.2	(50 mM) pH 7.8
Echantillon	-	50	
Tampon phosphate	1000	950	
NBT	85.2	85.2	75 µM
Riboflavine	22.6	22.6	2 µM

- **Calcul de l'activité SOD :** L'Activité SOD = % d'inhibition / mg de protéine

$$Y = \left(\left[\frac{(DOB-DOE)}{(DOB)} * 100 \right] * \frac{20}{[] \text{ protéine mg/ml}} \right) \times \text{Facteur de dilution}$$

Avec:

DOB: densité optique du blanc à la lumière

DOE : densité optique de l'échantillon à la lumière

Une unité SOD correspond à la quantité de protéines qui induit 50% d'inhibition.

Y ———→ 1mg de protéine

50 ———→ 50/Y mg de protéine

Y c'est le pourcentage d'inhibition / mg de protéine

50/Y mg de protéine \longrightarrow correspond à une unité SOD

1mg de protéine \longrightarrow correspond à : $\frac{1 \times 1}{50/Y} = Y/50$ Unité SOD/mg de protéine

Donc :

Activité spécifique SOD= Y/50 unité SOD / mg de protéine

2.6. Étude histologique :

Les préparations des coupes histologiques à été effectuée selon les indications de Hould (1984), elle comporte plusieurs étapes :

a. Fixation : Elle à pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après prélèvement des organes. Les organes (foie et rein) de chaque rat sont retirés de formol (10%) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5 mm. Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

b. Déshydratation : La déshydratation se fait grâce à un automate qui immerger successivement les pièces dans des bacs d'éthanol de concentration croissante (70 %, 90 %, 95 %, 100 %) et des bacs de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

c. Inclusion et réalisation des blocs : Elle ne fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool). Les pièces sont immergées dans de la paraffine qui à été fondue dans une étuve pendant 8 heures (étape de l'enrobage). Les pièces induites de paraffine sont passées à l'intérieur de moules qui sont ensuite remplis de paraffine qui, en se solidifiant va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

d. Confection des coupes : Les blocs de paraffine sont préalablement taillé avant de subir la coupe au microtome de 4 à 5 μm . Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée à 40°C. Ces lames sont placées sur une plaque chauffante afin de déplier le ruban, après refroidissement on procède à la coloration.

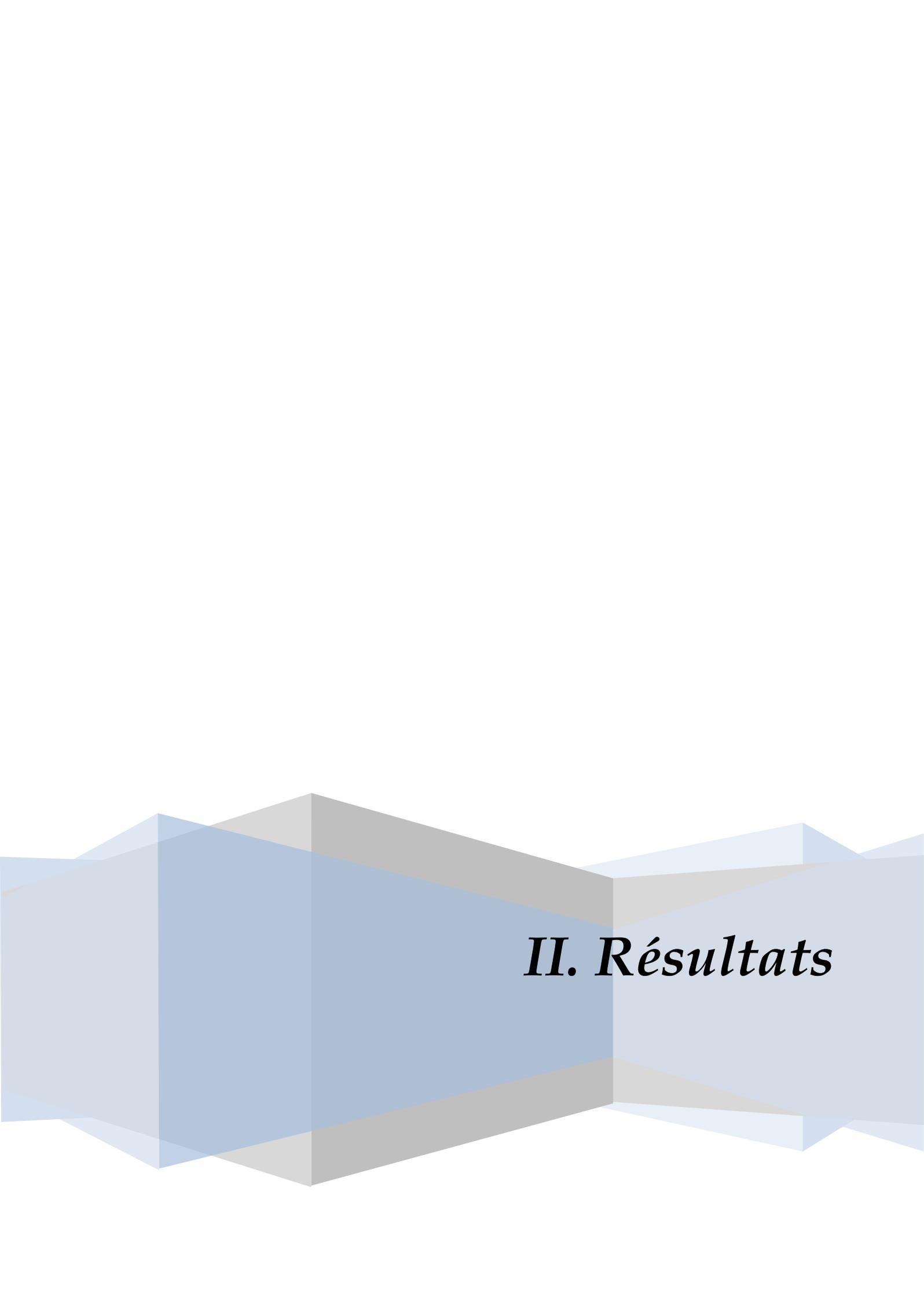
e. Coloration : Il existe plusieurs techniques de coloration qui varient en fonction des tissus. La méthode à l'Hématéine et à l'Eosine (HE) est la plus utilisée, cette technique nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% +50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'éosine (100 ml eosine solution aqueuse à 3%, 125 ml alcool éthylique à 95%, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau de robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Emmarger dans un bain d'hématéine de Harris (15 min) qui colore en bleu violacée la structure basophile (noyaux) puis laver les coupes à l'eau du robinet.
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) : déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation.
- Bleuir dans l'eau ammoniacale et laver à l'eau du robinet (15 min)
- Emmarger dans un bain d'éosine (15 sec à 2 min) ; l'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de rose plus vif, selon l'intensité de l'acidophile des divers éléments.
- Déshydrater sur lame, éclaircir monter les lames à l'Eukitt .

Enfin on passe à l'observation au microscope photonique (Leitzdialux 22), lequel est équipé d'un appareil photographique (Leicawild MP 48).

2.7. Analyse statistique

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type moyen ($\text{Moy} \pm \text{SEM}$), la comparaison entre les différents groupes sont effectuées après une analyse de la variance (ANOVA) et une comparaison des moyennes par le test t de Student. L'analyse statistique des données a été réalisée grâce au logiciel MINITAB (Version 13.31). Les différences observées sont considérées comme statistiquement significatives pour toute valeur de $P \leq 0,05$. Avec p : Seuil de signification.



II. Résultats

RESULTATS

Partie I. Composition phytochimique et activités antioxydantes des extraits du *Silybum marianum*:

Les fruits du chardon-Marie sont souvent utilisés sans y adjoindre le reste de la plante car ce sont eux qui présentent la plus forte concentration en principe actifs (Center, 2004). Selon Bruneton (1999), les composés du métabolisme primaire: lipides, protéines et oses ; n'ont qu'un effet minoritaire dans les propriétés du chardon-marie.

I.1. Préparation des extraits à partir des graines de *Silybum marianum*:

Les extraits méthanoliques récupérés à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultants, cet extrait renferme les flavonoides, le rendement est de l'ordre de $3,13 \pm 0,6$ %, ce dernier a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal rendu en poudre.

Le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Les résultats mentionnés dans le tableau 02.

Tableau 02. Rendements des extractions exprimés en g de matière sèche et en % par rapport au poids des graines

	La masse de poudre (g)	Le rendement (%)
l'extrait méthanolique	$2,89 \pm 0,56$	$3,13 \pm 0,6\%$

Le rendement de l'extrait méthanolique est conforme à ceux rapportés par certain travaux. En effet, il est supérieur à 2,56 g rapporté par Kechkar (2008) et à celui rapporté par ayant utilisé la même technique d'extraction mais dans la région de Constantine. Tandis que, Diankov (2009) a proposé un protocole opératoire fiable avec un taux d'extraction élevé par rapport aux méthodes classiques en utilisant un mélange (SC-CO²⁺ éthanol). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et semble être lié aux conditions et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

I.2. Analyse des extraits des graines de *Silybum marianum*

I.2.1. Teneur en polyphénols totaux, des flavonoïdes

Dans notre étude l'analyse phytochimique des extraits des fruits du chardon-marie, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes. La raison principale pour le choix de ces composés réside dans le fait que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes (Singh, 2007).

Le contenu en phénols totaux des extraits a été déterminé par dosage colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Une courbe d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique (Annexe), et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait végétal (mg EAG/g d'extrait),

Tandis que, le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine, et est exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Les résultats sont représentés dans le tableau 03.

Tableau 3. Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux dans l'extrait méthanolique de chardon marie

	Teneur en polyphénols (mg EAG / g_{ext})	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g_{ext})
l'extrait méthanolique	37.6 ± 4.10	28,07 ± 0,95

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables et variables en ces composés. Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'EMe 80% est riche en composés phénoliques (37.6 ± 4.10 mg EAG/g d'extrait). L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium montre que l'EMe (28 mg EQ /g d'extrait).

I.2.2. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre. Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur

couche mince pour l'extrait méthanolique 80 % de la plante étudiée sur une plaque de gel de silice. Le système solvant utilisé (chloroforme/acétone/acide formique 75/16,5 /8,5) permis d'obtenir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots en utilisant six standards comme témoins. L'utilisation de différents solvants à polarités différentes a permis de séparer ces composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Les résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique sont reportés dans le tableau 04 et les chromatogrammes sont illustrés dans la figure 18.

Tableau 4. Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait méthanolique du *Silybum marianum* dans le système chloroforme/acétone/acide formique (75 :16,5:8,5) (V/V/V) Adsorbant : gel de silice. Révélation sous UV (254 nm)

Extraits/Témoins	N°spot	Rf
EMeOH 80%	01	0.078
	02	0.164
	03	0.19
	04	0.328
	05	0.478
	06	0.543
Silybine	01	0.321
Silymarine sigma	01	0.164
	02	0.328
Silymarine commercial	01	0.078
	02	0.15
	03	0.192
	04	0.321
Taxifoline	01	0.189
alcool coniférylique	01	0.528
Naringinine	01	0.478

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm), la comparaison des Rfs des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les graines de *Silybum marianum*.

Nous avons pu mettre en évidence six composés pour l'extrait méthanolique 80% par le biais des standards utilisés. La silybine et le taxifoline sont probablement présents dans l'extrait méthanolique 80% et la silymarine commercial (Rf : 0,321 et 0,189 respectivement) alors que l'alcool coniférylique n'est probablement présent que dans l'extrait méthanolique EMeOH 80% de la plante ainsi que la naringinine qui présente un Rf de 0.478. Cependant le Rf du spot (0.078) et (0.164) issu de l'extrait EMe OH 80% et la silymarine commercial, correspond probablement à la silychristine et silydianine contenus dans la silymarine commercial (Fig. 18).

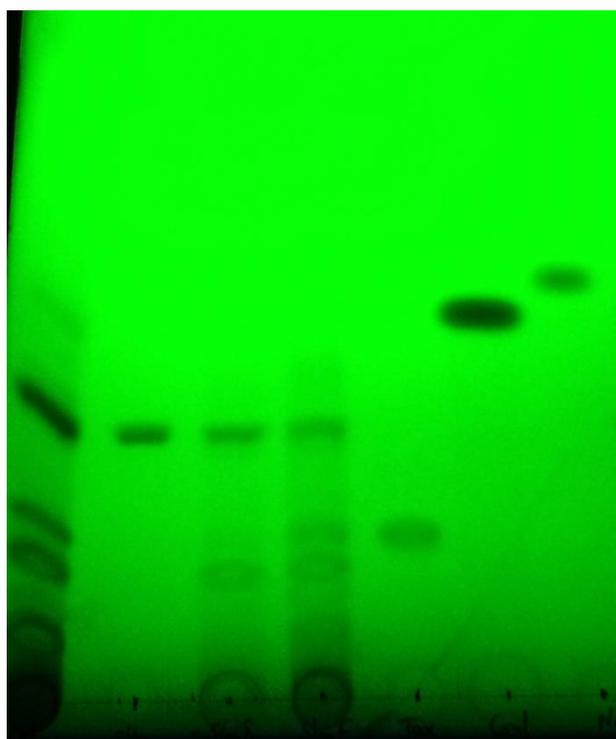


Figure 18: Photos de chromatogramme résultant de l'analyse de différents extraits et les standards par CCM (système solvant: chloroforme/acétone/acide formique 75 :16,5:8,5).

- | | | | |
|---------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1. EMeOH80% | 2. Silybine | 3. Silymarine sigma | 4. Silymarine commercial |
| 5. Taxifoline | 6. Alcool coniférylique | 7. Naringinine | |

I.3. Tests *in vitro* de l'activité antioxydante ; Effet scavenger du radical DPPH:

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH• à 517 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donateurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes :





Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH^\bullet en sa forme non radicalaire (Fig. 19). A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d' IC_{50} de chaque extrait.

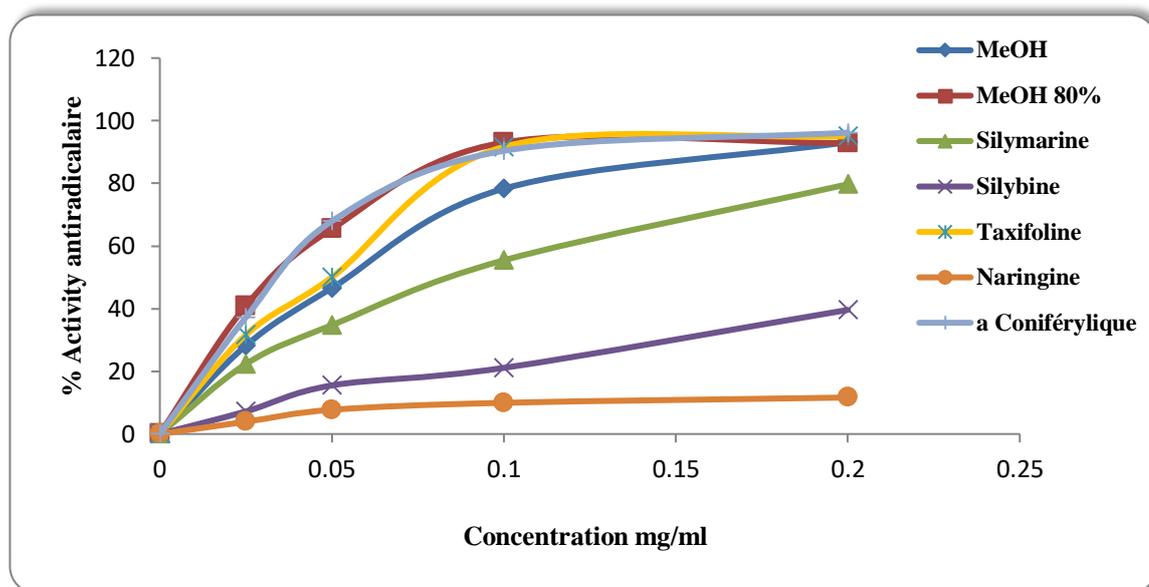


Figure 19. Activité antiradicalaire des extraits polaires des graines de *Silybum marianum* et des standards (silymarine, silibinine, taxifoline, naringinine et alcool coniférylique).

L'extrait méthanolique à 80% des graines a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH^\bullet plus important par rapport à l'extrait méthanolique pure. Ces deux extraits ont présenté à très faibles concentrations des pourcentages d'inhibitions élevés. A une concentration de 0,1 mg/ml les pourcentages d'inhibitions sont de l'ordre de 93,04 % pour l'extrait méthanolique MeOH à 80%, suivi par l'extrait brut pur des graines avec un pourcentage de 78,3 %. La réduction du DPPH^\bullet est presque complète à partir de cette concentration.

Cette activité piégeage du radical DPPH^\bullet par rapport à celui de silymarine, le pourcentage d'inhibition est de 93,14% et 92,85% pour les deux extraits MeOH pure et MeOH 80% en comparaison au standard silymarine qui ne présentent qu'un pourcentage de 79,58 %, à une concentration de 0.2 mg/ml.

Concernant la taxifoline et l'alcool coniférylique le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 95.07 % et de 96.18 % respectivement à une concentration de 0.2 mg/ml. Ces deux standards ont donné des activités plus élevées à celle des extraits (Fig. 19). Par contre, la silybine et la naringinine ne montre aucune activité antiradicalaire, le pouvoir antiradicalaire n'atteint même pas 50% a cette concentration.

➤ **Calcul des IC_{50} :**

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir des IC_{50} , c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH[•]. Plus la valeur d' IC_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (Pokorny *et al*, 2001). Les valeurs des IC_{50} trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans la figure 20 sous forme d'histogramme.

En comparant les IC_{50} des deux extraits testés par rapport à celle des standards, nous avons remarqué une activité antioxydante élevée de l'extrait EMeOH 80% des graines qui est supérieur à la capacité du piégeage du radical DPPH[•] de la silymarine et de l'alcool coniférylique et représentent une activité antioxydante presque similaire et intéressante par rapport au control positif taxifoline (0,035 mg/ml).

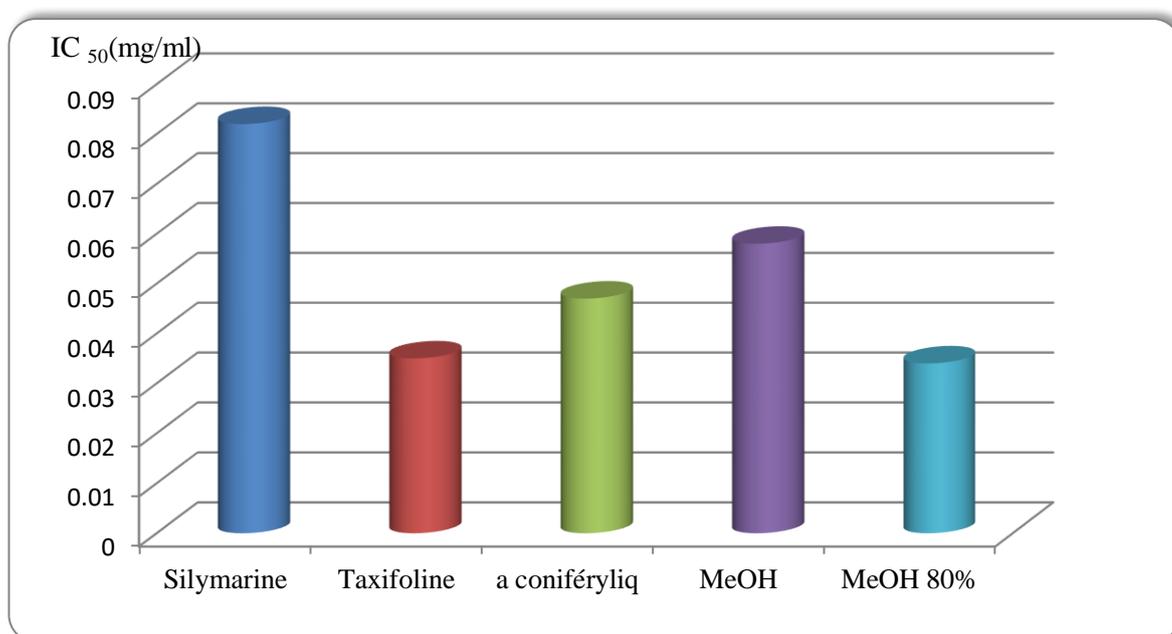


Figure 20 : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml.

II. Activité antioxydante du *Silybium marianum*, de la L-cysteine, et de la L-méthionine contre la toxicité de sulfate de nickel: étude *in vivo*; Exploration des fonctions vitales et du stress oxydant

1. Etude pondérale

1.1. Influence du traitement sur la croissance corporelle:

Nos résultats montrent une perte hautement significative ($p \leq 0,01$) du poids corporel et une baisse du gain de poids corporel chez le lot traité par le nickel comparativement au lot témoin. Tandis que, on enregistre une nette amélioration significative ($P \leq 0,05$) du poids corporel par l'administration du Sil, Cys au groupes traité par le nickel comparant au groupe traité par le nickel seul, bien que le gain pondéral soit inférieur à celui des groupes témoin.

Toutefois, nous remarquons une diminution significative ($p \leq 0,05$) du poids corporel chez les rats traités par la combinaison Ni+Met comparant aux rats témoins (Fig. 21).

Chez les rats traités uniquement par la Sil, Cys ou Met on note que la croissance corporelle est très comparable à celle des témoins (Te) (Tab. 05).

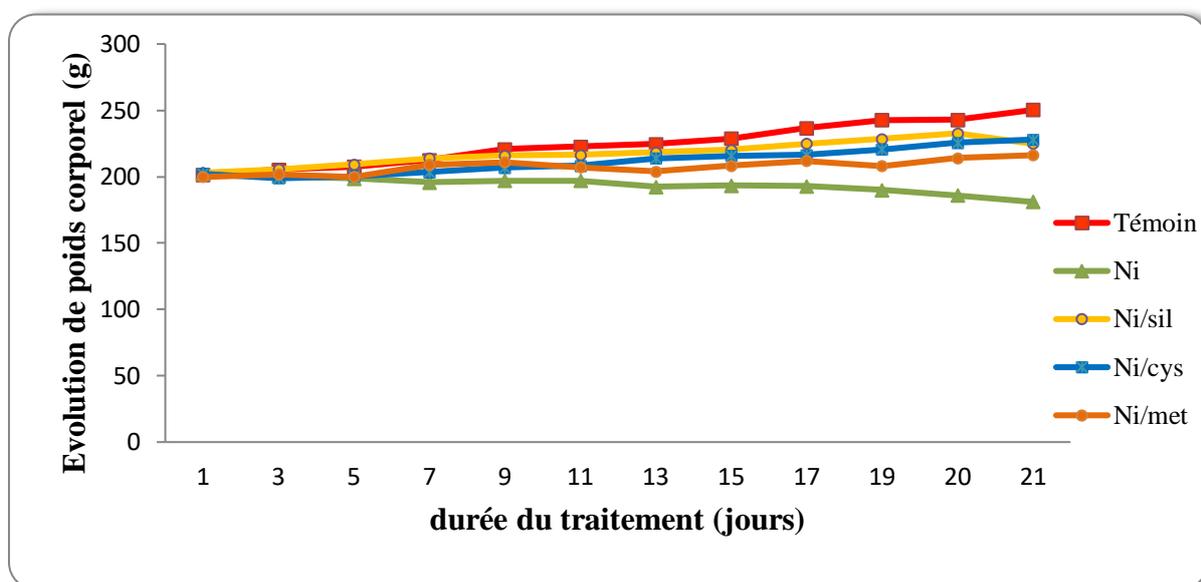


Figure 21: Profil de la croissance corporelle chez les rats témoins et traités par (Ni, Ni+Sil, Ni+Cys, et Ni+Met) en fonction de la durée du traitement

Tableau 05: Variation de poids corporel (g) et le gain de poids (g) chez les rats expérimentaux après 21 jours de traitement.

Paramètres (g)	Les lots expérimentaux							
	Te	Sil	Cys	Met	Ni	Ni+Sil	Ni+Cys	Ni+Met
Poids initial	201,33±6,5	205,83±3,37	203,83±6,4	201,2±5,15	202,33±6,88	203±5,94	202,3±4,9	200±4,95
Poids final	250,3± 6,8	251,7±4,5	227,3±8	239±4,9	181,7±11,3 ^{a1}	224,8±8,4 ^b	228,7±6,6 ^b	216,3±7,6 ^a
Gain de poids	65,50±7,92	61,10±6,67	52,80±8,91	59,4±6,2	8,80±4,93	64,84±3,94	35,10±6,89	32,90±2,84

^a: Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0,05$). ^{a1}: Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$).

^b: Différence significative comparant au lot traité par le Ni ($P \leq 0,05$).

1.2. Influence du traitement sur les rapports organo-corporels

Nous avons suivi l'évolution des poids absolus (PA) et relatifs (PR) des organes suivants : le foie, les reins et les testicules chez les rats témoins et les rats traités.

Les résultats de la figure 22 révèlent une augmentation significative ($p \leq 0,05$) du poids relatif du foie, hautement significative ($p \leq 0,01$) du poids absolu et relatif des reins et des testicules chez le lot traité par le nickel par rapport au témoin.

Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution significative des poids absolus et relatifs de foie, des reins et des testicules chez les rats traités par les combinaisons (Ni+Sil, Ni+Cys et Ni+Met) par rapport aux rats traités par le nickel (Fig. 22 et 23). Les résultats obtenus montrent aussi qu'il y a eu une variation statistiquement significative de poids relatif du foie chez les rats recevant la combinaison (Ni+Met) comparant aux rats témoins.

Par ailleurs, aucune différence statistiquement significative n'a été enregistrée chez les groupes traités par Sil, Cys ou Met par rapport au témoin.

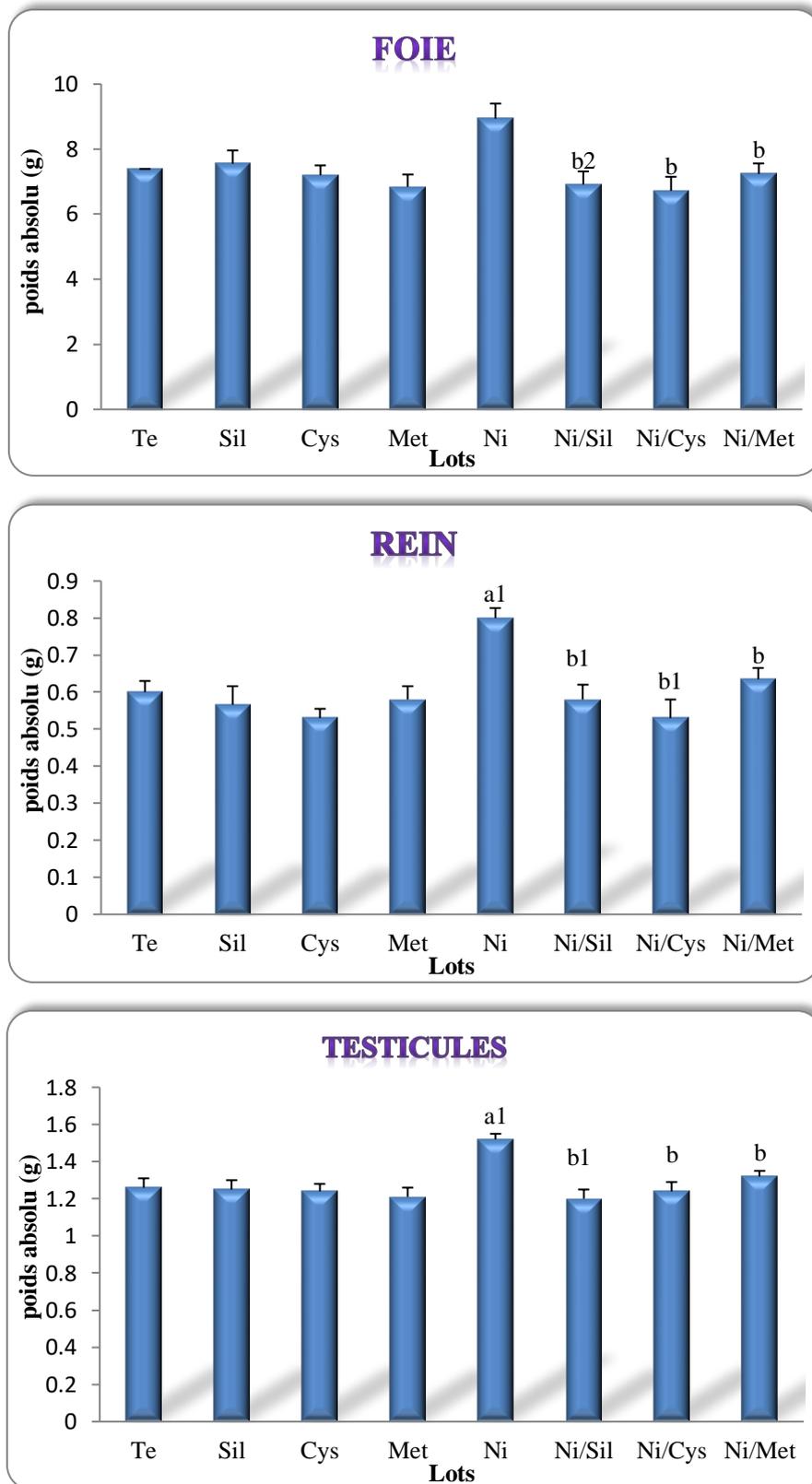


Figure 22: Variation des poids absolus (PA) des organes chez les lots expérimentaux après 21 jours de traitement

^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au témoin; ^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au lot Ni.

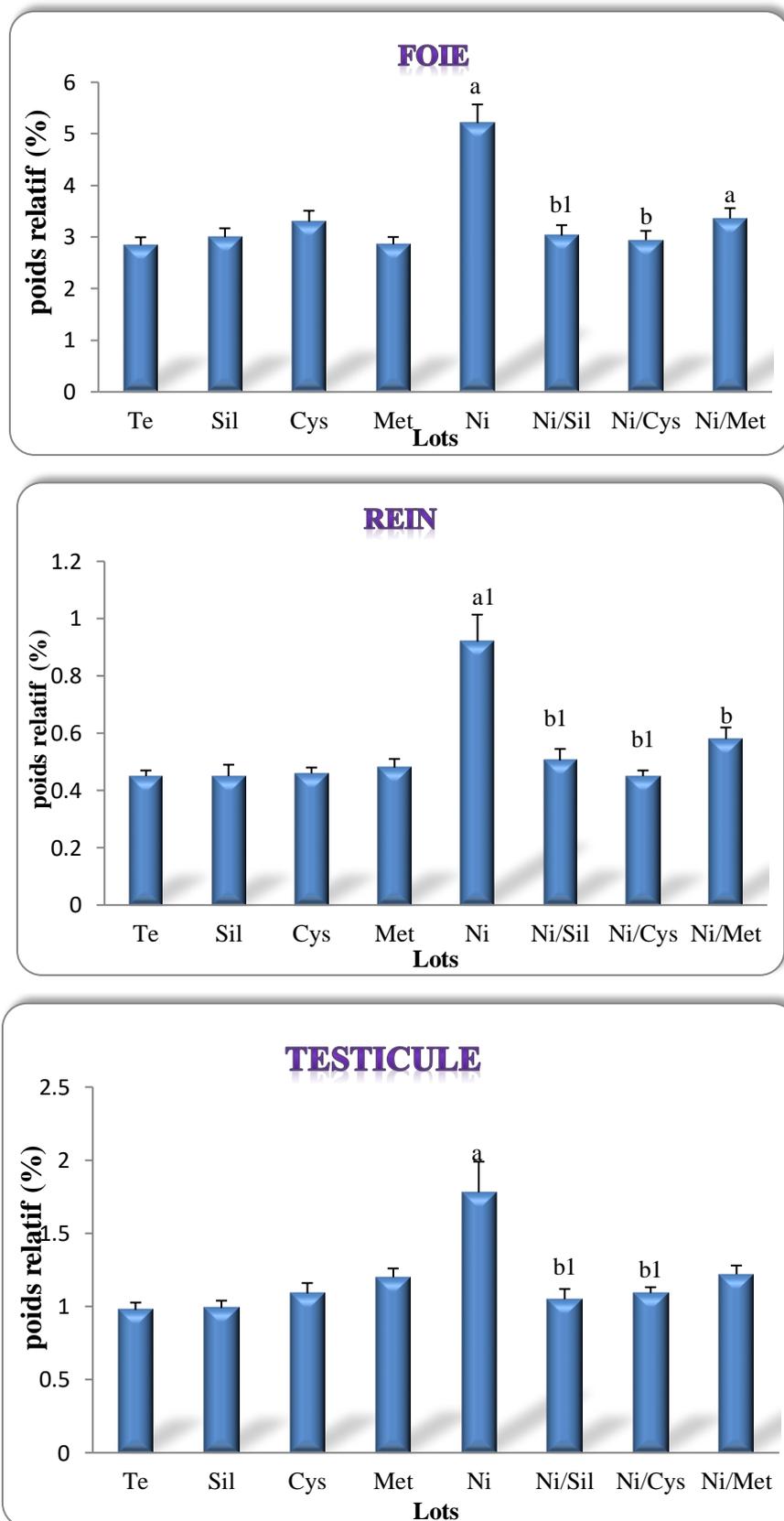


Figure 23 : Variation du poids relatif de certains organes chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au témoin ;

^b : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au lot Ni.

II. 2. Effet sur les paramètres biochimiques:

II.2.1. Influence du traitement sur la glycémie :

D'après les résultats obtenus (Fig. 24), on observe une augmentation très hautement significative de la concentration sérique en glucose chez le groupe traité par le nickel comparant au groupe témoin, par contre on enregistre un rétablissement par une diminution significative de la concentration sérique en glucose chez les lots traités par les combinaisons (Ni+Sil, Ni+Cys) : ($p \leq 0,001$) et Ni+Met : ($p \leq 0,01$) comparant au lot traité par le nickel seul.

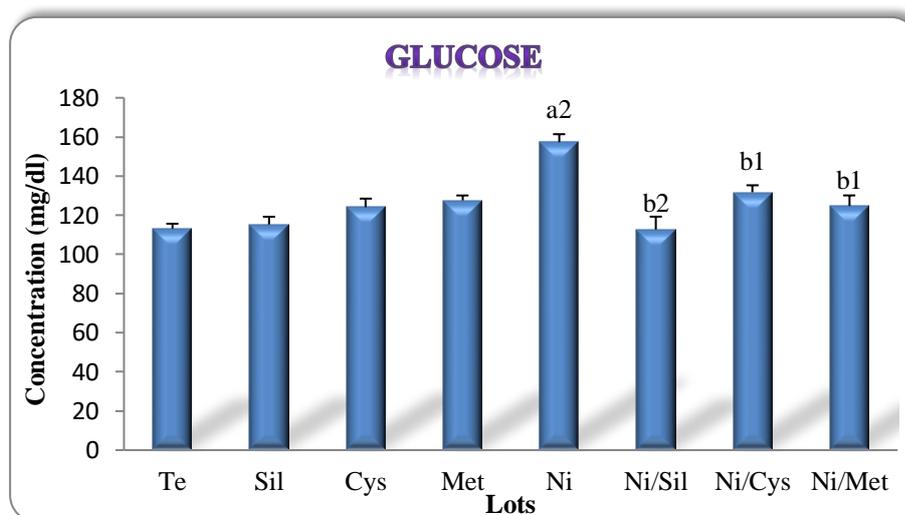


Figure 24: Variation de la concentration sérique du glucose chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au témoin ; ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au lot Ni.

2.2. Influence du traitement sur le profil lipidique (cholestérol, triglycérides, lipides totaux) :

D'après les résultats illustrés dans la figures 25, nous notons une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de la concentration sérique des triglycérides et significative ($p \leq 0,05$) du cholestérol et des lipides totaux chez le groupe nickel comparant au groupe témoin. Par contre, on constate une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration sérique des triglycérides et significative ($p \leq 0,05$) de la concentration sérique du cholestérol et des lipides totaux chez les lots traités par les combinaisons Ni+Sil, Ni+Cys et Ni+Met par rapport au lot nickel. Autre part, la concentration sérique des triglycérides, de cholestérol et des lipides totaux ne présentent aucune différence statistiquement significative chez les lots traités uniquement par Sil, Cys ou Met par rapport au témoin (Fig. 25).

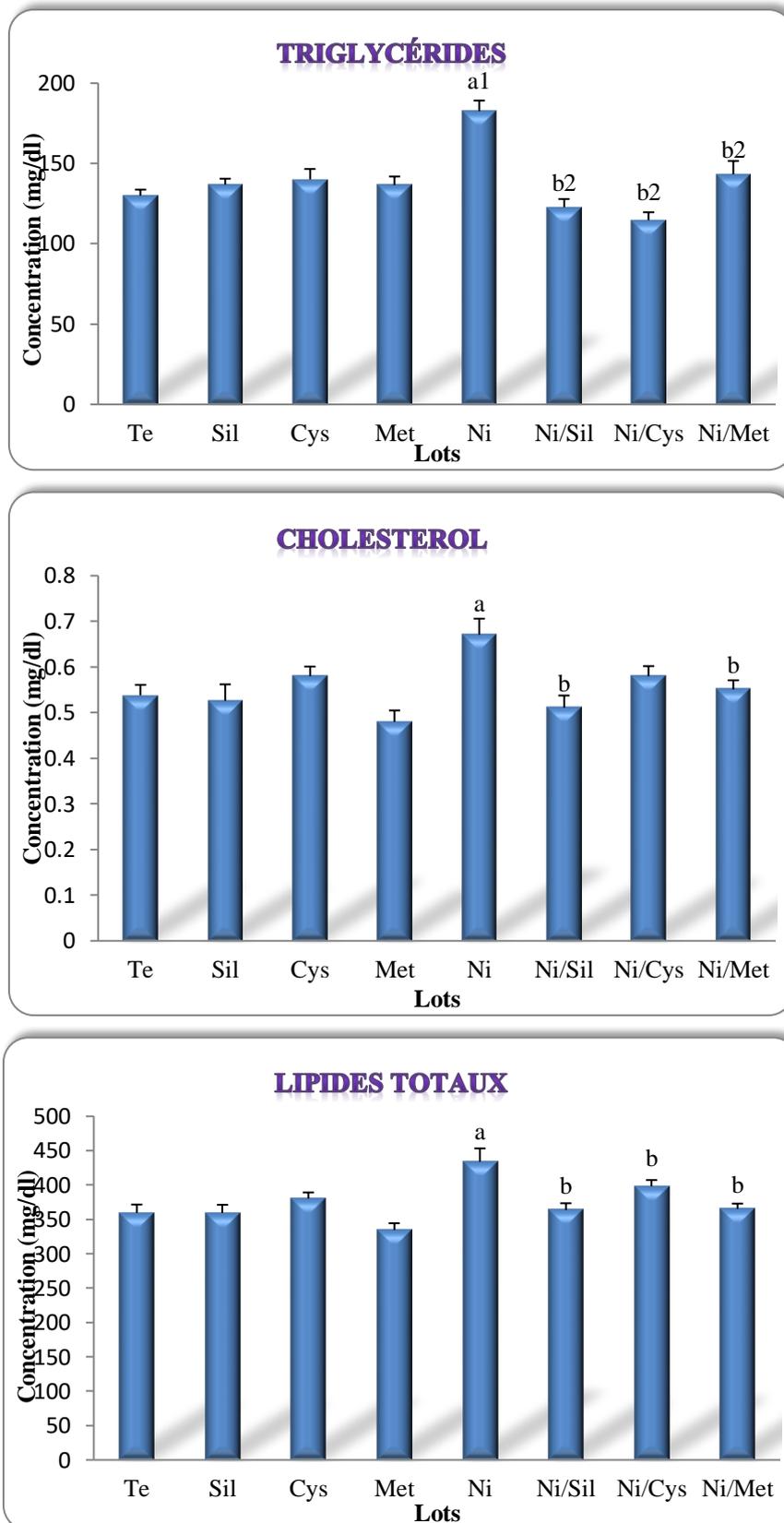


Figure 25: Variation de la concentration sérique des triglycérides, du cholestérol, et des lipides totaux chez le lot témoin et les lots traités après 21 jours.

^a : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a1} : Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) par rapport au témoin ;

^b : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b2} : Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

2.3. Influence du traitement sur la fonction hépatique :

➤ Protéines totales

La concentration sérique des protéines totales présente une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez le lot traité au nickel par rapport au témoin. On note une augmentation significative ($p \leq 0,05$) chez les lots traités par les combinaisons Ni+Sil, Ni+Cys, Ni+Met par rapport au lot nickel. Entre autre, les rats traités uniquement par la Sil, Cys et Met, ne présentent aucune différence statistiquement significative comparant au lot témoin (Fig. 26).

➤ Bilirubine totale

L'administration de nickel chez les rats induit une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration sérique en bilirubine totale. Tandis que, nos résultats montrent un rétablissement par une variation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez des lots traités par les combinaisons Ni+Sil et Ni+Met, et significative ($p \leq 0,05$) avec la combinaison Ni+Cys par rapport au lot traité seulement par le nickel (Fig. 26).

➤ Activité des transaminases

Le traitement des rats par le sulfate de nickel induit une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la concentration enzymatique de l'AST, une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'ALT chez les lots traités par le nickel par rapport aux témoins (Fig. 27). Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de l'AST et l'ALT chez les rats traités par la combinaison Ni+Sil, très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez le lot traité par la combinaison (Ni+Cys) et hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot traité par (Ni+Met) pour AST.

Les niveaux de ALT ont été sensiblement diminués d'une façon hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le groupe traité à la combinaison Ni+Cys, en comparaison au lot de Ni et significative avec le groupe Ni+Met par rapport au groupe nickel.

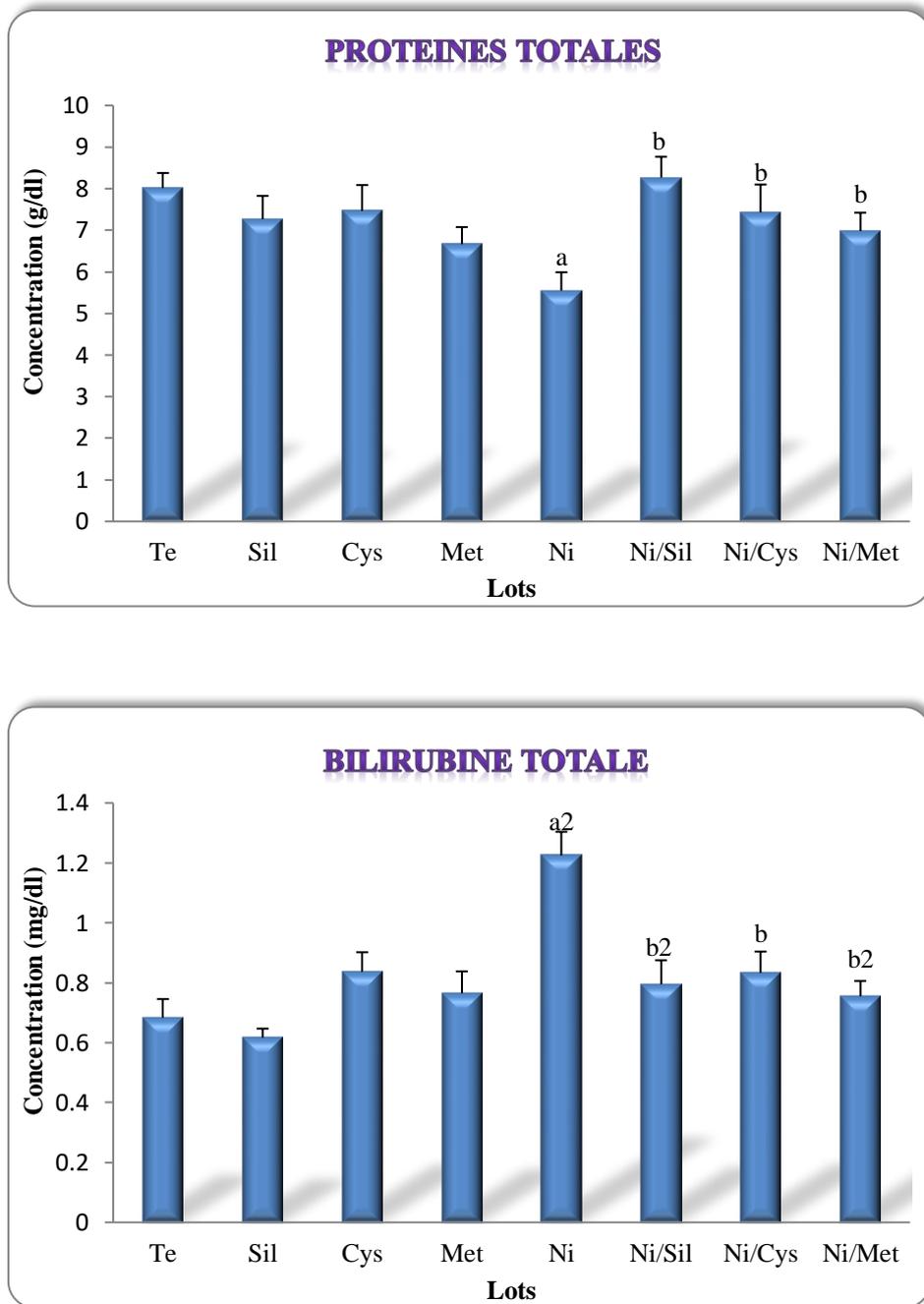


Figure 26 : Représente la concentration sérique des protéines totales et de la bilirubine totale chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a2} : Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au témoin ;

^b : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b2} : Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au lot Ni.

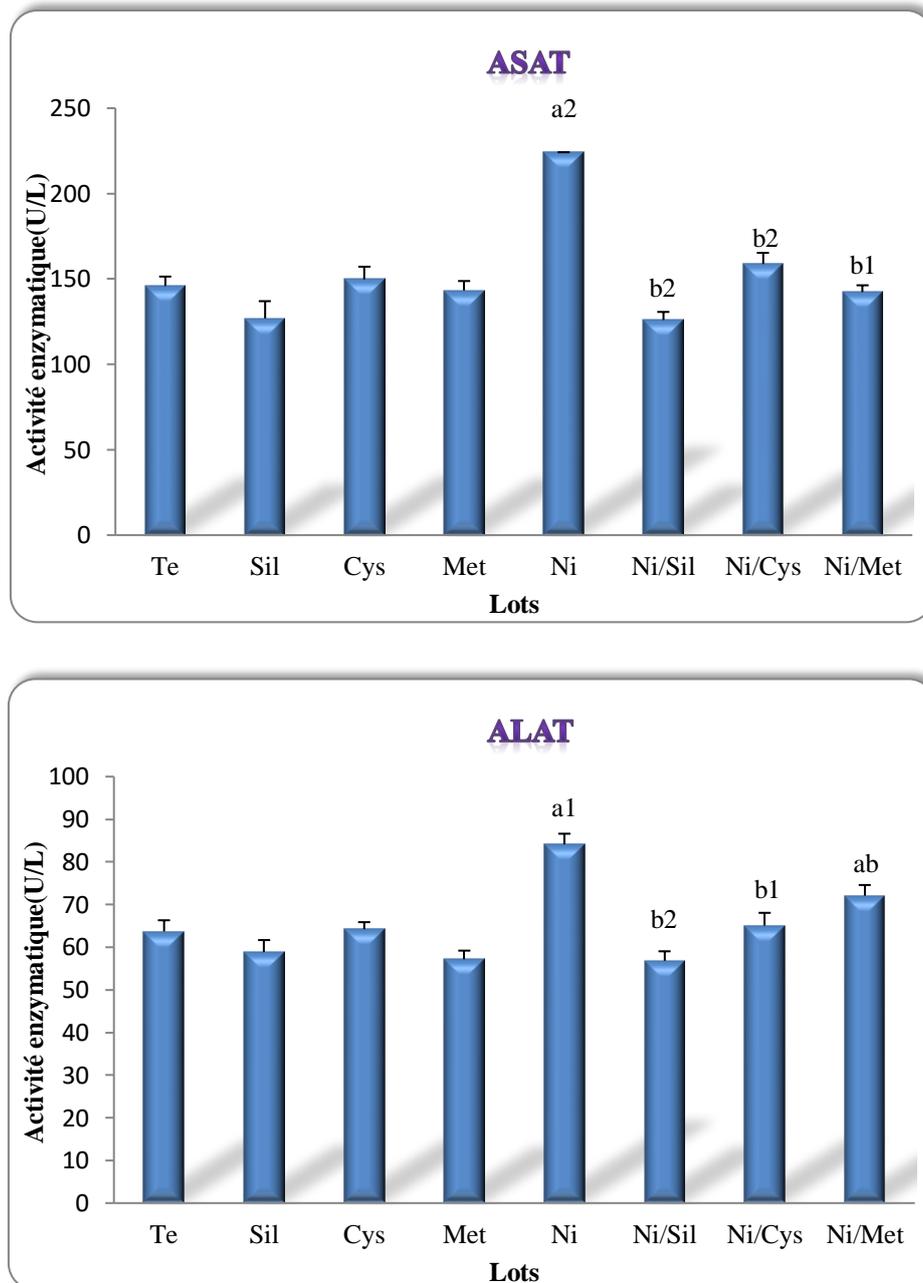


Figure 27 : Variation des activités enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ;

^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

➤ **Activité de lactate déshydrogénase (LDH)**

L'administration du sulfate de nickel chez les rats provoque une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH) par rapport aux rats témoins. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de l'LDH chez les rats traités par les combinaisons Ni+Sil et Ni+Cys, et très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les rats traités par la combinaison Ni+Met en comparaison avec les rats traités au nickel. Chez les lots traités uniquement par la Sil, Cys et Met n'abouti aucun changement significative comparant au lot témoin (Fig. 28).

➤ **Activité de la phosphatase alcaline (PAL)**

Nos résultats montrent une élévation significative ($p \leq 0,05$) de l'activité enzymatique de la PAL chez les rats recevant au nickel par rapport aux témoins. En revanche, on a enregistré un rétablissement par une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité de la PAL chez les rats traités par la combinaison Ni+Sil et significative ($p \leq 0,05$) chez les rats traités par les combinaisons Ni+Cys et Ni+Met en comparaison avec les rats traités au nickel.

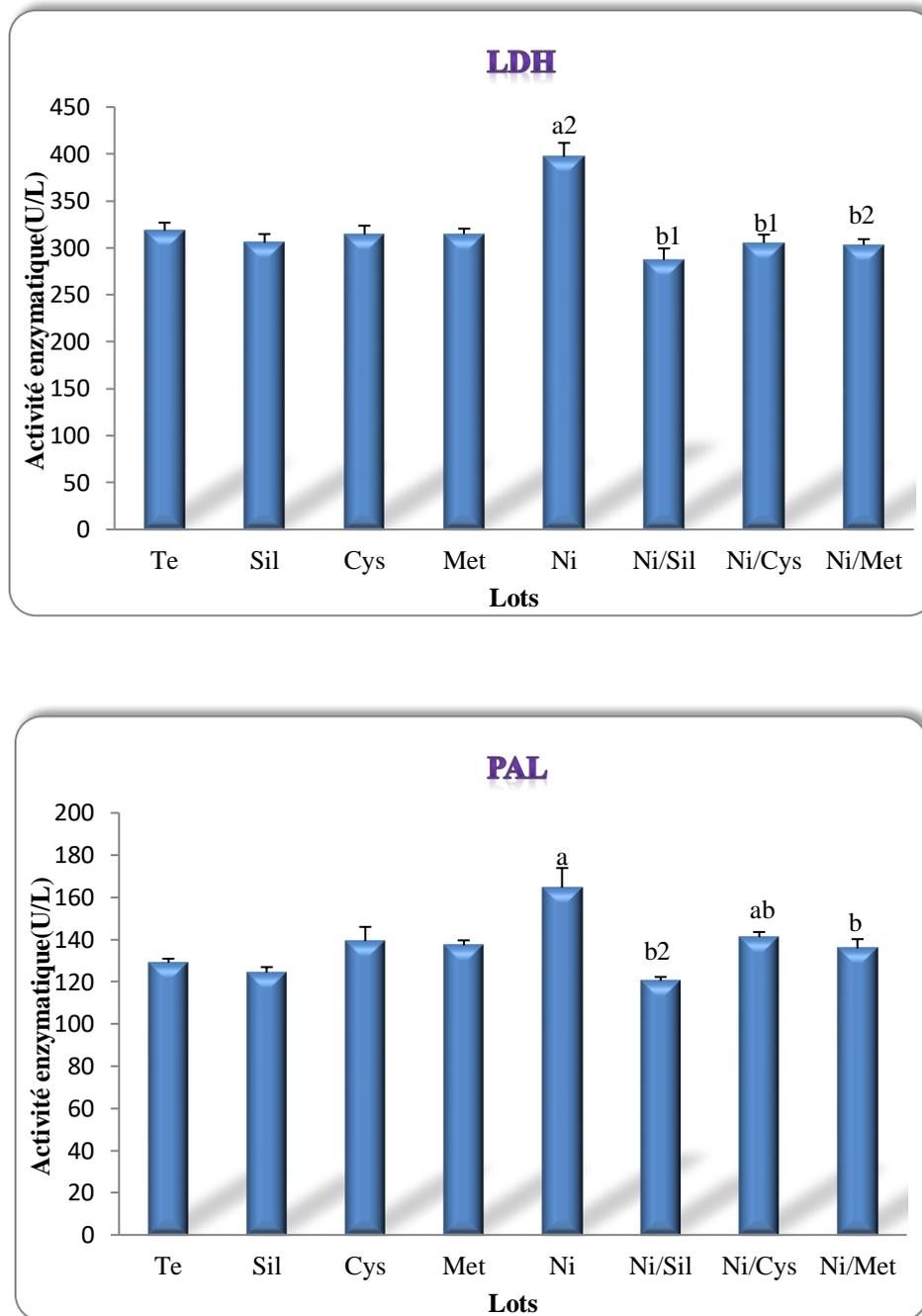


Figure 28: Variation des activités enzymatiques du lactate déshydrogénase (LDH) et de la phosphatase alcaline (PAL) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ;
^b : Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

2.4. Influence du traitement sur la fonction rénale (urée, créatinine et acide urique) :

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux sérique en urée, créatinine et acide urique chez le groupe traité par le nickel par rapport au groupe témoin. Par contre, on note un rétablissement par une diminution hautement significative de l'urée chez les rats traité par la combinaison (Ni+Sil) et significative chez les lots (Ni+Cys, Ni+Met) comparant au lot nickel.

Tandis qu'on enregistre une variation significative ($p \leq 0,05$) de taux sérique en créatinine chez les lots de la combinaison (Ni+Sil, Ni+Cys) et hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les rats traité (Ni+Met) par rapport au groupe nickel. On note aussi une variation statistiquement significative de l'acide urique chez le groupe traité par les combinaisons Ni+Sil ($p \leq 0,01$), Ni+Cys ($p \leq 0,001$) et Ni+Met ($p \leq 0,05$) comparant aux rats traités par le nickel. Les rats traités uniquement par Sil, Cys ou Met ces paramètres n'abouti aucun changement significative par rapport au témoin (Fig. 29).

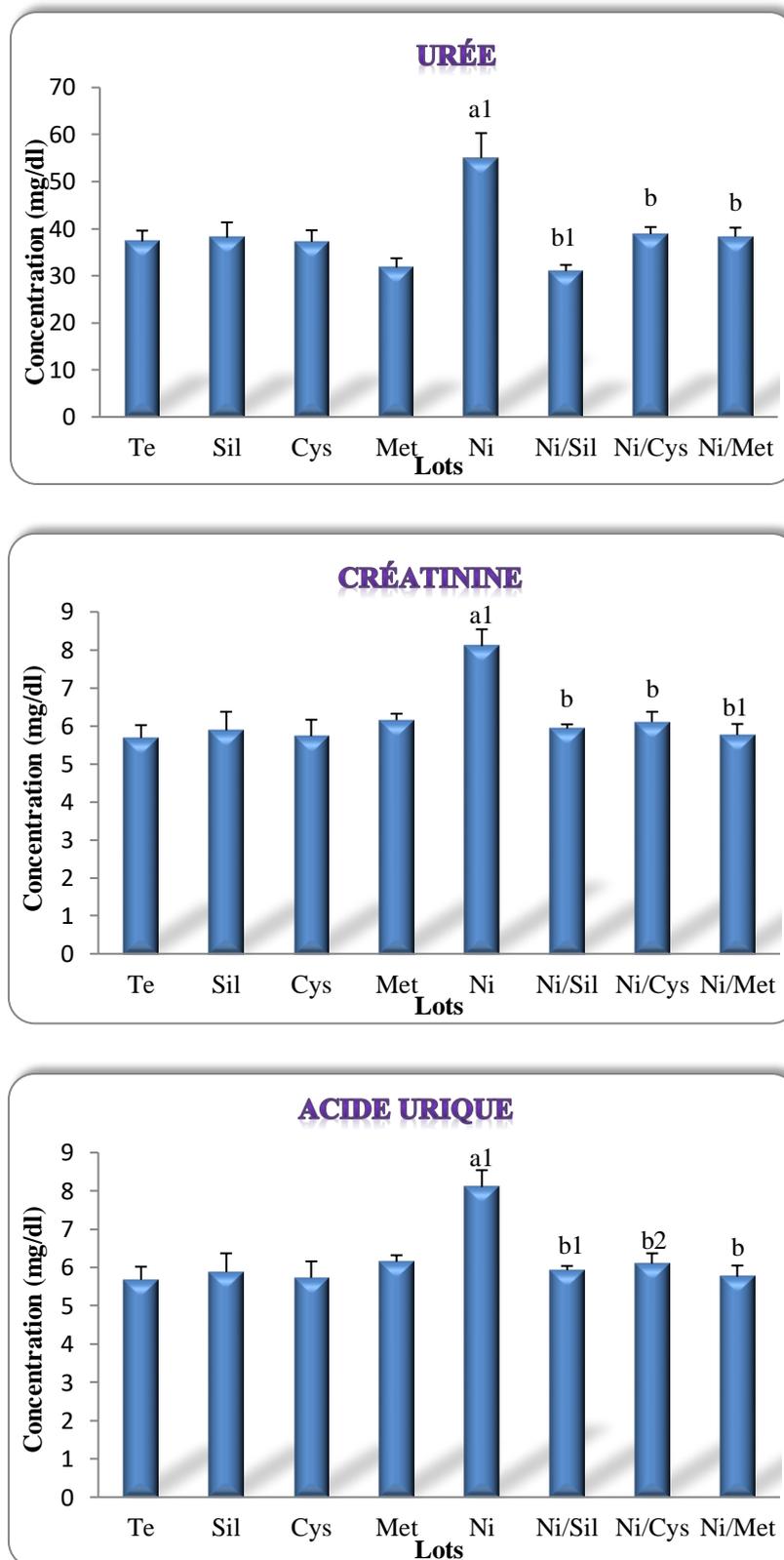


Figure 29: Variation de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine, et de l'acide urique chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), par rapport au témoin ; ^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$) ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

3. Etude hématologique:

3.1. Nombre des globules rouges et taux d'hémoglobine :

En ce qui concerne les paramètres hématologiques, et selon le tableau 6, nous avons constaté une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du nombre des globules rouges et hautement significative ($p \leq 0,01$) du taux d'hémoglobines chez le lot traité par le nickel comparativement au lot témoin. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du nombre des globules rouges chez le lot traité par les combinaisons Ni+Sil et Ni+Met, et significative ($p \leq 0,05$) chez les rats traités par la combinaison Ni+Cys en comparaison avec les rats traités au nickel.

Par ailleurs, il existe une différence significative ($p \leq 0,05$) du taux d'hémoglobines chez le lot traité par la combinaison Ni+Sil par rapport au groupe de nickel. Alors que, les groupes traités par les combinaisons Ni+Cys et Ni+Met n'abouti a aucune différence significative par rapport au rats traités par le nickel.

3.2. Nombre des globules blancs :

L'analyse du nombre de globules blancs (GB) révèle l'existence d'une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots traités par le nickel comparativement aux rats témoins. Par contre, il existe une différence très hautement significative ($p \leq 0,001$) du nombre de globules blancs chez le lot traité par la combinaison Ni+ Sil par rapport au lot traité par le sulfate de nickel.

3. 3. Volume globulaire moyen et du taux de l'hématocrite :

Le traitement des rats par le sulfate de nickel, entraîne une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux d'hématocrite et une différence non significative du volume globulaire moyen (VGM) comparativement aux rats témoins (tableau 06). En revanche, on enregistre une différence significative ($p \leq 0,05$) du taux de l'hématocrite chez les lots traités par la Sil, Met et les combinaisons Ni+Sil, Ni+Cys et Ni+Met en comparaison avec le groupe témoin. D'après nos résultats, on enregistre une différence significative ($p \leq 0,05$) du taux d'hématocrite chez les lots traités par Ni+Sil comparativement aux rats traités par le nickel seul. En plus, il existe aucune différence significative du VGM des rats traités par les combinaisons par rapport au lot traité par le sulfate de nickel ou témoin. Les paramètres CCMH, TCMH ne montrent pas de changements (Tab. 06).

Tableau 06 : Variation du nombre des globules rouges (nGR), globules blancs (nGB), du taux moyen d'hémoglobine (Hb), du pourcentage d'hématocrite (Ht), du volume globulaire moyen (VGM), de la concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH) et de la teneur globulaire moyen en hémoglobine(TGMH), chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres	Les lots expérimentaux							
	Témoin	Sil	Cys	Met	Ni	Ni+Sil	Ni+Cys	Ni+Met
GR (x10⁶/µl)	9,47±0,18	8,56±0,26	8,48±0,35	7,31±0,37 ^{a1}	5,9±0,2 ^{a1}	8,1±0,27 ^{b2}	7,21±0,35 ^{ab}	8,48±0,29 ^{ab2}
GB (x10³/µl)	11,75±0,52	11,5±1,22	9,73±0,9	8,48±0,64 ^a	6,06±0,35 ^{a2}	10,10±0,53 ^{b2}	7,43±0,55 ^{a1}	8,2±0,7 ^a
Hb (g/dl)	17,3±1,2	16,4±0,7	15,67±1,01	14,06±0,63 ^a	11,02±0,53 ^{a1}	15,03±1,1 ^b	13,38 ±1,03	13,45±0,82 ^a
Ht (%)	50,55±1,04	45,88±1,44 ^a	45,38±1,67	40,68±1,76 ^{a1}	33,7±2,64 ^{a2}	44,22±1,45 ^{b1}	41,4±2,48 ^a	46,5±1,14 ^{b1}
VGM (fL)	53,38±0,9	53,83±2,4	53,65±1,62	56,03±3,08	56,78±3,13	54,61±0,99	57,3 ±1,8	55,18±2,63
CCMH (pg)	34,13±2,11	35,83±1,44	34,50±1,65	34,7±1,24	33,48±2,23	34,05±2,33	32,73 ±0,6	29,08±2,21
TGMH (g/dl)	18,18±1,08	19,18 ±0,6	18,46±0,98	19,33±0,87	18,8±0,9	18,58±1,24	18,53±0,94	15,86±0,78

^a: Différence significative par rapport au témoin (P≤0,05). ^{a1}: Différence hautement significative par rapport au témoin (P≤0,01). ^{a2}: différence très hautement significative (p<0,001).

^b: Différence significative par rapport au lot traité par le Ni (P≤0,05). ^{b1}: Différence hautement significative par rapport au lot traité par le Ni (P≤0,01). ^{b2}: différence très hautement significative par rapport au lot traité par le Ni (p<0,001).

4. Influence de traitement sur la variation de paramètres du stress oxydant :

4.1. Taux du malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats illustrés dans la figure 30, on observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) du taux du MDA hépatique, et hautement significative ($p \leq 0,01$) dans les organes : rein et testicule chez le lot traité par le nickel par rapport aux rats témoins, tandis que la supplémentation de l'extrait du chardon-Marie, Cys ou du Met avec le nickel entraîne une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) des teneurs en MDA hépatique et testiculaire. Dans les reins cette diminution est significative ($p \leq 0,05$) chez les groupes traités par les combinaisons (Ni+Sil et Ni+Met) et hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le groupe de (Ni+Cys). On remarque que la concentration de la MDA dans les organes étudiés revient presque à l'état normal et il n'y a pas de variation significative de cette activité en comparaison avec le groupe témoin.

De même chez les rats traités seulement par sil, cys et met les variations de l'activité MDA au niveau des tissus hépatiques, rénales et testiculaires ne sont pas significatives par rapport aux témoins.

4.2. Taux du glutathion réduit (GSH)

Le traitement des rats par le sulfate de nickel, à une dose de 20 mg/kg de poids corporel pendant 21 jours, entraîne une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de la teneur en glutathion au niveau hépatique, et testiculaire, hautement significative ($p \leq 0,01$) dans les reins.

Par revanche, chez les groupes traités par les combinaisons Ni+Sil, Ni+Cys, Ni+Met on enregistre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) et hautement significative ($p \leq 0,01$) de la teneur en glutathion au niveau du foie, rein et testicule comparativement au lot traité par le nickel, alors qu'il n'existe aucune différence significative du taux de GSH au niveau des organes étudiés comparativement au lot témoin (Fig. 31).

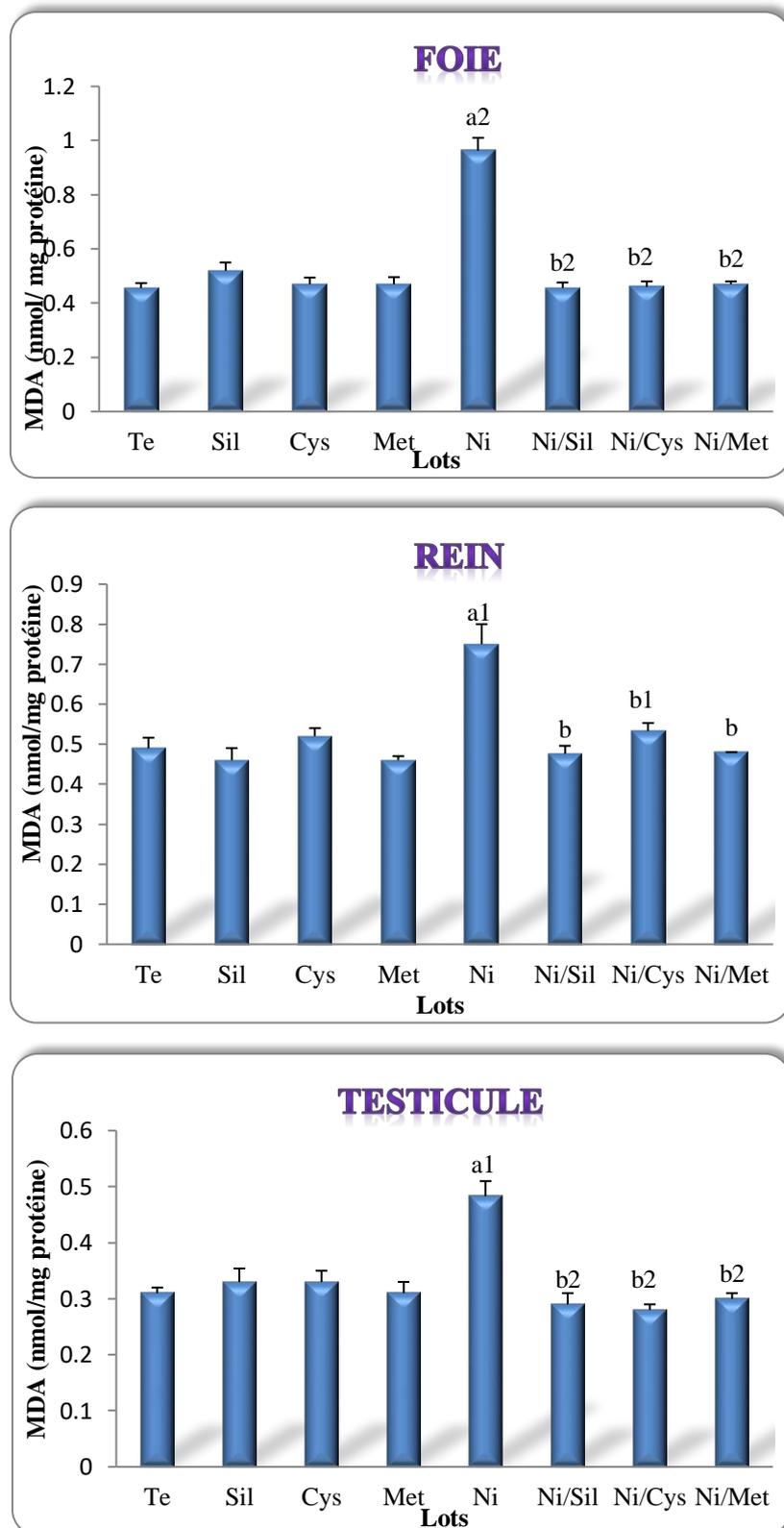


Figure 30: Variation malondialdéhyde dans les organes, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ; ^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

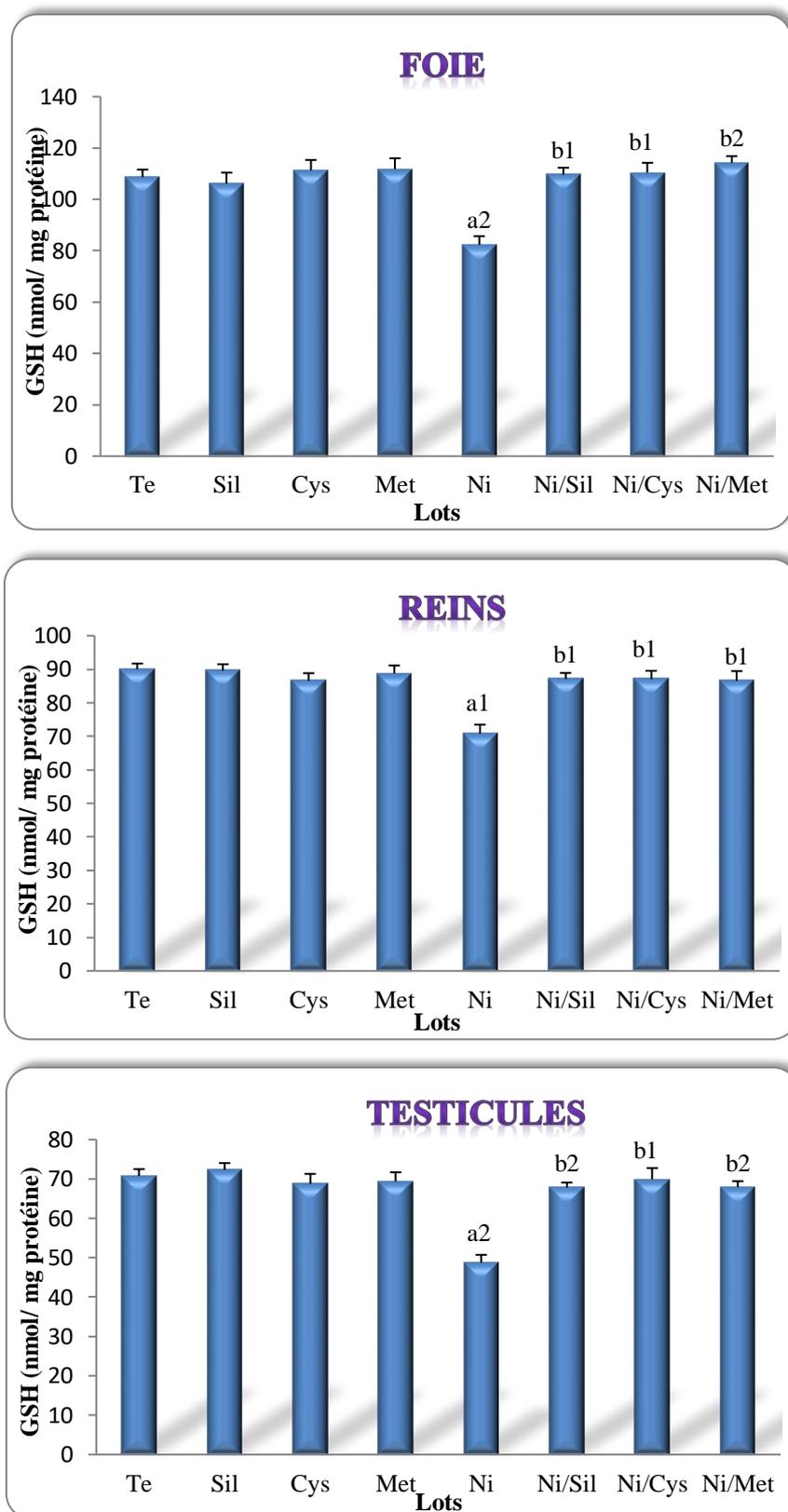


Figure 31: Variation de la teneur cellulaire en glutathion dans les organes, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ; ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

4.3. Activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

D'après le tableau 08 et la figure 32 on constate que le traitement des rats par le sulfate de nickel provoque une diminution significative ($p \leq 0,05$) de l'activité de la GSH-Px au niveau du tissu hépatique, très hautement significative ($p \leq 0,001$) dans les reins, et hautement significative ($p \leq 0,01$) dans les testicules tout en comparant aux rats témoins.

Par contre, on remarque une amélioration par une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de l'activité enzymatique de GSH-Px chez le lot traité par Ni+Cys dans le foie et les reins, significative ($p \leq 0,05$) dans le foie chez le groupe traité par Ni+Met, les reins (Ni+Sil, Ni+Met) et les testicules (Ni+Cys), tandis que au niveau du testicule on enregistre une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots traités par les combinaison Ni+Sil et Ni+Met par rapport aux rats traités par le nickel.

Par ailleurs, Les lots traités uniquement par la Sil, Cys et Met le taux du GSH-Px n'abouti aucun changement significative au niveau des organes par rapport au témoin.

4.4. Activité de la catalase (CAT)

Les résultats obtenus montrent que le traitement par le nickel provoque une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie et les testicules, hautement significative ($p \leq 0,01$) dans les reins par rapport aux rats témoins.

En revanche, on enregistre une restauration par une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité de la CAT dans le foie chez les rats traités par les combinaisons (Ni+Sil, Ni+Met), hautement significative ($p \leq 0,01$) dans les reins (Ni+Met), testicule (Ni+Cys) et significative ($p \leq 0,05$) dans le foie (Ni+Cys) et dans les testicules chez les rats traités par la combinaison (Ni+Sil) par rapport aux rats traités par le nickel.

4.5. Activité de superoxyde dismutase (SOD)

D'après le tableau 8 et la figure 34 on constate que le traitement des rats par le nickel provoque une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique de la SOD dans les organes : foie et testicule, et hautement significative ($p \leq 0,01$) au niveau du rein chez le lot traité par le nickel par rapport aux rats témoins. Par contre, on enregistre un rétablissement par une augmentation statistiquement significative de l'activité enzymatique de la SOD dans les organes étudiés chez les lots traités par les combinaisons (Ni+Sil, Ni+Cys et Ni+Met) comparativement au lot traité par le nickel.

Tableau 07: Variation de l'activité du glutathion peroxydase (GSH-Px), du catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD) au niveau de foie, rein et testicule chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

Paramètres		Les lots expérimentaux							
		Te	Sil	Cys	Met	Ni	Ni+Sil	Ni+Cys	Ni+Met
GPx(nmol GSH/mg prot)	F	0,68±0,03	0,66±0,02	0,63±0,02	0,63±0,026	0,58±0,02 ^a	0,65±0,03	0,68±0,02 ^{b1}	0,69±0,01 ^b
	R	0,83±0,02	0,83±0,02	0,84±0,02	0,72±0,01	0,66±0,02 ^{a2}	0,83±0,03 ^b	0,84±0,02 ^{b1}	0,83±0,03 ^b
	T	0,4±0,02	0,38±0,01	0,39±0,02	0,4±0,02	0,27±0,01 ^{a1}	0,39±0,01 ^{b2}	0,37±0,02 ^b	0,38±0,01 ^{b2}
CAT(μmol H ₂ O ₂ /min /mg prot)	F	157,55±3	155,28± 3,11	144,9±4,5	152,1± 2,5	122,7±4,95 ^{a2}	148,2±2,14 ^{b2}	141,87±3,12 ^{ab}	146,27±3,11 ^{b2}
	R	67,58±2,6	62,63±2,64	58,38±2,38	58,88±2,87	53,17±1,96 ^{a1}	58,72±2,2	61,38±3,66	60,03±2,1 ^{b1}
	T	43,8±1,44	43,27±1,76	37,2±2,18	35,83±2,36	30,83±1,24 ^{a2}	40,33±2,2 ^b	37,8±1,83 ^{b1}	37,42±2,5
SOD(U/mg prot)	F	49,95 ±2,6	47,98±2,61	46,52±1,9	47,33±1,9	29,4±1,74 ^{a2}	41,62±2,2 ^b	39,13±2,65 ^b	45,1±2,1 ^{b2}
	R	75,92±1,98	71,28±1,55	68,55±1,63	67,58±2,6	52,2±2,28 ^{a1}	64,4±3,15 ^{b2}	60,3±1,5 ^{ab}	60,07±2,63 ^b
	T	57,27±1,83	55,7±1,91	53,4±2,1	53,6 ± 2,18	37,27±1,95 ^{a2}	46,45±2,17 ^b	44,73±1,57 ^b	43,52±2,31 ^b

^a : Différence significative par rapport au témoin (P≤0,05).^{a1}: Différence hautement significative par rapport au témoin (P≤0,01). ^{a2} : différence très hautement significative (p<0,001).

^b : Différence significative par rapport au lot traité par le Ni (P≤0,05).^{b1}: Différence hautement significative par rapport au lot traité par le Ni (P≤0,01). ^{b2} : différence très hautement significative par rapport au lot traité par le Ni (p<0,001).

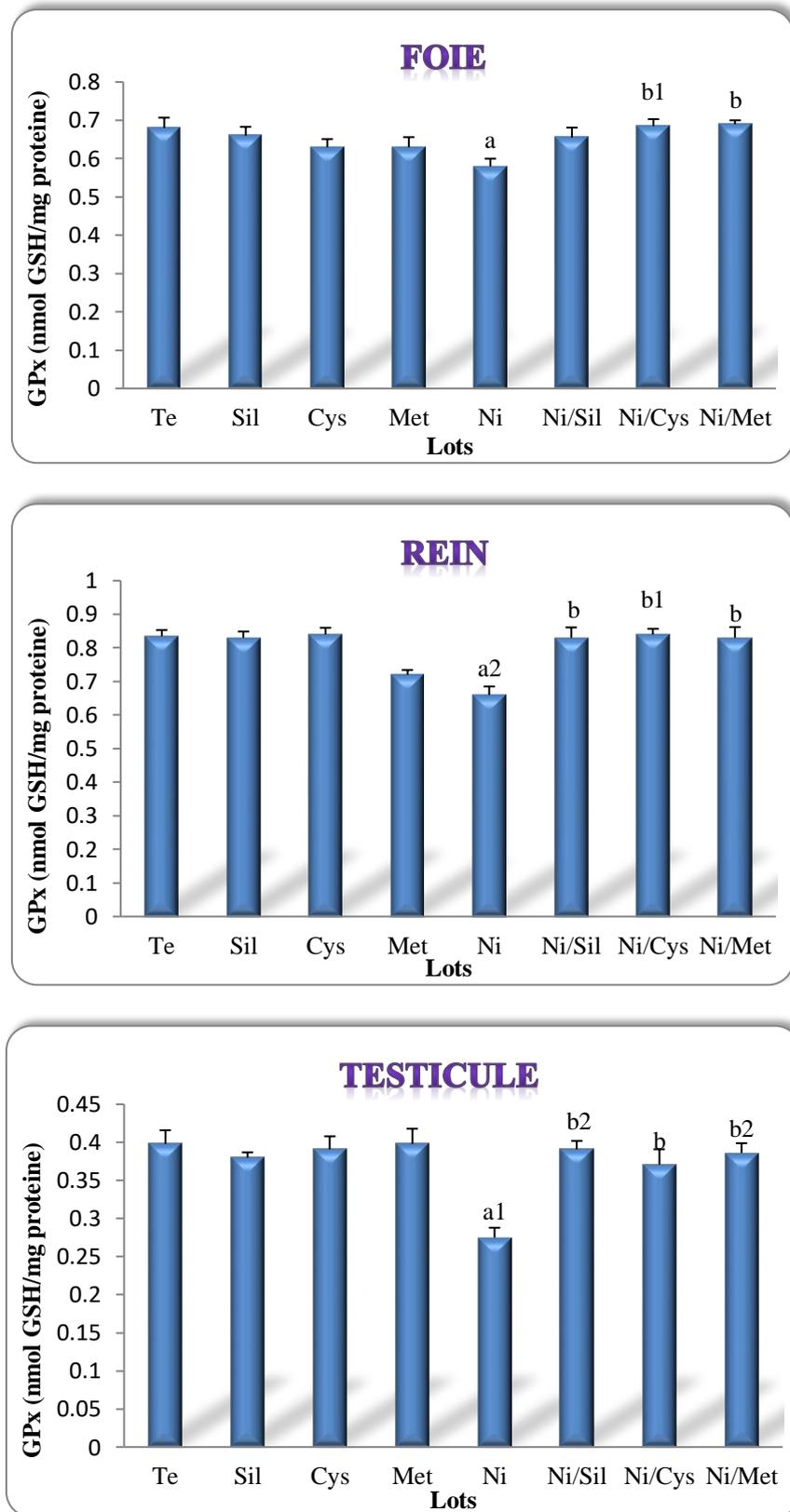


Figure 32: Variation d l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans le foie, le rein, et les testicules, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

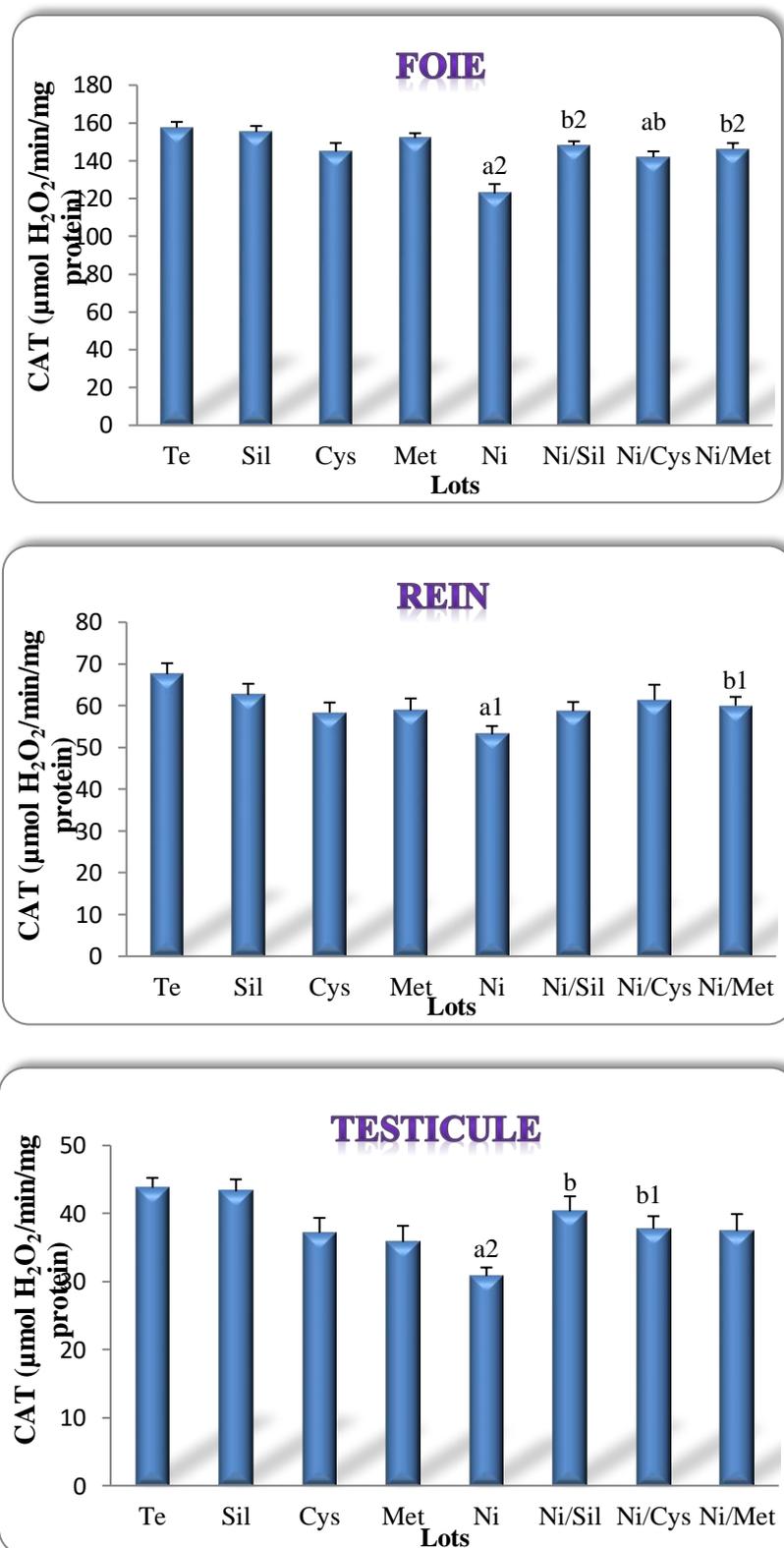


Figure 33: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie, le rein, et les testicules, chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ; ^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

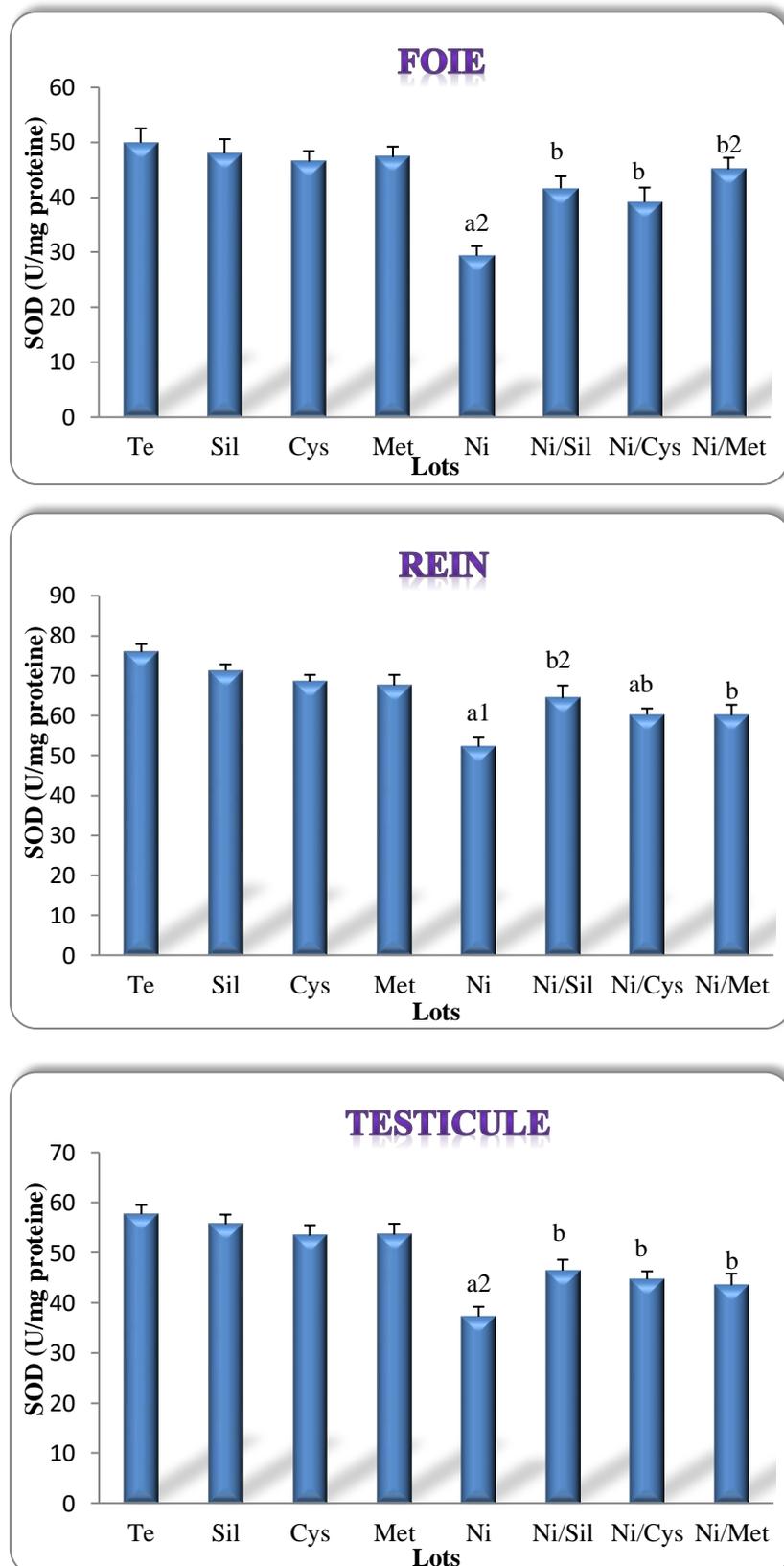


Figure 34: Variations de l'activité de superoxyde dismutase (SOD) au niveau des organes (foie, rein et testicule) chez les lots expérimentaux après 21 jours du traitement.

^a: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{a1}: Différence hautement significative ($p \leq 0,01$), ^{a2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au témoin ; ^b: Différence significative ($p \leq 0,05$), ^{b2}: Différence très hautement significative ($p \leq 0,001$), par rapport au lot Ni.

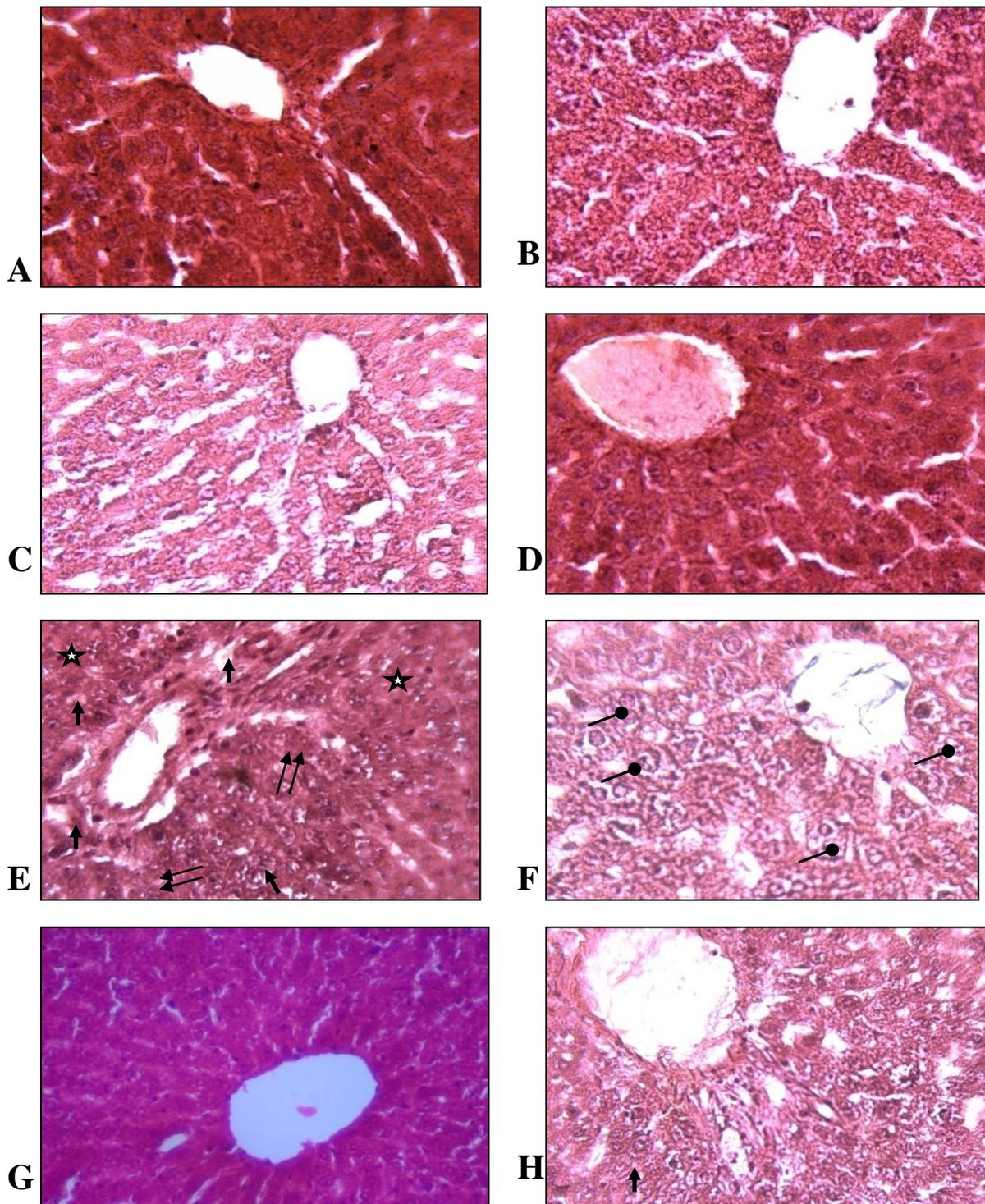
5. Etude histologique :

5.1. Impact sur l'histoarchitecture hépatique

L'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du foie des rats témoins montre une structure normale (Fig. 35; A): le tissu hépatique se présente sous la forme de lobules hépatiques hexagonaux, chaque lobule possède une veine centrale autour de laquelle on trouve des sinusoides (capillaire élargi) et des plaques ou travées d'hépatocytes. On observe une architecture des hépatocytes normale comparable des témoins dans le cas où les rats sont traités uniquement par la silymarine (Fig. 35; B) la cystéine (Fig. 35 ; C) et la méthionine (Fig. 35; D).

Cependant, le traitement au sulfate de nickel induit une dilatation du parenchyme. Une vacuolisation des hépatocytes avec la présence d'une nécrose tissulaire et perte de l'architecture lamellaire et de l'aspect polyédrique habituelle (Fig. 35; E). Les modifications observées chez les groupes traités confirment que le Ni induit une dégénérescence membranaire qui peuvent contribuer à un dysfonctionnement de cet organe.

Ces formes des atteintes tissulaires observés chez les rats traités au nickel sont moins importantes chez ceux traités aux combinaisons Ni+Sil (Fig. 35; F), Ni+Cys (Fig. 35; G) et Ni+Met (Fig. 35; H). On observe également que l'espace sinusoides est diminué par rapport au groupe traité au nickel bien que le modèle lamellaire d'hépatocytes a été restauré à presque normale après un traitement par la silymarine et le nickel avec régénération des hépatocytes (Fig. 35; F).



LH, Lamme hépatocytaire; //, Nécrose hépatocytaire; ↑, Dilatation du parenchyme; ★ perte de l'architecture lamellaire. ●, Régénérescence des hypatocytes.

Figure 35: Observation microscopique des hépatocytes chez les rats témoins (A) et traités par la silymarine (B), cystéine (C), méthionine (D), le sulfate de nickel (E) et les combinaisons ; Ni+Sil (F), Ni+Cys (G) et Ni+Met (H) après 21 jours de traitement (Gr x 400). Coloration à l'Hématéine-éosine.

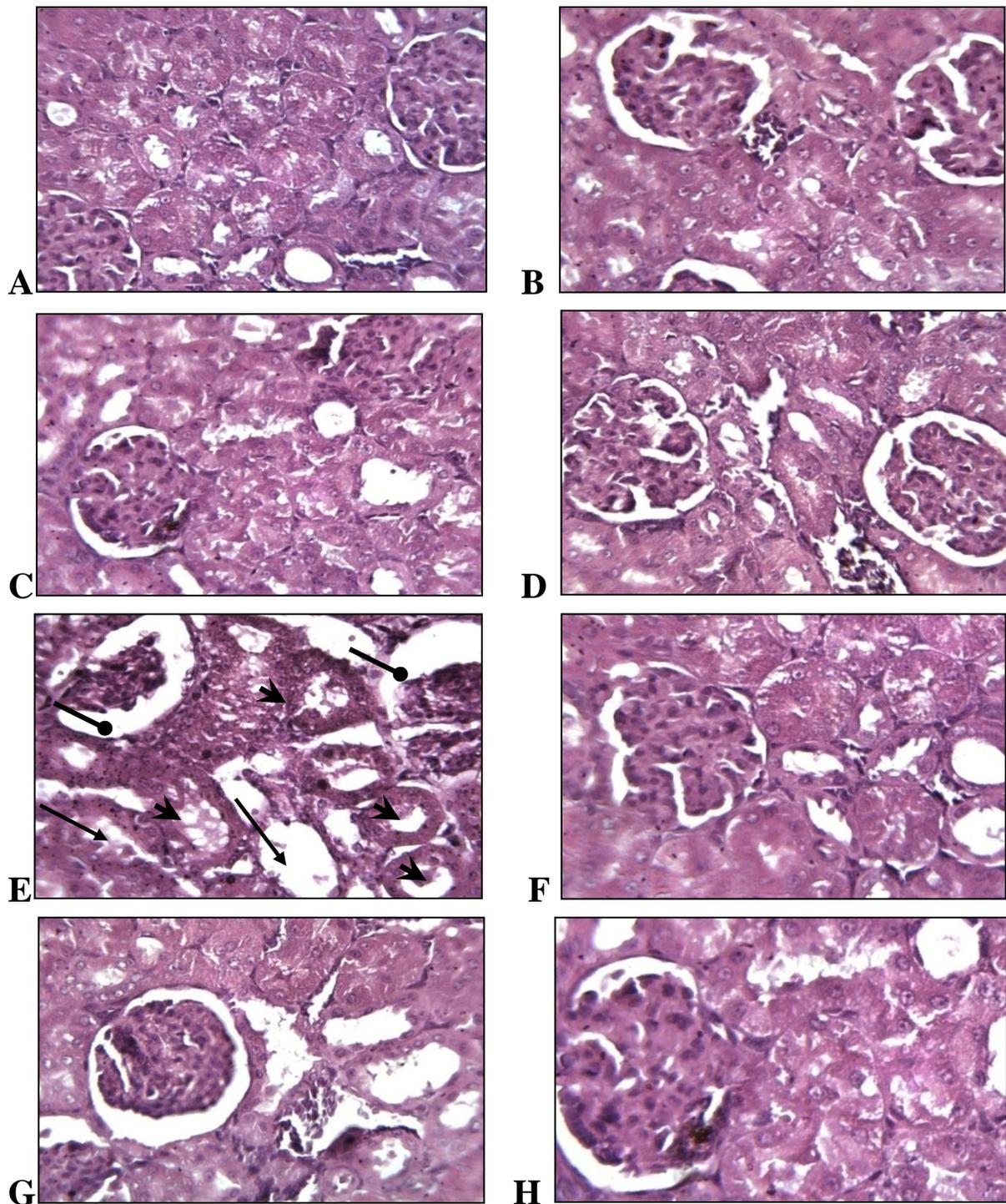
5.2. Impact sur l'histoarchitecture rénale

L'examen histopathologique des reins des rats témoins révèle une histoarchitecture normale caractérisée par des tubules rénaux et des chambres glomérulaires normaux (Fig. 36 ; A). On observe la même architecture chez les lots traités uniquement par Sil, Cys et Met.

Par contre, l'histologie des reins chez les rats traités au nickel, ont montré des altérations structurales de la zone corticale. Les tubes rénaux montrent une légère hypertrophie de certaines cellules épithéliales. D'autres tubules sont bordés par des cellules vacuolisées dégénérées et montrent la présence de débris cellulaire dans leur lumière : signe d'une nécrose tubulaire (Fig. 36 ; E).

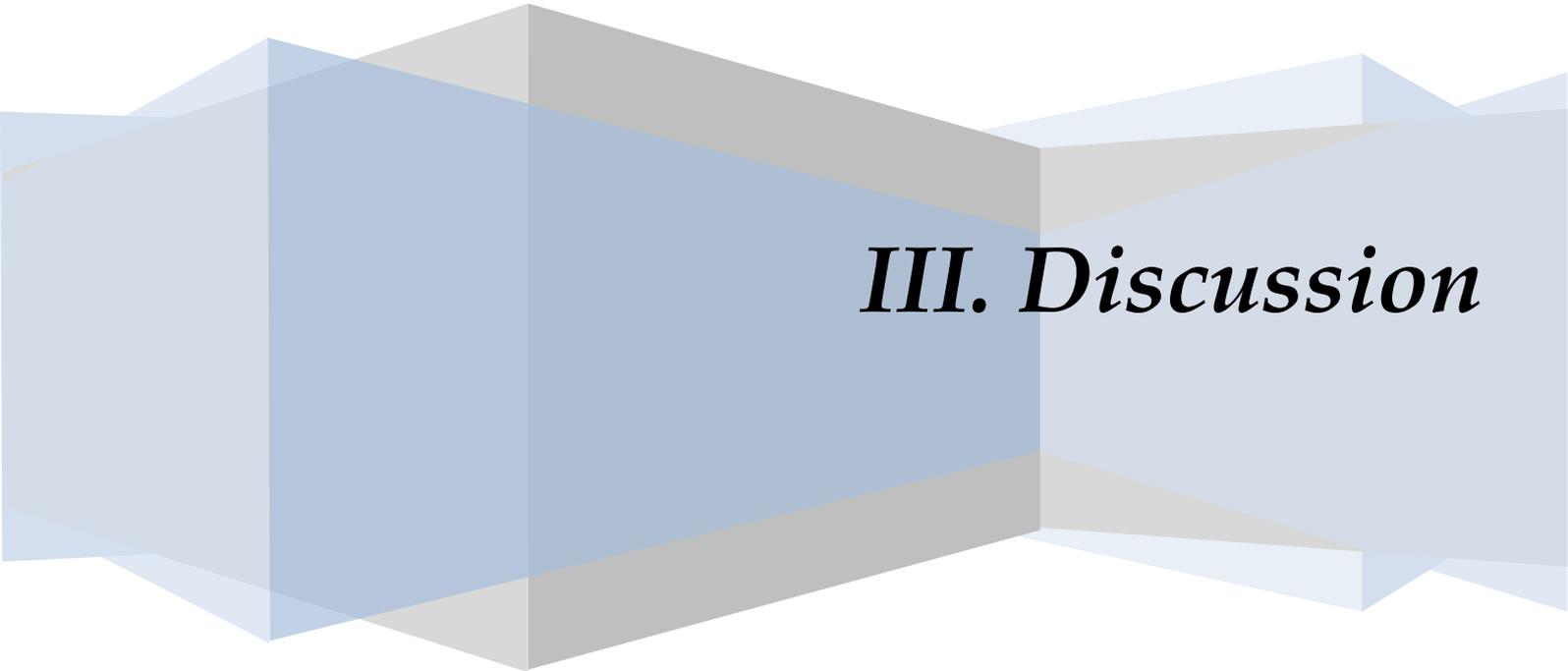
Toutefois, les atteintes rénales sont totalement ou partiellement absentes chez les groupes traités par les combinaisons (Ni+Sil, Ni+Cys et Ni+Met) dans les figures 36 ; F, G, H respectivement. En effet, on observe une architecture normale très comparable à celle des rats témoins (Fig. 36 ; F), en présence du Silymarine, le nickel perd donc ses effets néfastes sur l'histologie rénale.

Cependant, l'histologie du rein chez les rats traités à la combinaison Ni+Cys ou Ni+Met manifeste des dégénérescences tubulaires moins importants (Fig. 36 ; G et H).



↘ Dilatation tubulaire ; ● Espace urinaire élargi ; ➤ Vacuolisation.

Figure 36: Observation microscopique des capsules de Bowman et des tubes rénaux chez les rats témoins (A) et traités par la silymarine (B), cysteine (C), méthionine (D), le sulfate de nickel (E) et les combinaisons ; Ni+Sil (F), Ni+Cys (G) et Ni+Met (H) après 21 jours de traitement (Gr x 400). Coloration à l'Hématéine-éosine



III. Discussion

Le nickel est l'un des métaux lourds qui peut s'avérer gravement toxique, perturbant certains systèmes enzymatiques et également les activités métaboliques chez l'homme et l'animal. Par ailleurs, la toxicité d'un métal pour un organisme peut être modifiée par l'exposition préalable, simultanée, ou consécutive à des antioxydants. Une grande attention, dans ces dernières années, a été portée sur l'utilisation intense des substances naturelles des plantes médicinales, des oligoéléments ou des acides aminés et des vitamines.

Dans ce cadre, cette étude se propose de mettre en évidence, d'une part les effets cytotoxiques du nickel sur certaines fonctions vitales, et d'autre part de vérifier si les extraits de chardon marie et les acides aminés soufrés présentant des effets bénéfiques.

1. Evaluation des effets cytotoxiques de nickel chez les rats: Effets sur certains facteurs de croissance et sur la variation des paramètres biochimiques, hématologiques, histopathologie et le profil du stress oxydant.

La croissance qui assure le développement harmonieux du corps et ses aptitudes fonctionnelles, exige non seulement l'intégrité de toutes les grandes fonctions de l'organisme mais aussi des séries d'adaptations cellulaires et métaboliques d'une grande complexité.

Le suivi de la variation de la masse corporelle des animaux au cours de l'expérience a montré un déficit pondéral après l'administration du sulfate de nickel. Le changement du poids corporel est utilisé comme un indicateur des effets indésirables des composés chimiques. La perte du poids est corrélée à l'état physiologique de l'animal. Ceci est en accord avec les constatations de Dostal (1989) et Mahmoud et ses collaborateurs (2011). Cette réduction du poids peut être expliquée par l'action du nickel sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose et les minéraux essentiels comme le zinc, le magnésium, le fer...) et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par le corps (Kong *et al.*, 2014), aussi par une réduction de la consommation des aliments, un déséquilibre hormonal et la réduction des taux de protéines par suite de toxicité du nickel (Cempel et Janicka, 2002).

En ce qui concerne les effets sur le poids absolu des organes, nous avons remarqué une augmentation élevée au niveau de foie, les reins et les testicules. Ceci peut être due à l'accumulation de nickel dans les organes étudiés ou à l'hypertrophie tissulaire de ces organes causé par ce métal (Leelavinothan et Kasinathan, 2011 ; Li *et al.*, 2015). De plus, le nickel

peut conduire à la mort cellulaire par apoptose de certaines lignées cellulaires, due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides, ces dérivés toxiques induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible (Lee *et al.*, 2016).

L'analyse des paramètres biochimiques a montré une augmentation de la concentration sérique du glucose chez les rats traités au sulfate de nickel par rapport aux témoins. Bien que, l'exposition au nickel soit bien connue pour causer un hypo-insulinémie et une hyperglucagonémie qui semble être responsable d'une hyperglycémie concomitante (Cartana *et al.*, 1992 ; Sanjay *et al.*, 2000). Cette hyperglycémie est due probablement à l'action toxique de ce métal sur le métabolisme des carbohydrates et l'activité endocrine pancréatique par inhibition directe de la production de l'insuline.

Le glucagon et le β -adrénergique entraînent une augmentation de l'AMP cyclique et diminution des niveaux de fructose-2,6-bisphosphate (Pilkis *et al.*, 1988), ce qui induit une activation de la néoglucogenèse et l'inhibition de la glycolyse. De plus, l'accumulation du nickel dans le pancréas perturbe la production et la libération des hormones par les îlots de Langerhans (Bwititi et Ashorabi, 1998). D'autres études ont confirmé que le Ni et ses composés peuvent inhiber la pénétration du glucose dans les tissus adipeux (Jordi et Luis, 1992).

Nous avons constaté une augmentation de la concentration sérique des triglycérides, du cholestérol et des lipides totaux chez les rats traités au nickel par rapport aux témoins. Cette augmentation peut s'expliquer par la dégradation intense des composés lipidiques des tissus adipeux (Cemple et Janicka, 2002). En effet, les triglycérides sont les principaux constituants des membranes cellulaires, l'augmentation de leur concentration est probablement le résultat d'une possible peroxydation lipidique membranaire (Kubrak *et al.*, 2013). Cartana et Arola (1992), ont rapporté un niveau augmenté du glycérol sérique, avec une augmentation similaire des acides gras libres après l'administration du nickel, ce qui est accompagné par une forte action lipolytique de la lipase en présence du glucagon (Schade et Eaton, 1977).

Le dysfonctionnement hépatique est suivi par des niveaux élevés de l'activité enzymatique des (ASAT, ALAT, LDH), qui sont des bio-marqueurs de la fonction hépatique, indiquant la perméabilité et la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane hépatique (Ahmed *et al.*, 1999). Elle se correspond avec nos résultats, qui ont montré des activités augmentées d'AST, d'ALT, d'ALP, et de LDH dans le sérum des rats traités par le nickel. Cette augmentation a suggéré la blessure étendue du foie induite par le Ni à travers la production des radicaux libres

qu'à tour de rôle ont la capacité de causer des dégâts hépatiques qui résultent en infiltration augmentée d'enzymes cellulaires (Pari et Prasath, 2008).

Cette hépatotoxicité est aussi démontrée dans notre étude par une augmentation des taux sériques de la bilirubine totale. Ces résultats sont en accord avec les résultats Pari et Prasath (2008) qui ont suggéré que l'augmentation de la bilirubine sérique constitue un marqueur indiquant clairement le dysfonctionnement hépatique, l'augmentation des concentrations de la bilirubine totale reflète probablement une stase biliaire ou aussi une vésicule biliaire distendue.

En revanche, nous constatons une réduction significative de la concentration des protéines dans le sérum chez les rats traités par le sulfate de nickel. Ceci est expliqué d'une part par le fait que les ions de nickel ont une très grande affinité pour les protéines et les acides aminés possèdent des groupements (SH, OH) et capable d'entraîner des dommages oxydatifs et structurale importantes des protéines (Costa *et al.*, 1994; Kasprzak, 2003). La liaison du nickel avec certaines protéines dans les cellules somatiques peut entraîner des dommages oxydatifs et structurale importantes (Mandava *et al.*, 2009). Il semble aussi que le foie a perdu sa fonction principale de la biosynthèse des protéines, ce qui est confirmé par l'atteinte tissulaire de foie (Das et Dasgupta, 2000).

La lésion cellulaire et l'altération hépatique sont clairement révélées au niveau des coupes histologiques. Chez les rats traités par le nickel, une altération notable de la structure a été observée, ce qui pourrait être dû à la production excessive des radicaux libres. En fait, le nickel a causé une dilatation du parenchyme, et une vacuolisation des hépatocytes. Des changements similaires dans le tissu hépatique chez les rats ont été rapportés par Rao et al. (2009) suite à une intoxication par le nickel. Ces modifications peuvent être les résultats de lésions membranaires induites par le nickel. En effet, il contribue à l'élaboration de divers aspects pathologiques dans les organes cibles, y compris le foie.

Le rein est particulièrement sensible à l'action des toxiques en raison de son intense activité métabolique et de ses multiples fonctions notamment celles d'excrétion et de concentration des xénobiotiques. L'étude de la fonction rénale des rats mâles a montré que le nickel a entraîné une augmentation des taux sériques en l'urée, en créatinine et en acide urique chez les rats traités par le nickel, ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, avec baisse de la filtration glomérulaire. Cette insuffisance rénale a été rapportée par des travaux antérieures par Stengel (1996), Smaoui et ses collaborateurs (2000)

qui ont démontré que l'intoxication par de nombreux métaux lourds (Pb, Cd et Ni) induit un dysfonctionnement tubulaire ou une néphropathie tubulo-interstitielle, qui évolue vers une insuffisance rénale.

Sur le plan clinique, la néphropathie tubulo-interstitielle chronique est diagnostiquée par l'augmentation de l'urée et/ou de la créatinine sanguines, avec protéinurie assez faible (Courrèges *et al.*, 1998). Cette augmentation peut être expliquée par le catabolisme des composés protéiques de corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine (Pari et Amudha, 2011).

Le nickel influence sur l'activité de l'ADN et l'ARN polymérase, provoque ainsi la dégradation intense du matériel génétique, ce qui conduit au catabolisme des bases pyrimidiques et enfin la libération de l'acide urique (Sirover et Loeb, 1976). Ce qui explique l'augmentation de la concentration sérique en acide urique chez le lot traité par le nickel.

L'examen histologique des reins a confirmé ces données biochimiques. En effet, nous avons observé des altérations structurales de la zone corticale avec une vacuolisation et une hypertrophie de cellules épithéliales. Ce qui est en accord avec les travaux de Koizumi (1997) qui ont montré qu'une exposition chronique au nickel induit des altérations des cellules épithéliales des glomérules et une nécrose tubulaire. Ceci est du probablement à la forte accumulation du nickel dans les reins. La nécrose tubulaire a été également obtenue par Weischer et ses collaborateurs en (1980), ils ont observé une dégénérescence granulaire des tubules après inhalation d'oxyde de nickel.

L'hémato-toxicité se manifeste par une diminution des paramètres hématologiques (GR, GB, hémocrite et VGM), suggère que le traitement par le Ni a entraîné une anémie de type microcytaire. Ces changements peuvent être le résultat d'agressions radicalaires induit par le nickel sur les érythrocytes, l'oxydation des composés constitutifs conduit à une diminution des cellules, se qui traduit par l'induction d'une anémie (Bouchoucha *et al.*, 2013). Selon d'autres travaux, la toxicité du Ni a une action négative sur l'érythropoïèse puisqu'elle entraîne une diminution de la production d'hématie ce qui déclenche des anémies sévères (Leach *et al.*, 1985). Uthus et Paellot (1996), ont démontré, que le nickel inhibe la synthèse et augmente la dégradation de l'hème par induction de l'hème-oxygénase dans les reins et le foie. De plus, on a enregistré une diminution de taux d'hémocrite chez les rats traités par rapport aux témoins, même résultats trouvés dans l'étude de Jerry (2008), après l'addition du

Ni aux rats carencées au zinc, cette diminution pourrait être due à la diminution de taux d'hémoglobine et la compte d'érythrocytes.

Ainsi Maines et Kappas (1977), ont montré que le nickel diminue l'activité de l'ALA synthétase (l'acide delta amino-levulinique). Cette enzyme joue un rôle important dans le mécanisme de synthèse d'hémoglobine et par la suite dans le processus érythropoïétique. La diminution du nombre de Gb est associée à l'inhibition de la maturation des globules blancs induite par le Ni, ou à son effet cytotoxique direct sur les cellules souches hématopoïétiques entraînant ainsi une diminution du nombre d'érythrocytes, de leucocytes et de plaquettes (Tikare *et al.*, 2013).

La peroxydation lipidique est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques cause des changements dans la structure et la fonction membranaires et mène à la diminution de la fluidité de la membrane et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires. Les dérivés de la peroxydation lipidique continuent d'être les composés les plus étudiés en recherche sur le stress oxydant.

Suite à une injection intraperitonéale de 20 mg de sulfate de nickel /kg p.c, nous avons détecté une augmentation de dialdéhyde malonique (MDA) produit de scission des peroxydations lipidiques au niveau des tissus hépatique, testiculaire et surtout rénale, étant donné que le nickel s'accumule le plus au niveau des reins où il induit des lésions au niveau des glomérules (Sunderman, 1977).

De même, ceci est confirmé par les travaux de Misra (1992) et Sun et ses collaborateurs (2016). Il a été démontré également par Obone et ses collaborateurs (1999) qu'il existe une corrélation positive entre la toxicité du nickel et le taux de peroxydation lipidique des tissus. Par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, le Ni induit la génération de radicaux OH° qui sont très réactifs avec les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires (Cempel et Nikel, 2006).

Le Ni agit également en diminuant le taux de GSH intracellulaire qui est un piègeur de radicaux libres. Il peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase qui assure l'élimination des lipides peroxydés (Satsangi et Dua, 2000). Il forme la première ligne de défense en agissant comme un antioxydant non-enzymatique par interaction directe de son groupe du soufre avec ERO. Le Ni se lie exclusivement au pôle (SH) du GSH chargé à son inactivation, ce qui

favorise la peroxydation lipidiques et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésions tissulaires importantes dans les différents tissus (Pari et Prasath, 2008 ; El-Demerdash *et al.*, 2012).

Les cellules possède d'autres système de défense antioxydant incluent des enzymes comme la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase. Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de ces enzymes dans le foie, le rein et le testicule chez les rats traités par Ni. Notre étude a été confirmée par les travaux de Misra *et al.* (1990) et Boulila *et al.* (2014).

La Catalase est un composant majeur dans le système enzymatique d'antioxydant fondamental qui catalyse la décomposition de H₂O₂ à H₂O et O₂ et partager cette fonction avec la glutathione peroxydase (GSH-Px) (Valko *et al.*, 2006) qui est besoin du GSH et du sélénium pour fonctionner correctement, son role principale et d'éliminer les peroxydes lipidiques résultants de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Les niveaux de ces antioxydants peuvent fournir une indication claire sur l'ampleur de dégât cytotoxique qui se produit dans plusieurs tissus. D'autre part, la diminution des activités des enzymes antioxydants peut être dû au direction du ce métal de se lier au site actif des enzymes ou à leur usage augmenté d'ébouer des radicaux libres induit par le métal donc causer l'inhibition irrévocable dans leur activités (Ihechiluru *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

II. Activité antioxydante du *Silybium marianum* contre la toxicité de sulfate de nickel: étude in vivo; exploration des fonctions vitales et du statut oxydant

Dans une autre partie de notre étude, l'administration de l'extrait méthanolique du *Silybium marianum* aux rats traités au sulfate de nickel provoque une amélioration de la masse pondérale et du poids absolu et relatif des organes chez les rats traités. Ceci pourrait être du à la réduction de la production des radicaux libres induite par les antioxydants qui pourrait s'expliquer par les qualités alimentaires et médicinales de cette plante et leur effet bénéfique sur la croissance générale (Chtourou *et al.*, 2012 ; Prashant *et al.*, 2014). En effet, elle possède la capacité à réguler la perméabilité membranaire et d'accroître la stabilité des membranes, en présence de dommages induits par des xénobiotiques, elle peut contrôler aussi la perte protéique et favorisant la régénération du tissu hépatique par le fait qu'elle stimule la synthèse des protéines dans le foie endommagé. Les résultats sont en accord avec ceux

publiés par Abid-Ali et ses collaborateurs (2015) qui ont montré l'effet protecteur d'un extrait du chardon-marie sur l'intoxication par le chlorure de nickel chez des lapins. Les pertes de poids sont moindres chez le témoin normal traité au extraits de chardon-marie ce qui pourrait justifier l'innocuité de cette plante.

Dans la présente étude, nous avons constaté que l'extrait de la silymarine a pu jouer un rôle crucial dans la baisse de la concentration sérique de glucose. Les travaux de Soto et ses collaborateurs (2004) ont montré que l'administration de silymarine, pouvait réduire le glucose sérique et la lipoperoxydation pancréatiques. Aussi peut augmenter le taux d'insuline sérique, des enzymes antioxydantes, de glutathion, et récupérer la structure et le fonctionnement du pancréas (Zeynab et Shereen, 2014 ; Gad et El-Maddawy, 2016). La silymarine peut être considérée comme un potentiel médicament pour le traitement du diabète (Kren *et al.*, 2005). Dans l'étude de Velussi *et al.* (1997), ils ont montré l'efficacité de traitement à long terme par la silymarine pour réduire la lipoperoxydation et la résistance à l'insuline chez les patients diabétiques atteints de cirrhose. Cette amélioration de la résistance à l'insuline est grâce à une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques (Shulman *et al.*, 2007 ; Deshmukh *et al.*, 2014). De plus, la silybin possède un effet chimioprotecteur et peut améliorer la fonction pancréatique après exposition à des agents toxiques (Kren *et al.*, 2005).

Le traitement par la silymarine à améliorer les paramètres du bilan lipidique, ce résultat a été confirmé par un grand nombre de travaux de recherche qui ont montré l'effet hypolipidémique de silymarine (Hayder *et al.*, 2012 ; Poruba *et al.*, 2015). Abid-Ali *et al.* (2015), ont montré que le traitement par l'extrait du chardon marie provoque une diminution du taux du cholestérol et des triglycérides chez des lapins traités par le chlorure de nickel. La silymarine réduit l'absorption intestinale du cholestérol et possède un effet hypocholestérolémiant chez les rats nourris avec un régime de cholestérol élevé, et entraîne une diminution significative dans le LDL, VLDL, le cholestérol et le TG dans le foie et une augmentation de HDL (Sobolova *et al.*, 2006 ; Sayin *et al.*, 2016). En plus, l'inhibition de la 3-méthyl glutaryl coenzyme A réductase, une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol, par la silybin a été démontrée *in vitro* (Metwally *et al.*, 2009), ce qui implique son possible influence directe sur la biosynthèse hépatique du cholestérol.

D'après les résultats obtenus, l'administration concomitante des extraits et du sulfate de nickel a réduit de manière significative l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASAT, LDH

et ALP. Cela révèle la capacité de chardon marie d'atténuer les lésions hépatiques induites par le nickel. L'extrait de silymarine peuvent stabiliser la membrane hépatique et diminuer la fuite des enzymes vers le plasma dans une intoxication par le nickel, l'acetaminophene et le CCl₄ (Abid-Ali *et al.*, 2015; Hamza et Al-Harbi, 2015; Eldemerdash *et al.*, 2016), cet effet hépatoprotecteur des extraits de silymarine est prouvé évidemment dans d'autres travaux pour traiter diverses maladies et dysfonctionnements du foie, y compris la cirrhose alcoolique, l'hépatite ainsi que des problèmes hépatiques liés au diabète (Greenlee *et al.*, 2007 ; Tamayo et Diamond, 2007).

Par ailleurs, le co-traitement avec la silymarine aide à élever le contenu des protéines, il l'apport presque aux limites normales. Plusieurs études ont montré que la silymarine peut stimuler l'ARN polymérase ribosomique et la synthèse des protéines qui aide à régénérer les hépatocytes (Sonnenbichler et Zetl, 1986 ; Gruenwald, 2004). Cette action a une incidence thérapeutique importante dans la réparation des hépatocytes endommagés et la restauration des fonctions normales du foie (Morazzoni et Bombardelli, 1995). De façon surprenante, la silybine agit sur la synthèse des protéines seulement lorsque le foie a subi des lésions (Sonnenbichler et Zetl, 1986). De plus, F'eher et Lengyel (2012) ont constaté que la silymarine protège le foie de trois façons: en améliorant l'ADN polymérase, en stabilisant la membrane cellulaire et en éliminant les radicaux libres.

L'administration des extraits du *Silybium marianum* a amélioré la fonction rénale des rats intoxiqués par le nickel. L'effet protecteur de l'extrait a été reflété par les changements des concentrations sériques de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique. Montrant ainsi la capacité de cette plante à protéger contre les dommages rénaux induits par le sulfate de nickel. Ce résultat peut être dû soit à l'activité antioxydante remarquable de cette plante qui a été révélée par plusieurs études contre ; le cisplatine (Karimi *et al.*, 2005), le plomb (El-Khishin *et al.*, 2015), le mercure (Oda et El-Ashmawy, 2012) et l'adriamycine (El-Shitany *et al.*, 2008), soit à ces actions bénéfiques au niveau des reins pour réduire la réactivité des ROS générés par le nickel dans les tubules proximaux du rein (Ahmed *et al.*, 2015).

La silymarine est considéré comme efficace pour restaurer les valeurs des paramètres hématologiques dans le lot de combinaison, démontrant ses propriétés antioxydantes qui peut être dû à ses propriétés de stabiliser la membrane cellulaire, bien que l'inhibition de la peroxydation lipidique. Les extraits de chardon-marie augmentent le glutathion et l'activité des enzymes superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase dans les globules rouges, et

normalisent l'activité ralentie de la SOD et l'immuno-réactivité altérée dans les lymphocytes de patients atteints de cirrhose alcoolique du foie (Zeynab et Shereen , 2014 ; Gad et El-Maddawy, 2016). Des résultats similaires ont été enregistrés chez des lapins ayant reçu le chlorure de nickel, dans l'eau de boisson (Abid-Ali *et al.*, 2015) et chez des rats contre l'intoxication par l'arsenic, manganèse et le plomb (Jain *et al.*, 2011 ; Chtourou *et al.*, 2013 ; Jalali *et al.*, 2017). Une étude menée par Karimi et ces collaborateurs (2011) semble montrer un effet protecteur de la silymarine vis-à-vis l'hémolyse des globules rouges induite par 2, 2'-azobis (2-amidinopropane)(AAPH), un générateur de radicaux hydrosolubles, elle a augmenté le temps de retard de l'hémolyse et stabilisé la membrane cellulaire en réduisant le taux et la teneur totale en glutathion dans les érythrocytes. Il a également diminué la concentration de radicaux peroxydés dérivés de l'AAPH.

Nos résultats montrent que le traitement avec la silymarine fait diminuer le taux du MDA avec une nette amélioration de glutathion et des activités des enzymes antioxydantes au niveau des organes étudiés (foie, reins, testicules). L'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires par le chardon-marie a été démontrée chez le rat sur des hépatocytes, des érythrocytes et des membranes microsomiales (Bosisio *et al.*, 1992 ; Carini *et al.*, 1992). Mira et ces collaborateurs (1994) ont montré *in vitro* que la silibinine réagit avec les espèces réactives de l'oxygène, notamment avec les radicaux hydroxyles OH° et peroxyde ainsi que l'acide hypochlorique HOCl, ils ont aussi montré une inhibition de la peroxydation des lipides membranaires. La silymarine et de la silybinin semblent, en outre, exercer leur activité antioxydante non seulement en neutralisant les radicaux libres mais également en influant sur le système enzymatique associé au glutathion. Elles augmentent l'activité des enzymes superoxyde dismutase ainsi que celle de la glutathion peroxydase dans les globules rouges, le foie, les reins, l'intestin et l'estomac (Valenzuela *et al.*, 1989; Kiruthiga *et al.*, 2007). Une autre propriété intéressante de la silybine et de la silymarine est qu'elles interviennent dans la régulation du contenu en glutathion de différents organes. Il a ainsi été montré que la silymarine peut augmenter les niveaux de glutathion de 35% dans le foie des rats, cette augmentation se produit de façon sélective dans différents organes (Pradeep *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2015).

Par ailleurs, Nous avons observé une restauration des activités des enzymes antioxydantes (GSH-Px, CAT et SOD) chez les rats traités par le nickel après la co-administration du silymarine, ce qui suggère l'effet protecteur de cette plante contre les

dommages oxydatifs induits par le nickel. L'augmentation des activités des enzymes antioxydantes peut servir de mécanisme de compensation supplémentaire pour maintenir l'intégrité de la cellule et la protection contre les dommages des radicaux libres. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes démontrant l'effet de neutralisation des radicaux libres et l'action inhibitrice de la silymarine sur la production des ERO dans le foie et les reins en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes (Oda et El-Ashmaw, 2012 ; Ahmad *et al.*, 2013 ; El-Khishin *et al.*, 2015).

Ces modifications biochimiques sont corrélées avec l'étude histopathologique du foie des rats témoins et traités. L'histologie hépatique chez les rats traités par la combinaison de sulfate de nickel et les extraits du *Silybium marianum* a montré une atténuation des altérations histologiques induites. La silymarine agit de façon directe sur les hépatocytes, rendant plus difficile l'absorption de toxines, stimulant leur élimination et favorisant la régénération du tissu hépatique par le fait qu'elle stimule la synthèse des protéines dans le foie blessé. Elle possède également de puissantes propriétés anti-radicalaires, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions au foie (Sabiou *et al.*, 2015 ; Eldemerdash *et al.*, 2016).

En plus, les atteintes rénales observées suite à l'administration de sulfate de nickel sont totalement absentes chez le groupe traité par l'extrait du *Silybium marianum*, en effet, on observe une architecture normale très comparable à celui des rats témoins, d'où leurs effets protecteurs. Nos observations s'accordent avec celles de El-Shitany *et al.* (2008) ; Abdel-Gawad et Mohamed (2010) ; Kabel *et al.* (2013) ; Amien *et al.* (2015), qui ont démontré que la silymarine accélère l'élimination des toxines du foie et des reins. Selon Abdel-Gawad et Mohamed (2010), la silymarine pourrait aider les cellules à prévenir la réponse au stress via la stabilisation du potentiel de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome C tous ces facteurs favorisent la survie et la régénération du tissu rénal.

III. Effets de la L-méthionine et de la L-cystéine contre la toxicité de sulfate de nickel: étude in vivo; exploration des fonctions vitales et du statut oxydant

Les acides aminés contenant du soufre jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des systèmes cellulaires en influençant l'état redox cellulaire et la capacité à détoxifier les composés toxiques. L-met et L-cys sont les deux principaux acides aminés contenant du soufre chez les mammifères, avec une multitude de protéines, la L-cys et L-met

sont des précurseurs du glutathion, qui est considéré comme pivot pour la désintoxication et contre le stress oxydatif cellulaire (Dröge, 2005).

La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat. L'addition de L-met ou L-cys aux rats traités par le nickel a engendré une amélioration de la croissance corporelle et du poids relatif des organes par rapport au groupe de Ni, ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres induite par les antioxydants. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Baker et Czarnecki-Maulden (1987) qui ont démontré aussi une amélioration de la croissance après la supplémentation du L-cys à des intoxications par le cuivre, le cobalt, le sélénium et l'arsenic. Les chercheurs ont constaté que la méthionine est également l'un des trois acides aminés nécessaires pour fabriquer du monohydrate de créatine, un composé essentiel pour la production d'énergie et le renforcement musculaire. Les faibles niveaux de méthionine peuvent ralentir la croissance et le développement normaux (Selvam et Kurien, 1992)

Dans une étude antérieure, l'administration de L-met chez des rats en bonne santé a provoqué un gain de poids significatif, attribué à l'augmentation de la consommation alimentaire/magasins de graisse viscérale ou à une diminution des dépenses énergétiques (Adejoke *et al.*, 2016). De même, les travaux d'Onaolapo et ses collaborateurs. (2016) ont montré que le traitement par L-met provoque une amélioration du gain de poids corporel après l'intoxication par l'acetaminophene.

Les rats des groupes L-cys et L-met présentent une stabilisation du poids par rapport aux témoins, et atteignent un poids moyen supérieur à celui des rats Ni. Les résultats de poids corporel sont en accord avec ceux publiés par Sawamoto *et al.* (2003) qui ont constaté qu'un traitement de quatre semaines par L-cys avec une dose journalière i.v de 100 ou 300 mg/kg provoque une augmentation significative du poids corporel. Cependant, des doses plus élevées de L-cys (1000 mg/kg) ont provoqué une suppression importante du gain de poids.

Par ailleurs, dans le cas des maladies avec une diminution du GSH tissulaire et une augmentation de l'oxydation, l'administration excessive de méthionine, a induit une perte de poids corporel due à une diminution du rapport d'efficacité de l'azote chez les rats, et la raison de cette diminution a été expliquée comme un effet du déséquilibre des acides aminés (Benevenga et Steele, 1984).

La supplémentation des AAS chez les rats traités par le nickel à un effet bénéfique sur la glycémie. L'administration des AAS a baissée d'une manière significative la concentration sérique de glucose après la troisième semaine du traitement par le nickel. La supplémentation en acides aminés devient une thérapie adjuvante importante dans le traitement du diabète et ses complications associées (Manna et Jain, 2013). De nombreuses études rapportent l'altération de métabolisme des acides aminés dans le diabète et leur rôle dans la modulation du métabolisme du glucose et de la sensibilité à l'insuline (Tremblay *et al.*, 2007; Caso et McNurlan, 2010).

Les effets potentiels de l'apport d'acides aminés sous forme de supplémentation ont déjà été testés chez des patients diabétiques. Les premiers résultats sont encourageants allant dans le sens d'une réduction de la résistance à l'insuline et du taux d'hémoglobine glyquée. Cet effet peut être dû à une action directe des acides aminés sur la sensibilité des cellules à l'insuline ou à l'augmentation de l'anabolisme des cellules musculaires (Solerte *et al.*, 2004).

La L-cystéine a une action analogue à l'insuline favorisant l'entrée de glucose dans des cellules adipeuses au moyen de son groupe sulfhydryle libre. Il a également été rapporté d'avoir un effet protecteur sur les cellules pancréatiques (Dröge, 2005 ; Salman *et al.*, 2013) et de réduire le stress oxydatif et la résistance à l'insuline induite par le fructose chez le rat (Song *et al.*, 2005). Une diminution des taux sanguins de L-cystéine et une altération de l'homéostasie de cystéine ont été signalés chez des diabétiques humains (Sekhar *et al.*, 2011).

Ammon *et al.* (1986) a rapporté que l'addition de L-cystéine au milieu de culture potentialise la libération d'insuline induite par le glucose dans les îlots pancréatiques isolés à partir des rats femelles. L'apport alimentaire de protéines de lactosérum et d' α -lactoalbumine (protéines riches en cystéine) abaisse le stress oxydatif et la résistance à l'insuline induite par le saccharose chez les rats (Blouet *et al.*, 2007).

Manna et Jain (2013) ont suggéré un nouveau mécanisme par lequel la L-cystéine peut améliorer le contrôle de la glycémie. En utilisant un modèle de cellules adipocytaires, ils ont démontré que le sulfure d'hydrogène (H_2S), ou son précurseur-L-cystéine, augmente le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate cellulaire (PIP3) qui joue un rôle central dans la signalisation de l'insuline et dans le maintien de l'homéostasie glycémique. En outre, le traitement par la L-cystéine a augmenté la phosphorylation du substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS1), l'activation du transporteur de glucose 4 (GLUT4) et l'utilisation du glucose dans des cellules traitées au glucose. Diverses études ont démontré que la supplémentation en

L-cystéine abaisse le stress oxydatif, l'inflammation vasculaire et les marqueurs de glycémie chez les animaux normaux ou diabétiques (Jain *et al.*, 2009) et chez les sujets diabétiques de type 2 et les sujets normaux (Sekhar *et al.*, 2011).

Le supplément de la cystéine à un régime des gents âgés pour corriger la carence en GSH a permis d'améliorer l'oxydation des acides gras libres altérées et de diminuer la résistance à l'insuline (Nguyen *et al.*, 2013). De plus, la cystéine favorise le maintien de la structure des protéines contre l'oxydation par des ERO facilitant les fonctions des récepteurs des lipoprotéines et améliorant l'absorption cellulaire des lipides sériques du sang (Diniz *et al.*, 2006).

En outre, le traitement avec les AAS a montré une diminution significative des concentrations sériques du cholestérol et des triglycérides. Il a été rapporté que la L-Met, en tant qu'agent lipotrope, ayant pour effet d'aider le foie à se débarrasser de triglycérides accumulés, soit par la sécrétion de lipoprotéines VLDL, soit par le catabolisme des acides gras et/ou du cholestérol (Al-Masri, 2012), elle peut limiter l'excès de graisse dans le foie et réduire le taux du cholestérol en stimulant la production de lécithine du foie, à son tour, la lécithine se fixe sur les triglycérides, permettant soit leur dégradation dans le foie, soit leur élimination hors du tissu hépatique.

D'après Taniguchi (2008), le taux de cholestérol sérique a été considérablement amélioré par la supplémentation du L-met, chez des rats nourris avec un régime de cholestérol élevé. Un régime élevé de méthionine a permis de réduire le taux de cholestérol HDL sérique chez les souris en diminuant la production de cholestérol HDL (Velez-Carrasco *et al.*, 2008).

En outre, l'ASAT, l'ALAT, la LDH et la bilirubine sont les biomarqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité, car ils sont cytoplasmiques et libérés dans la circulation après l'atteinte cellulaire (Soudani *et al.*, 2011). D'après les résultats obtenus, l'administration concomitante du L-cys/L-met et du sulfate de nickel a réduit de manière significative l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASA, l'ALP et la LDH. Cela révèle la capacité de ces AAS administrées simultanément avec le nickel d'atténuer les lésions hépatiques induites par ce dernier.

Plusieurs études antérieures ont montré l'effet hépatoprotecteur des AAS contre la toxicité hépatique induite par l'arsenic, le cisplatine, le paracétamol et le thioacetamide avec diminution significative des niveaux d'ALAT, d'ASAT, d'ALP et la bilirubine totale (Nagib,

2013; Nada *et al.*, 2015). L'effet protecteur du méthionine et la cystéine contre les lésions hépatiques provoquées par le CCl₄ ont été aussi démontré par plusieurs travaux (Wang *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 2000 ; Al-Masri, 2012). Il est bien connu que la méthionine, ou la cystéine, peut servir de ERO scavenger et avoir la capacité de se protéger contre la peroxydation lipidique, qui peut provenir de sa capacité antioxydante soit en contrecarrant directement avec ERO (Stadtman *et al.*, 2003), soit en améliorant la synthèse des antioxydants endogènes tels que le GSH et la taurine (Metayer *et al.*, 2008).

En augmentant les taux de glutathion, la méthionine aide le foie à neutraliser efficacement les toxines en outre, son influence bénéfique sur l'image morphologique du foie qui suggère que la méthionine agit comme antioxydants et peuvent être efficaces pour inverser les changements toxiques (Stawiarska-Pieta *et al.*, 2012 ; Onaolapo *et al.*, 2017), et cela peut expliquer nos résultats qui révèlent un recouvrement ultérieur vers une normalisation presque similaire à celle du groupe de contrôle normal dans l'ALAT, ASAT, ALP, LDH et bilirubine totale sériques. En ce qui concerne l'examen histopathologique des hépatocytes de ce groupe a montré une amélioration marquée avec moins de lésions tissulaires, la méthionine a atténué tous les changements biochimiques induits par le nickel, en empêchant soit l'épuisement du GSH, soit la liaison aux groupes protéines sulfhydrile (Huang *et al.*, 2008).

Le traitement des rats avec la L-met et L-cys n'a montré aucun changement ou altération de la fonction rénale. En revanche, l'administration L-met et L-cys a amélioré partiellement la fonction rénale des rats intoxiqués par le sulfate de nickel. L'effet protecteur du la L-met et du la L-cys a été reflété par la diminution des concentrations sériques de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique, montrant ainsi la capacité de ces AAS à protéger contre les dommages rénaux induits par le nickel. Des études précédentes avaient démontré l'activité importante des AAS à lutter contre le stress oxydant, et piéger les radicaux libres (Nandi *et al.*, 2005; Nada *et al.*, 2015). Cette activité de piégeage de radicaux libres pourrait être efficace pour protéger la fonction rénale et réduire la réactivité des ERO générés de la réduction du nickel dans les tubules proximaux du rein. La L-met a été démontrée comme efficace pour réduire les effets secondaires toxiques induits par le cisplatine dans divers systèmes animaux modèles (Basinger *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2001) et même son isomère D-méthionine (Sooriyaarachchi *et al.*, 2014), ainsi que la L-cys (Eldaly, 1996). Derakhshanfar (2009) et Onaolapo et ses collaborateurs. (2016) ont également démontré l'effet protecteur du L-Met contre la toxicité induite par la gentamicine et l'acétaminophène en diminuant les

concentrations sériques de la créatinine, de l'urée et atténué les altérations histologiques rénale. Les paramètres biochimiques sont corrélés également avec l'étude histologique rénale. La co-administration du L-met ou du L-cys avec le sulfate de nickel chez les rats a atténué les altérations histologiques induites par le nickel, cela peut être attribué à l'efficacité anti-radicalaire de ces AAS.

L'analyse des paramètres hématologiques dans notre étude montre que le traitement par la combinaison du L-met ou L-cys avec le nickel a révélé l'effet protecteur de ces AAS contre l'action néfaste de ce métal sur le phénomène de l'hématopoïèse. Des résultats similaires ont été rapportés par Caylak et ses collaborateurs. (2008) et Abdel-Kader et ses collaborateurs. (2011) chez des rats suite à une intoxication par le plomb après la supplémentation du L-met.

L-cys a été signalé pour protéger les érythrocytes humains contre l'hémolyse (Eldaly, 1996). Le traitement des rats avec L-met ou L-cys n'a montré aucun changement ou altération dans les paramètres hématologiques a une dose de 100 mg/kg pc (Sawamoto *et al.*, 2003). Il a été suggéré qu'un des facteurs importants responsables de l'anémie induite par l'administration excessive de la méthionine, est une réduction de la biosynthèse de la globine résultant du déséquilibre des acides aminés (Yokota *et al.*, 1979). L'hypertrophie et le dépôt de fer dans la rate ont été décrits dans l'anémie induite par la L-méthionine (Benevenga et Steele, 1984).

Plusieurs composés de thiol sont connus pour être efficaces dans le traitement de l'empoisonnement par des composés métalliques tels que le cadmium, le mercure, le plomb et l'arsenic. Le mécanisme supposé étant suggéré pour être conjugué avec des métaux puis l'élimination du tissu cible comme composés thiol (Graziano *et al.*, 1985). Le composé mono-thiol, la cystéine, a également semblé avoir des effets protecteurs contre les agents hépatotoxiques tels que le tétrachlorure de carbone et le bromobenzène (Kim *et al.*, 1997).

Nos résultats montrent que le traitement à la cystéine et à la méthionine fait diminuer le taux du MDA et restaurer le GSH et les activités GSH-Px, CAT et SOD au niveau des organes étudiés, telle que rapportée par Nagib (2013), Al-Masri (2012), et il a réduit la susceptibilité de la peroxydation lipidique par la restauration du niveau de piègeurs de radicaux libres. Les AAS pourraient empêcher l'altération induite par le nickel, empêchant ainsi la poursuite des dommages provoqués par ce métal. Selon Reed et Orrenius (1997), l'effet antioxydant de la L-méthionine est plus important que la L-cystéine, de fait que le premier est facilement absorbée par les hépatocytes pour la synthèse directe du glutathion qui

protège les cellules des dommages oxydatifs et joue un rôle essentiel dans la désintoxication des radicaux libres (Nandi *et al.*, 2008).

L'interprétation du rôle de L-cys ou L-met, est la présence d'un groupe sulfhydryle qui lui donne le potentiel de fonctionner comme agent chélatant (Shackebaei *et al.*, 2005), les groupes thiol dans la cystéine ont contribué à la chélation de Cd et Ni (Tandon *et al.*, 2003), et l'arsenic du tissu par la synthèse des acides biliaires, ce qui facilite l'élimination du complexe arsenic-soufre du foie (Quig, 1998), c'est peut-être la raison de son efficacité supérieure dans le foie et les reins que les autres tissus (Nandi *et al.*, 2008). L-cys diminue TBARs et augmente l'activité des enzymes antioxydantes chez les rats traités par la cisplatine (Ahmed *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2015). Le groupe thiol de la méthionine peut chélater le plomb des tissus (Patra *et al.*, 2001) et réduit la susceptibilité à la peroxydation lipidique par la restauration du niveau de piègeurs de radicaux libres (Selvam et Kurien 1992).

Elle peut en outre agir comme un agent piègeur de radicaux et peut éliminer directement les ERO telles que le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène, ce qui peut provoquer l'oxydation de la méthionine, et former du sulfoxyde de méthionine, en tant qu'agent d'acides aminés libres ou résidus de protéines (Levine *et al.*, 1999).

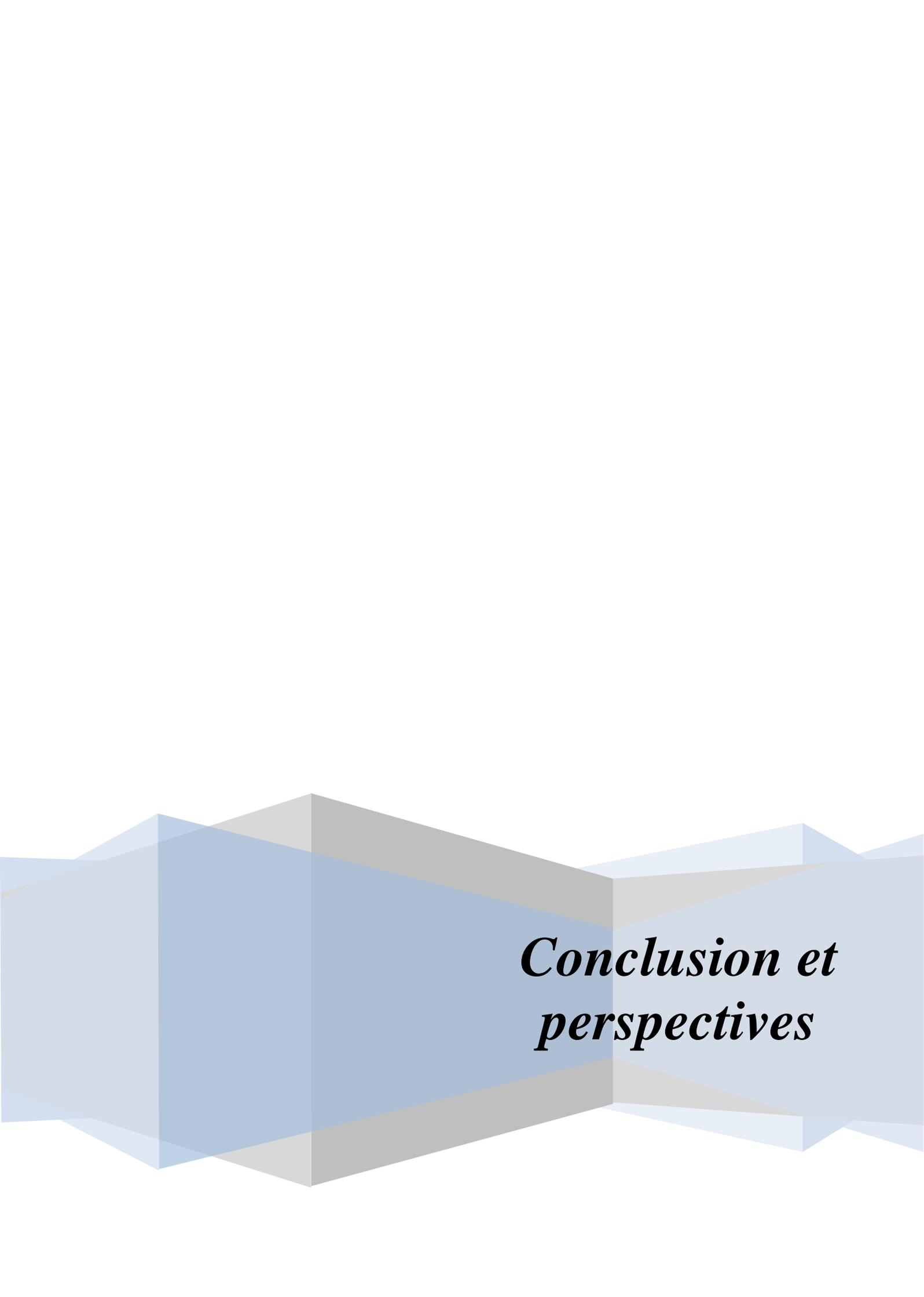
Nous avons observé une restauration des activités des enzymes antioxydantes chez les rats traités par le sulfate de nickel après la co-administration du L-met ou L-cys. L'augmentation des activités des enzymes antioxydantes peut servir de mécanisme de compensation supplémentaire pour maintenir l'intégrité de la cellule et la protection contre les dommages des radicaux libres. Les travaux de Błaszczyk *et al.* (2010), Nagib (2013) confirment nos résultats.

Dans les études ultérieures, menées sur des rats femelles, un effet bénéfique de la méthionine sur l'activité des enzymes associées au glutathion: GSH-Px, GR, GST a été démontré dans les reins des animaux exposés au fluorure de sodium, avec une légère augmentation de l'activité de SOD et de CAT et une diminution de la teneur en malondialdéhyde (MDA), a également été trouvée (Błaszczyk *et al.*, 2010).

Németh et ses collaborateurs (2004) ont révélé aussi que la méthionine a entraîné une augmentation de la teneur en GSH, de l'activité GSH-Px, du ratio GSH/GSSG et une diminution de la teneur en GSSG dans le foie des poulets de chair. En outre, Slyshenkov *et al.* (2002) a signalé que la L-méthionine peut protéger la fraction synaptosomale/mitochondrielle

du cerveau incubée avec de l'hydroperoxyde de tétra-butyle contre la peroxydation des lipides en améliorant la synthèse de GSH et en diminuant la production de GSSG.

Caylak et ses collaborateurs. (2008) ont aussi évalué l'activité antioxydante de la méthionine, l'acide α -lipoïque, N-acétylcystéine et l'homocystéine sur le stress oxydatif induit par le plomb aux érythrocytes. La L-méthionine a eu un effet bénéfique similaire à celui des autres composés contenant du soufre sur Hb, MDA, SOD, GSH-Px, Vit A et Vit E. Dans une étude de Sayed et ses collaborateurs. (2014), la L-cystéine a considérablement réduit l'élévation de la LPO et réduit l'effet du cadimium sur le GSH et l'activité des enzymes antioxydantes chez les rats.



***Conclusion et
perspectives***

Conclusion générale

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées d'activités antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant. Dans ce cadre, la présente étude s'est intéressée, d'une part de mettre en évidence les effets cytotoxiques du nickel sur certaines fonctions vitales chez le rat, et d'autre part de vérifier les effets protecteurs de la supplémentation en silymarine (extrait de *Silybum marianum*), ou en acides aminés soufrés (L-met et L-cys) contre la cytotoxicité de ce métal. Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

❖ ***L'étude phytochimique et pharmacologique des extraits du Silybum marianum nous ont permis de conclure que:***

- Sur le plan phytochimique, l'étude quantitative a dévoilé que cette espèce locale constitue une composition riche en polyphénols et flavonoïdes;
- Les capacités antioxydantes révélées in vitro sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait et dépendent de l'ensemble des substances antioxydantes, de leur nature et leur quantité.

❖ ***L'administration de nickel chez les rats, a engendré:***

- Des perturbations au niveau de la croissance générale des rats et augmentation des poids absolus et relatifs de certains organes étudiés (Foie, reins, testicules).
- Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimiques : Augmentation des concentrations sérique en glucose, bilirubine, cholestérol, triglycérides et lipides totaux;
- Des perturbations au niveau de certains paramètres métaboliques hépatiques confirment l'atteinte hépatique:
 - ✎ Augmentation des activités des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT, PAL et LDH)
 - ✎ Des modifications histologiques en accord avec les résultats biochimiques observés.
- Une atteinte rénale, qui se manifeste par une perturbation des paramètres sériques de la néphrotoxicité (urée, créatinine et l'acide urique), avec une altération histologique rénale apparente, ce qui témoigne d'une défaillance rénale transitoire.
- Une diminution du nombre de globules rouges, des globules blancs et l'hémoglobine, avec une diminution d'hématocrite et du VGM témoignant de l'installation d'une anémie de type microcytaire.

- Un stress oxydant; se traduit par une nette augmentation du marqueur de la peroxydation lipidique (MDA) au niveau hépatique, rénale et testiculaire, une réduction de taux du GSH et des activités antioxydants enzymatique du (GSH-Px, CAT et SOD).

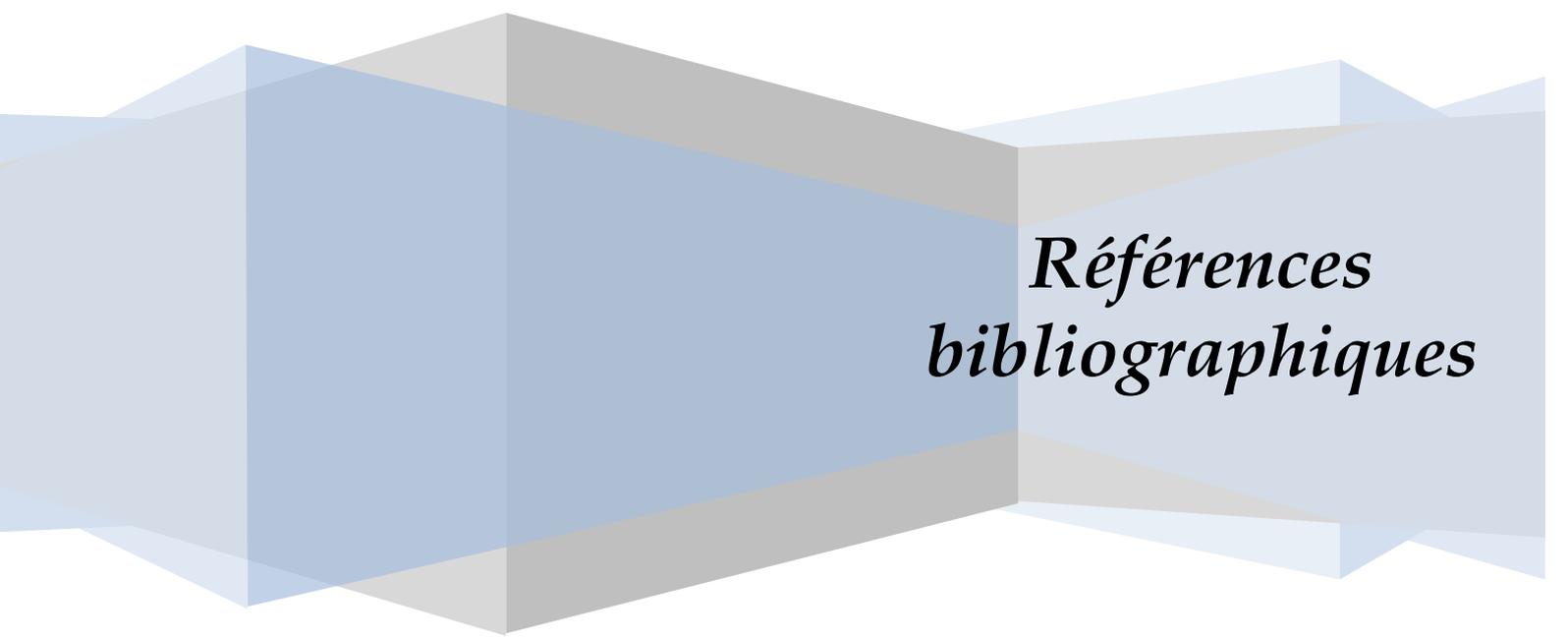
❖ **La supplémentation de l'extrait du chardon marie ou les AAS (L-met/ L-cys) au sulfate de nickel induit chez les rats:**

- Une amélioration de la croissance générale.
- Une amélioration des poids absolus et relatifs des reins, du foie et des testicules.
- Retour des taux de glucose, de bilirubine, de cholestérol, des triglycérides, des lipides sériques et des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, LDH et ALP) à la normale.
- Absence des altérations grave de la fonction hépatique.
- Une correction des taux sériques en créatinine, urée et en acide urique, sans altération de la fonction rénale.
- Une diminution du taux de MDA tissulaire.
- Une amélioration du statut enzymatique antioxydant telles que la SOD, la CAT et la GSH-Px et non enzymatique telle que la GSH au niveau hépatique, rénale et testiculaire.

Ces résultats montrent bien que le nickel exerce ses effets cytotoxiques en tant que stress oxydant et ceci éventuellement par la formation de radicaux libres oxygénés. Ainsi, des supplémentations en silymarine, L-méthionine ou L-cystéine permettent de limiter les perturbations provoquées par le nickel. Ces supplémentations semblent avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit donc à contracter l'état du stress oxydant.

 **Dans le but d'approfondir ce travail il serait intéressant :**

- Déterminer les composés actifs dans les extraits du *Silybum marianum* et l'évaluation de leurs effets *in vitro* sur des lignées cellulaire ;
- Déterminer la concentration en nickel au niveau des organes cibles notamment dans les organes de détoxification ;
- Développer les dosages des biomarqueurs (le rapport GSH/GSSG, les radicaux libres, les métallothionéines, les thioles, GST, GR ...).
- Etudier les mécanismes cellulaire et moléculaire des effets protecteurs des AAS contre la cytotoxicité induite par le nickel.



*Références
bibliographiques*

A

- Abdel-Gawad, S.K., Mohamed, A. (2010). Silymarin administration protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in adult male albino rats (Histological and immunohistochemical study). *Egypt J Histol.* 33(4):683–91.
- Abdel-Kader, M.M., Afify, A.A., Hegazy, A.M. (2011). Roles of N-acetylcysteine, methionine, vitamin c and vitamin e as antioxidants against lead toxicity in rats. *Aust J Basic Appl Sci.* 5(5): 1178-1183.
- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytotherap Res.* 24: 1423–32.
- Abid-Ali, W.D., Khudair, A.R.N., AL-Masoudi, E.A. (2015). Influence of silymarin extracted from *Silybum marianum* seeds compared to legalon against nickel chloride induced hematological and biochemical changes in male rabbits. *Bas J Vet Res.* 14(2): 293-305.
- Abreu, I.A., Cabelli, D.E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta.* 1804: 263-74.
- Adibi, S.A. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285: 779-88.
- AFSSA ; Agence française de sécurité Sanitaire des aliments. (2007). Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 99-100.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 105: 121-6.
- Ahmed, E.A., Omar, M.O., Abdelghaffar, S.K., Ragb, S.M.M., Nasser, A.Y. (2011). The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and l-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 49: 1115–21.
- Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B.K., Kumar, V., Chauhan, A.K., Singh, D. (2013). Biochemical and molecular mechanisms of N-acetyl cysteine and silymarin-mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-biological interactions.* 201(1): 9-18
- Ahmed, S., Rahman, A., Saleem, M., Athar, M., Sultana, S. (1999). Ellagic acid ameliorates nickel induced biochemical alterations: diminution of oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 18(11): 691–8.
- Ahmed, S.M., Mahmoud, A.M., Abou Zid, S.F., Saber, N.Y. (2016). Silymarin and hydroethanolic extracts of *Silybum marianum* leaves and fruits attenuate diethylnitrosamine/

Phenobarbital induced nephrotoxicity via their antioxidant and anti-inflammatory actions. *Amr J Biochem.* 6(2): 21-9.

Al-Masri, S.A. (2012). Effect of Doum and Methionine Combination on Hepatotoxicity in Rats. *Aust J Basic Appl Sci.* 6(6): 392-7

Al-Mutairi, D.A., Craik, J.D., Batinic-Haberle, I., Benov, L.T. (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N methyl pyridylporphyrin. *Free radic res.* 41: 89-96.

Altorjay, I., Dalmi, L., Sári, B., Imre, S., Balla, G. (1992). The effect of silibinin (Legalon) on the free radical scavenger mechanisms of human erythrocytes in vitro. *Acta Physiol Hung.* 80(1-4): 375-80.

Ambrose, A.M., Larson P.S., Borzelleca J.R., Henniga G.R. (1976). «Long-term toxicologic assessment of nickel in rats and dogs». *J Food Sci Technol.* 13: 181-7.

Amien, A.I., Fahmy, S.R., Abd-Elgleel, F.M., Elaskalany, S.M. (2015). Renoprotective effect of *Mangifera indica* polysaccharides and silymarin against cyclophosphamide toxicity in rats. *J Basic Appl Zoo.* 72: 154-62.

Ammon, H.P.T., Hehl, K.H., Enz, G., Setiadi-Ranti, A., Verspohl, E.J. (1986). Cysteine analogues potentiate glucose-induced insulin release in vitro. *Diabetes.* 35: 1390–6.

Andrzejewska, J., Sadowska, K., Mielcarek, S. (2011). Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Indus Crop Prod.* 33: 462–8.

Andrews, G.K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol.* 59: 95-104.

Angelos, M.G., Kotalav, K., Torres, C.A., He, G., Stoner, J.D., Mohammed, M., Kuppusamy, P. (2005). Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(1): 341-7.

Anon. (2009). Silybin-phosphatidylcholine complex Monograph. *Altern Med Rev.* 14(4): 385-90.

Antico, A., Soana, R. (2015). *Nickel sensitization and dietary nickel are a substantial cause of symptoms provocation in patients with chronic allergic-like dermatitis syndromes.* *Allergy Rhinol (Providence).* 6(1): 56–63.

Asada, K., Takahashi, M., Nagate, M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem.* 38: 471-3.

ATSDR. (2005). Toxicological profile for nickel.

ATSDR. (1997). Toxicological Profile for Nickel.(Final Report).NTIS Accession No.PB98-

101199. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 293.

Avias, J. (1972). «Nickel: Element Geochemistry», The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences, R.W. Fairbridge (éd.), Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY. 790-3.

B

Baer-Dubowska, W., Szafer, H., Drajka-Kuzniak, V. (1998). Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*. 28: 735-43.

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., *et al.* (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzeimittel-Forschung*. 46: 1086-9.

Basinger, M.A., Jonesand, M.M., Holscher, M.A. (1990). L-Methionine antagonism of cis-platinum nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 103: 1-15.

Beaudeau, J., Peynet, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., Legrand, A. (2006). Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways. *Ann Pharm Fr*. 64: 373-81.

Bella, DL., Hahn, C., Stipanuk, M.H. (1999). Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol*. 277: E144-53.

Beloued, A. (1998). *Plantes médicinales d'Algérie*. Ed .Office des publications. 68.

Benevenga, N.J., Steele, R.D. (1984). Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Ann Rev Nutr*. 4: 157-81.

Benevenga, N.J., Yeh, M.H., Lalich, J.J. (1976). Growth depression and tissue reaction to the consumption of excess dietary methionine and S-methyl-L-cysteine. *J Nutr*. 106: 1714-20.

Benson, J.M., Burt, D.G., Carpenter, R.L., Eidson, A.F., Hahn, F.F., Haley, P.J., *et al.* (1988). Comparative inhalation toxicity of nickel sulfate to F344/N rats and B6C3F1 mice exposed for twelve days. *Fund Appl Toxicol*. 10: 164-78.

Benson, J.M., Burt, D.G., Cheng, Y.S., Eidson, A.F., Gulati, D.K., Hahn, F.F., *et al.* (1990). Subchronic inhalation toxicity of nickel subsulfide to rats and mice. *Inhal Toxicol*. 2: 1-19.

Bernacchi, A. S., De Ferreyra, E. C., De Castro, C. R. and Castro, J. A. (1993). Ultrastructural alterations in testes from rat treated with cysteine. *Biomed Environ Sci*. 6: 172-8.

Bezanger-Beauquesne L., Pinka M., Trotin F. (1990). Plantes médicinales des régions tempérées. 2ème édition. Maloin. Paris: 45-65.

Błaszczuk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E. (2010). Influence of methionine upon the activity of antioxidative enzymes in the kidney of rats exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem Res.* 133: 60–70

Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., Mathé, V., Mikogami, T., Tomé, D., *et al.* (2007). Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. *Free Radical Biol Med.* 42: 1089–97.

Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences Flammarion, Paris. 59-81.

Bordes, E., Papillion, V.V. (1983). Myocardial change induced by nickel and in association with cadmium. *Rev Ig Bacteriol. Virusol Parasitol Epidemol Pneumatol.* 32: 51–6.

Bosisio, E., Benelli, C., Pirola, O. (1992). Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol Res.* 25: 147-54.

Bouchoucha, A., Terbouche, A., Zaouani, M., Derridj, F., Djebbar, S. (2013). Iron and nickel complexes with heterocyclic ligands: stability, synthesis, spectral characterization, antimicrobial activity, acute and subacute toxicity. *J Trace Elem Med Biol.* 27(3): 191-202.

Boulila, S., Elfeki, A., Oudadesse, H., Elfeki, H. (2015). Substitution effects of a carbonated hydroxyapatite biomaterial against intoxication chloride nickel-exposed rats. *Toxicol Mech Methods.* 25: 155-65.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.

Brosnan, J.T., Brosnan, M.E. (2006). The sulfur-containing amino acids: An Overview. *Journal of Nutrition,* 136: 1636-40S.

Brouillet, L., Hay, S.G., Goulet, I., Marie-victorin. (2002). *Flore laurentienne.* 3^{ème} éd. Boucherville: Edition Gaëtan Morin. Quebec.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales.* 3ème édition. Tec & Doc Lavoisier. 1120.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1984). Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 105: 302-10.

Bülles, H., Bülles, J., Krumbiegel, G., Mennicke, W.H., Nitz, D. (1975). Studies of the metabolism and excretion of silybin in the rat. *Arzneimittel forschung*. 25: 902–5.

Bwititi, P.T., Ashorobi, R.B. (1998). Effects of chronic oral nickel chloride administration on glycaemia and renal function in normal and diabetic rats. *Afr J Health Sci*. 5: 198-201.

C

Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., *et al.* (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem*. 383(6): 93.

Cai, J., Sun, W.M., Lu, S.C. (1995). Hormonal and cell density regulation of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression. *Mol Pharmacol*. 48: 212-8.

Calvert, J.W., Elston, M., Nicholson, C.K., Gundewar, S., Jha S., Elrod J.W., *et al.* (2010). Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation*. 122: 11-9.

Campos, R., Garrido, A., Guerra, R., Valenzuela, A. (1989). Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med*. 55: 417-9.

Carames, C. (1990). Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie, leurs plantules, leurs semences. *Publication agricole*. 27: 102 – 3. *Chem Eng News*. 69(37): 25.

Carlson, H.E., Miglietta, J.T., Roginski, M.S., Stegink, L.D. (1989). Stimulation of pituitary hormone secretion by neurotransmitter amino acids in humans. *Metabolism*. 38: 1179-82.

Carini R, Comoglio A, Albano E, Poli G. (1992). Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model: Protection by the silybin-phospholipid complex IdB1016. *Biochem Pharmacol*. 43: 2111–5.

Cartana, J., Romeu, A., Arola, L. (1992). Effects of copper, cadmium, and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*). *Comp Biochem Physiol. C* 101: 209–13.

Cartana, J., Arola, L. (1992). Nickel induced hyperglycemia the role of insulin and glucagon. *Toxicol*. 71: 181-92.

Caso, G., McNurlan, M.A. (2010). Effect of insulin on whole body protein metabolism in children with type 1 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13: 93–6.

Caylak, E., Aytakin, M., Halifeoglu, I. (2008). Antioxidant effects of methionine, α -lipoic and N-acetylcysteine and homocysteine on lead- induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 60: 289-94.

- Celander, D.R., George, M.J. (1963). Dietary interrelationship of ethionine and methionine in the weanling rat. *Biochem J.* 87: 143-6.
- Cempel, M., Janicka, K. (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol Trace Elem Res.* 90(1-3): 215-26.
- Cempel, M., Nikel, G. (2006). Nickel: A review of its sources and Environmental Toxicology. *Polish J Environ Stud.* 15(3): 375-82.
- Center, S.A. (2000). Traitement de l'insuffisance hépatique chronique. *WALTHAM Focus.* 10(4): 29-31.
- Center, S.A. (2004). Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. *Vet Clin Small Anim.* 34: 67-172.
- Chang, L., Xu, J., Yu, F., Zhao, J., Tang, X., Tang, C. (2004). Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Amino Acids.* 27: 37-48.
- Chashschin, V.P., Artunina, P.A., Norseth, T. (1994). Congenital defects, abortion and other health effects in nickel refinery workers. *Sci Total Environ.* 148: 287-91.
- Chau, Y.K., Kulikovsky-Cordeiro O.T.R. (1995). Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ Rev.* 3: 95-120.
- Chen, W., Kennedy, D.O., Kojima, A., Matsui-Yuasa, I. (2000). Polyamines and thiols in the cytoprotective effect of L-cysteine and L-methionine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Amino acids.* 18(4): 319-27.
- Chen, C.Y., Wang, Y.F., Huang, W.R., Huang, Y.L. (2003). Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 189: 153-59.
- Chtourou, Y., Garoui, E., Boudawara, T., Zeghal, N. (2013). Therapeutic efficacy of silymarin from milk thistle in reducing manganese-induced hepatic damage and apoptosis in rats. *Hum Exp Toxicol.* 32(1): 70-81.
- Clemente Plaza, N., Reige García-Galbis, M., Martínez-Espinosa, R.M. (2018). Effects of the usage of L-cysteine (L-cys) on human health. *Molecules.* 23(3): 1-13.
- Cohen, B.M., Lipinski, J.F, Vuckovic, A., Prosser, E. (1982). Blood S-adenosyl-l-methionine levels in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry.* 139: 229-31
- Colombo, V., Lupi, M., Falcetta, F., Forestieri, D., D'Incalci, M., Ubezio, P. (2011). Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67(2): 369-79.
- Costa, M., Salnikow, K., Cosentio, Z. (1994). Molecular mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 102: 127-30.

- Costa, M., Salnikow, K., Sutherland, J.E., Broday, L., Peng, W., Zhang, Q., Kluz, T. (2002). The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. *Mol Cell Biochem.* 265-75.
- Cotton, F.A., Wilkinson, G. (1988). *Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text*, Wiley-Interscience. 5e édition, New York, NY.
- Courrèges, P., Becha, J., Abood, E., André, L., Lamarca, R. (1998). Renal artery stenosis and chronic renal failure in NIDDM. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 91: 1077–82.
- Cresenzi, C.L., Lee, J.I., Stipanuk, M.H. (2003). Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteinedioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J Nutr.* 133: 2697-702.

D

- Daldrup, T., Haarhoff, K., Szathmary, S.C. (1983). Toedliche nickel sulfate-intoxikation. *Berichte zur Gerichtlichen Medizin.* 41:141-4.
- Das, K.K., Dasgupta, S. (2000). Effect of nickel on testicular nucleic acid concentrations of rats on protein restriction. *Biol Trace Elem Res.* 73(2): 175–80.
- Das, K.K., Dasgupta, A. (2002). Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. *Environ Health Perspect.* 110(9):923-6.
- Davies, K.J.A., Goldberg, A.L. (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *Biol Chem.* 262: 8227-34.
- De Moffarts, B., Portier, K., Kirschvink, N., Coudert, J., Fellmann, N., van Erck, E., *et al.* (2007). Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (ω -3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet J.* 174(1): 113-21.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 26: 202-26.
- Deep, G., Agarwal, R. (2010). Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3): 447-63.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liege.* 62(4):1-10.
- Dehmlow, C., Erhard, J., de Groot, H. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology.* 23: 749–54.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In: *Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologique.* Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier: 45-80.

- Deng, J.W., Shon, J.H., Shin, H.J., Park, S.J, Yeo, C.W, Zhou, H.H., *et al.* (2008). Effect of silymarin supplement on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Pharm Res.* 25: 1807–14.
- Denkhaus, E., Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity and carcinogenicity. *Cr Rev Oncol J Hematol.* 42: 35-56.
- Derakhshanfar, A., Bidadkosh,A., Hashempour, S.M. (2009). L-methionine attenuates gentamicin nephrotoxicity in male Wistar rat; Pathological and biochemical findings. *Iran J Vet Res.* 10(4): 323-28.
- Deshmukh, S.A., Rathod, S.P, Upasani, C.D., Upaganlawar, A.B. (2014). Prevention of insulin resistance by silymarin in rats. *Asian J Pharm Clin Res.* 7(1): 14-17.
- Di Buono, M., Wykes, L.J., Ball, R.O., Pencharz, P.B. (2001). Total sulfur amino acid requirement in young men as determined by indicator amino acid oxidation with L-[1-13C] phenylalanine. *Am J Clin Nutr.* 74: 756-60.
- Diana, X.D. (1999). Increased radiation induced apoptosis in mouse thymus in the absence of métallothionein. *Toxicol.* 134: 39–49.
- Diankov S., Simeonov E., Sirakov A., Subra-Paternaut P. (2009). Extraction supercritique des substances actives de *Silybum marianum*. *Revue de génie industriel.* 1: 13-17.
- Diniz, Y.S., Rocha, K.K., Souza, G.A., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M., Rodrigues, H.G., *et al.* (2006). Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 543: 151–7.
- Dixit, N., Baboota, S., Kohli, K., Ahmad, S., Ali, J. (2007). Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian J Pharmacol.* 39: 172.
- Doll, R., Andersen, A., Cooper, W.C., Cosmatos, I., Cragle, D.L., Easton, D., *et al.* (1990). Report of the international committee on nickel carcinogenesis in man. *Scand J Work Environ Health.* 16: 1-82.
- Dostal, L.A., Hopfer, S.M., Lin S.M., Sunderman, FW. (1989). Effects of nickel chloride on lactating rats and their suckling pups, and the transfer of nickel throughratmilk. *Toxicol Appl Pharmacol.* 101(2): 220-31.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95.
- Dröge, W. (2005). Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 360: 2355–72.
- Durand, G., Beaudeau, J.L. (2011). *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives.*Ed. Lavoisier, Paris. 607.

Duke, J.M. (1980). «Nickel in rocks and ores», Nickel in the Environment, J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY. 51-66.

Dunnick, J.K., Elwell, M.R., Radovsky, A.E., Benson, J.M., Hahn, F.F., *et al.* (1995): Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer Res.* 55: 5251-56.

E

El Daly, E.S. (1996). Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Islamic Acad Sci.* 9: 105-18.

Eldemerdash, R., El-Gayar, H.A., Salim, S.A., Salah, N.A., Abdel-Aziz, A.F. (2016). Hepato-protective effect of aqueous extract of *Silybum marianum* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Inter J Res Stud Biosci.* 4(2): 13-24.

El-Demerdash, F.M., Attia, A.A., Elmazouly, R.H. (2012). Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering.* 47(12): 1948-54.

El-Khishin, I.A, El-fakharany, Y.M.M, Abdel Hamid, O.I. (2015). Role of garlic extract and silymarin compared to dimercaptosuccinic acid (DMSA) in treatment of lead induced nephropathy in adult male albino rats. *Toxicol Rep.* 2: 824–32.

El-Shitany, N.A., El-Haggar, S., El-desoky, K. (2008). Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 46: 2422-8.

F

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 108-15.

Fehér, J., Lengyel, G. (2012). Silymarin in the prevention and treatment of liver diseases and primary liver cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 13: 210-17.

Fehér, J., Láng, I., Nékám, K., Müzes, G., Deák, G. (1988). Effect of free radical scavengers on superoxide dismutase (SOD) enzyme in patients with alcoholic cirrhosis. *Acta Med Hung.* 45: 265–76.

Fernández, J.R., Rouzard, K., Voronkov, M., Huber, K.L., Stock, M., Gordon, J.S. (2015). Anti-inflammatory and anti-bacterial properties of tetramethylhexadecentyl succinyl cysteine (TSC): A skin-protecting cosmetic functional ingredient. *Int J Cosmet Sci.* 37: 129–33.

Flatland, B. (2003). Botanicals, vitamins, and minerals and the liver: therapeutic applications and potential toxicities. *Compendium*. 25(7): 514-24.

Flohe, L., Gunzler, W.A. (1984). Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol M*. 105: 114-21.

Fraschini, D.F., Demartini, G., Esposti, D. (2002). Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Investig*. 22: 51–65.

Fuchs, E.C., Weyhenmeyer, R., Weiner, O.H. (1997). Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittel forschung*. 47: 1383-7.

G

Gad, S.B., El-Maddawy, Z.K. (2016). Silymarin improves pancreatic endocrine function in rats. *Pak Vet J*. 34(2): 214-18.

Gadalla, M.M., Snyder, S.H. (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem*. 113(1): 14-26.

Garlick, Peter, J. (2006). Toxicity of Methionine in Humans. *J Nutr*. 136(6): 1722-25S.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M. (2005). Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*. 53: 1370-73.

Ghedira, K. (2005). Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*. 3: 162-9.

Glover, T. (2003). Pocket ref 3^eéd., Littleton Colo. Sequoia Pub.

Goluch-Koniuszy, Z.S. (2016). Nutrition of women with hair loss problem during the period of menopause. *Prz Menopauzalny*. 15: 56–61.

Graziano, J.H., Siris, E.S., Ioacono, N., Silverberg, S.J., Turgeon, L. (1985). 2,3-Dimercaptosuccinic acid as an antidote for lead intoxication. *Clin Pharmacol Ther*. 37:431-8.

Greenlee, H., Abascal, K., Yarnell, E., Ladas, E. (2007). Clinical applications of Silybum marianum in oncology. *Integr Cancer Ther*. 6: 158-65.

Greenwood, N. (1997). Chemistry of the elements 2^eéd., Oxford; Boston: Butterworth-Heinemann.

Gruenwald, J. (2004). PDR for herbal medicines. 3rd ed. Montvale: Thomson PDR.

Grunkemeyer, V.L. (2010). Advanced diagnostic approaches and current management of avian hepatic disorders. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 13: 413–27.

Gu, M., Singh, R.P., Dhanalakshmi, S., Mohan, S., Agarwal, R. (2006). Differential effect of silibinin on E2F transcription factors and associated biological events in chronically UVB-exposed skin versus tumors in SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther.* 5(8): 2121-9.

Guignard, J.L. (1998). *Botanique*. 11eme ED. Ed Masson. NP 278.

Guittonneau, G., Huon, A. (1983). *Connaitre et reconnoitre la flore et la vegetation méditerranéennes*. Ed. Ouest France. 331.

H

Haber, L.T., Diamound, G.M., Zhao, Q., Erdreich, L., Dourson, M.L. (2000). Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Regul Toxicol Pharmacol.* 31: 231-41.

Haesler, E., Schneiter, P., Temler, E., Jequier, E., Tappy L. (1994). Effects of infused amino acids and lipids on glucose metabolism in healthy lean humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 18: 307-12.

Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res.* 533: 211-26.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). "Free radicals in biology and medicine." New-York. Oxford University Press. 936.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British J pharmacol.* 142: 31-2.

Hamza, R.Z, Al-Harbi, M.S. (2015). Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5(7): 521–31.

Haro, R.T., Furst, A., Falk, H.L. (1968). Studies on the acute toxicity of nickelocene. *Proc West Pharmacol Soc.* 11: 39-42.

Hayder, G., Oufi, N.N., Hussain, S.A.R. (2012). What are the effects of silibinin on testicular tissue of mice?. *J Appl Pharma Sci.* 2(11): 9-13.

Health and Welfare Canada Eds. (1990). Report of the expert advisory committee on amino acids. Ottawa (Ontario), Canada, Minister of Supply and Services.

Hirano, S., Shimada, T., Osugi, J., Kodama, N and Suzuki, K.T. (1994). Pulmonary clearance and inflammatory potency of intratracheally instilled or acutely inhaled nickel sulfate in rats. *Arch Toxicol.* 68: 548-54.

- Hould, R. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine. 19: 225-7.
- Hu, W., Feng, Z and Tang, M.S. (2004). 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*. 25: 455-62.
- Huang, C.F, Hsu, C.J, Liu, S.H, Lin-Shiau, S.Y. (2008). Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase involved. *Toxicol Lett*. 176(3): 188-97.
- Huang ,X., Thuang, Z.,Frenkl ,K., Klein, C.B., Coster,M. (1994). The role of nickel and nickelmediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 102(3): 281-84.
- Huet, M., Fleurentin, J. (2013). Turmeric, green tea and milk thistle: which strategy in cancer prevention or as complement to treatments?. *Hegel*. 3(4): 275-7.
- Hulbert, A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol*. 234: 277-88.
- Huneau, J.F., Mariotti, F., Blouet, C., Tomé, D., Blachier, F. (2008). Implications métaboliques, physiologiques et fonctionnelles de l'apport en acides aminés soufrés et en protéines riches en acides aminés soufrés. In *Aliments fonctionnels*. (Roberfroid M, Coxam V, Delzenne N,Eds), Tec et Toc Lavoisier. 337-82.

I

- Ihechiluru, N.B., Henry, A.N., Taiwo, I.E. (2015). Heavy metal bioaccumulation and oxidative stress in *Austroaeschnainermis* (Dragon fly) of the Lagos Urban ecosystem. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 7(1): 11-19.
- INRS. (1992) - Fiche toxicologique n° 68 -Nickel et composés minéraux. Institut National de Recherche et de Sécurité. http://www.inrs.fr/index_fla.html.
- INERIS (2006). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Nickel et ses dérivés. INERIS-DRC-02-25590-02DF44: 60.
- Ishimatsu, S., Kawamoto, T., Matsuno, K., Kodama, Y. (1995). Distribution of various nickel compounds in rat organs after oral administration. *Biol Trace Elem Res*. 49: 43-52

J

- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I., Flora, S.J. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 74(4): 607-14.

Jain, SK., Velusamy, T., Croad, J.L. (2009). L-cysteine supplementation lowers blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, MCP-1, and oxidative stress and inhibits NF- κ B activation in the livers of Zucker diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 46: 1633–8.

Jalali, SM., Najafzadeh, H., Bahmei, S. (2017). Protective role of silymarin and D-penicillamine against lead-induced liver toxicity and oxidative stress. *Toxicol Ind Health.* 33(6): 512–8.

Jerry, W., Spears, Hatfield, E.E., Forbes, R.M. (2008). Interrelationship between Nickel and Zinc in the Rat. Department of Animal Science, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801.

Jiang, Y., Wang, H., Wang, J., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. (2009). The protective effect of silibinin against mitomycin C-induced intrinsic apoptosis in human melanoma A375-S2 cells. *J Pharmacol Sci.* 111(2): 137-46.

Jollow, D.L., Mitchell, J.R., Zampaglione, Z., Gillette, J.R. (1974). Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacol.* 11: 151-69.

Jordi, C., Luis, A. (1992). Nickel-induced hyperglycaemia: the role of insulin and glucagon. *Toxicol.* 71: 181-92.

K

Kabel, A.M., Mahmoud, H.A., El Kholly, S.S. (2013). Ameliorative potential of gemfibrozil and silymarin on experimentally induced nephrotoxicity in rats. *Afr J Urolog.* 19: 171–8.

Käkelä, R., Käkelä, A., Hyvärinen, H. (1999). Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 123(1): 27-37.

Kang, J.S., Jeon, Y.J., Kim, H.M., Han, S.H., Yang, K.H. (2002). Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 138–44.

Karkanis, A., Bilalis, D., Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products.* 34: 825–30.

Karimi, G., Ramezani, M., Tahoorian, Z. (2005). Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2(3): 383–6.

Karimi, G., Vahabzadeh, M., Lari, P., Rashedinia, M., Moshiri, M. (2011). “Silymarin”, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. *Iran J Basic Med Sci.* 14(4): 308-17.

- Kasprzak, K.S., Bal, W., Karaczyn, A.A. (2003). The role of chromatin damage in nickel induced carcinogenesis. A review of recent developments. *J Environ Monitor.* 5: 183–7.
- Kawaguchi-Suzuki, M., Frye, R.F., Zhu, H.J., Brinda, B.J., Chavin, K.D., Bernstein, H.J., Markowitz, J.S.(2014). The effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on human cytochrome P450 activity. *Drug Metab Dispos.* 42(10): 1611-6.
- Kechker, M. (2008). Extraction de silymarine et étude son activité antimicrobienne. Université Mentouri-Constantine.
- Khalil, A. (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamin E against atherosclerosis. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(7): 662-9.
- Kim, H.C., Cha, S.W., Song, S.W., Ha, C.S., Han, S.S., Robs, J.K., *et al.* (1997). Enhancing effects of captafol on the development of GST-P-positive liver cell foci in a medium-term bioassay, and protection by L-cysteine of the enhancement in rats. *Cancer Letters.* 111: 15-20
- Kim, S.H., Cheon, H.J., Yun, N., Oh, S.T., Shin, E., Shim, K.S., *et al.* (2009). Protective effect of a mixture of Aloe vera and *Silybum marianum* against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis. *J Pharmacol Sci.* 109(1): 119-27.
- Kiruthiga, P.V., Shafreen, R.B., Pandian, S.K., Devi, K.P. (2007). Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H₂O₂ exposure in erythrocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 100: 414–9.
- Klavins, J.V., Kinney, T.D., Kaufman, N. (1963). Body iron levels and hematologic findings during excess methionine feeding. *J Nutr.* 79: 101-4.
- Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H., Tanaka, T. (2005). Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin Cancer Res.* 11(13): 4962-7.
- Koizumi, S. (1997). Analysis of heavy metal induced gene expression. In: Massaro EJ, Editor, *Handbook of human toxicology*, Boca Raton, FL, CRC Press. 103-8.
- Kolokitha, O.E, Chatzistavrou, E. (2009). Allergic reactions to nickel-containing orthodontic. *Angle Orthodontist.* 79(1): 186-92.
- Kong L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., *et al.* (2014). Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *Int J Mol Sci.* 15(11): 21253-69.
- Kren, V., Walterova, D. (2005). Silybin and silymarin - new effects and applications. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 149: 29-41.

Krzywanski, D.M., Dickinson, D.A., Iles, K.E., Wigley, A.F., *et al.* (2004). Variable regulation of glutamate cysteine ligase subunit proteins affects glutathione biosynthesis in response to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* 423: 116-25.

Kubrak, O.I., Rovenko B.M., Husak V.V., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. (2012). Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidant system in liver and white muscle of goldfish *Carassius auratus* L. *Ecotoxicol Environ Saf.* 80: 231-7.

Kurpad, A.V., Regan, M.M., Varalakshmi, S., Gnanou, J., Young V.R. (2004). Daily requirement for total sulfur amino acids of chronically undernourished Indian men. *Am J Clin Nutr.* 80: 95-100.

Kwon, Y.H., Stipanuk, M.H. (2001). Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E804-15.

ℒ

Labstat, Inc. (1991). «An evaluation of changes in Pb, Cd, Hg and Ni contents of whole tobacco, mainstream condensate and sidestream condensate from Canadian cigarettes during the period 1968-1988», rapport rédigé en vertu d'un marché pour Santé et Bien-être social Canada, Ottawa (Ont.)

Lahlah, F.Z. (2008). Extraction des flavonoïdes par le butanol et le chloroforme à partir de *Silybum marianum* et étude de leur activité antimicrobienne. Université Mentouri-Constantine.

Laila, A.M., Azza, F.A., Wafaa, E.M., Tarek, A.A., Amany, O.S., Abir, A.S. (2003). Effect of chelating agent (DMSA) and Vitamin C on nickel induced testicular toxicity in rats: toxicological, biochemical and histological study. *Toxicol.* 191(1): 52.

Lang, I., Nekam, K., Gonzalez-Cabello, R., Müzes, G., Gergely, P., Fehur, J. (1990). Hepatoprotective and immunological effects of antioxidant drugs. *Tokai J Exp Clin Med.* 15:123-7.

Lazo, J.S., Pitt, B.R. (1995). Metallothionein and cell, death by anti cancer drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 655-77.

Leach, C.N., Linden, J.V., Hopfer, S.M., Crisostomo, M.C., Sunderman, F.W. (1985). Nickel concentrations in serum of patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Clin Chem.* 31: 556-60.

Lee, J.I., Londono, M., Hirschberger, L.L., Stipanuk, M.H. (2004). Regulation of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J Nutr Biochem.* 15: 112-22.

- Lee, J.C., Son, Y.O., Pratheeshkumar, P., Shi, X. (2012). Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 53(4): 742-57.
- Lee, M., Tazzari, V., Giustarini, D., Rossi, R., Sparatore, A., Del Soldato, P., *et al.* (2010). Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation: potential for treating Parkinson disease. *J Biol Chem.* 285: 17318–28
- Lee, Y.J., Lim, S.S., Baek, B.J., An, J.M., Nam, H.S., Woo, K.M., Cho, M.K., *et al.* (2016). Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. *Environ Toxicol Pharmacol.* 42: 76-84.
- Leelavinothan,P., Kasinathan, A. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 650: 364-70.
- Lehninger, A. (2000). *Principios de bioquímica 3^eéd.*, New York: Worth Publishers.Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E., 2006, *J Nutr.* 136(6): 1636-40S.
- Lei, Y.X., Chen, J.K and Wu, Z.L. (2001). Detection of DNA strand breaks, DNA-protein crosslinks, and telomerase activity in nickel-transformed BALB/c-3T3 cells. *Teratog Carcinog Mutagen.* 21: 463-71.
- Lenzi, F. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Thèse Méd. Vét.Lyon.
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman E.R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins.*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 15036-40.
- Levine, R.L, Garland, D., Oliver, C.N., Amic, A., Climent, I., Lenz, A.G., *et al.* (1999). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186: 464–78.
- Li, G., Frenz, D.A., Brahmblatt, S., Feghali, J. G., Ruben, R.J., Berggren, D., *et al.* (2001). Round window membrane delivery ofL-methionine provides protection from cisplatin ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicol.* 22: 163–76.
- Li, H.B., Cheng, K.W.Wang, C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food chemistry.* 102: 771-6.
- Li, Q., Liu, H., Alattar, M., Jiang, S., Han, J., Ma, Y., Jiang, C. (2015). The preferential accumulation of heavy metals in different tissues following frequent respiratory exposure to PM2.5 in rats. *Sci Rep.* 5: 16936.
- Li, Y., Zamble, D.B. (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chem Rev.* 109: 4617–43.

Li, L., Zeng, J., Gao, Y., He, D. (2010). Targeting silibinin in the antiproliferative pathway. *Expert Opin Investig Drugs*. 19(2): 243-55.

Liu, Y. (2006). Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biol Med*. 40(6): 960-967.

Lu, S.C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*. 13: 1169-83.

Lu, S.C., Ge, J.L., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1992). Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamyl cysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J Clin Invest*. 90: 524-32.

Lyn Patrick, N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*. 11(2): 114-27.

Lyons, J., Rauh-Pfeiffer, A., Yu, Y. M., Lu, X.-M., *et al.* (2000). Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *PNAS*. 97: 5071-6.

M

Ma, Z.A., Zhao, Z., Turk, J. (2012). Mitochondrial dysfunction and β -cell Failure in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*. 3: 11.

MacLachy, J. (1993). Données inédites sur les quantités estimées de nickel rejetées par les mines et les fonderies de métaux au Canada, Environnement Canada, Direction des programmes industriels, Hull (Québec).

Magliulo, E., Carosi P.G, Minoli L., Gorini S. (1973). Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneimittel forschung*. 23: 161-7.

Mahmoud, K.E., Shalahmetova, T., Deraz, S., Umbayev, B. (2011). Combined effect of vanadium and nickel on lipid peroxidation and selected parameters of antioxidant system in liver and kidney of male rat. *Afric J Biotech*. 10(79): 18319-25.

Maines, M.D., Kappas, A. (1977). Regulation of cytochrome p 450 dependant microsomal drug metabolizing enzymes by nickel, cobalt and iron. *Clin Pharmacol Ther*. 22: 780-790.

Manna, P., Jain, S.K. (2013). L-cysteine and hydrogen sulfide increase PIP3 and AMPK/PPAR γ expression and decrease ROS and vascular inflammation markers in high glucose treated human U937 monocytes. *J Cell Biochem*. 114(10): 2334-45.

Mandava, V.R., Sunita, L.C. et Seema, R.S. (2009). Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food Chem Toxicol*. 47: 1368-71.

- Mansouri, A., Ennbarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chem.* 89: 411-20.
- Mas, A., Peligero, M.J., Alemany, M., Arola, L. (1986). Distribution and kinetics of injected nickel in the pregnant rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 13: 91.
- Mastromatteo, E. (1986). Yant memorial lecture. Nickel. *Am Ind Hyg Assoc J.* 47(10): 589-601.
- Mateen, S., Tyagi, A., Agarwal, C., Singh, R.P., Agarwal, R. (2010). Silibinin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators. *Mol Carcinog.* 49(3): 247-58.
- McBean, G.J. (2017). Cysteine, glutathione, and thiol redox balance in astrocytes. *Antioxidants.* 6: 62.
- Mena, S., Ortega, A., Estrela, J.M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 674(1-2): 36-44.
- Menon, S. G., Goswami, P.C. (2007). A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene.* 26: 1101-9.
- Metayer, S., Seiliez, I., Collin, A., Duchene, S., Mercier, Y., Geraert, P.A., *et al.* (2008). Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *J Nutr Biochem.* 19: 207–15.
- Metwally, M.A.A., El-Gellal A.M., El-Sawaisi, S.M. (2009). Effects of silymarin on lipid metabolism in rats. *World Applied Sci J.* 6 (12): 1634-7.
- Mickel, P., Waalkes, K.S., Masato, O., Lionel, A.P. (1985). Protective effects of zinc acetate toward the toxicity nickelous acetate in rats. *Toxicol.* 34: 29-41.
- Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. 13-3.
- Minton, J. (2004). Milk Thistle. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 26(8): 631-2.
- Mira, L., Silva, M., Manso, C.F. (1994). Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol.* 48:753–9.
- Mirguez, M.P., Anundi, I., Sainz-Pardo, L.A., Lindros, K.O. (1994). Hepatoprotective mechanism of silymarin: No evidence for involvement of cytochrome P4502E1. *Chem Biol Interact.* 91: 51-63.
- Misra M., Rodriguez R.E., Kasprzak K.S. (1990). Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol.* 64: 1-17.

Misra, M., Rodriguez, R., North, S.S.L., Kaprzak, K.S. (1992). Nickel induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol Lett.* 2: 121-33.

Mohanty, B., Mahanty, A., Ganguly, S., Sankar, T.V., Chakraborty, K., Rangasamy, A. (2014). Amino acid compositions of 27 food fishes and their importance in clinical nutrition. *J amino acids.* 1: 1-7.

Morazzoni, P., Bombardelli, E. (1995). *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia*; LXVI: 3-42.

Mori, N., Hirayama, K. (2000). Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr.* 130: 2349–55.

Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., Laster, L. (1965). Transsulfuration in mammals: Microassays and tissue distributions of three enzyme of the pathway. *J Biol Chem.* 240: 4382–92.

Mudd, S.H., Pool, J.R. (1975). Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.* 24: 721.

N

Nada, S.A., Hassan, N.F., Eldenshary, E.E.D.S., Abdel Reheem, G. Hassan, A.H.M. (2015). Whey protein products and their combination with L-methionine prevent liver fibrosis incidence in thioacetamide-toxicated rats. *IOSR J Pharm.* 5: 19-28.

Nagib, R.M. (2013). Combined Effects of Methionine and Kiwi Fruit on Paracetamol Induced Liver Injury. *World J Med Sci.* 9(1): 1-7.

Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H. (1999). Ethqno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutat Res.* 424: 59-69.

Nandi, D., Patra, R.C., Ranjan, R., Swarup, D. (2008). Role of co-administration of antioxidants in prevention of oxidative injury following sub-chronic exposure to arsenic in rats. *Vet Arhiv.* 78: 113-21.

Nandi, D., Patra, R.C., Swarup, D. (2005). Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicol.* 211: 26-35.

Nemeth, K., Mezes, M., Gaal, T., Bartos, A., Balogh, K., Hus-veth, F. (2004). Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox redox system of growing chickens. *Acta Vet Hung.* 52 (3): 369–78.

Ness, R.D. (2006). Integrative therapies, in: Harrison GJ, Lightfoot TL, Editors. *Clinical Avian Medicine.* Spix Publishing, Palm Beach. 343–64.

Neuzil, J., Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* 331(3): 281-4.

Nguyen, D., Samson, S.L., Reddy, V.T., Gonzalez, E.V., Sekhar, R.V. (2013). Impaired mitochondrial fatty acid oxidation and insulin resistance in aging: novel protective role of glutathione. *Aging Cell*. 12(3):415-25.

Niculescu, M.D., Zeisel, S.H. (2002). Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr*. 132: 2333-5S.

Nielsen, G.D., Jepsen, L.V., Jorgensen, P.J., Grandjean, P., Brandrup, F. (1990). Nickel-sensitive patients with vesicular hand eczema: oral challenge with a diet naturally high in nickel. *Br Dermatol*. 122: 299-308.

O

Oda, S.S., El-Ashmaw, I.M. (2012). Protective effect of silymarin on mercury-induced acute nephro-hepatotoxicity in rats. *Glob Vet*. 9(4): 376-83.

Oller, AR., Costa, M., Oberdörster, G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*. 143:152-66.

Olney, J.W. (1994). Excitotoxins in foods. *Neurol Toxicol*. 15: 535-44.

Omar, H.E.M., Abd-elghafar, S.K, Fiedan, I.O., Ahmed, E.A. (2015). L-cysteine ameliorated testicular toxicity induced by acrylamide in rats. *European Journal of Biological Research*. 5 (2): 1-8.

Omar, H.M, Ahmed, E.A., Abdel-Ghafar, S.K., Ragab, M.M.S., Nasser, A.Y. (2012). Hepatoprotective effects of vitamin C, DPPD, and L-cysteine against cisplatin-induced oxidative stress in male rats. *J Biol Earth Sci*. 2(1): B28-B36.

OMS IPCS. (1991). Environmental Health Criteria n. 108: nickel. World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm>.

Onaolapo, A.Y., Onaolapo, O.J., Blessing, I.C., Hameed, S.A., Raimot, R. (2016). Low-dose L-methionine-associated changes in behavioural indices in young rats. *Int J Neurosci Behav Sci*. 4: 11-19.

Oskarsson, A., Tjalve, H. (1979). Binding of ⁶³Ni by cellular constituents in some tissues of mice after the administration of ⁶³NiCl₂ and ⁶³Ni(CO)₄. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenhagen)*. 45(4): 306–14.

P

Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*. 22: 359-78.

Palacin, M., Fernandez, E., Chillaron, J. and Zorzano, A. (2001). The amino acid transport system b(0,+)_{AT} and cystinuria. *Mol Membr Biol*. 18: 21-6.

- Pari, L., Prasath, A. (2008). Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Biochem Biotech.* 173: 77–8.
- Pari, L., Amudha, K. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 10; 650(1): 364-70.
- Patra, R.C., Swarup, D., Dwivedi, S.K. (2001). Antioxidant effects of α -tocopherol, ascorbic acid and l-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicol.* 162:81–8.
- Pereverzev, M.O., Vygodina, T.V., Konstantinov, A.A., Skulachev, V.P. (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans.* 31: 1312–5.
- Pilkis, S.J., El Magrabi, M.R., Claus, T.H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem.* 57: 755.
- PISSC (Programme international sur la sécurité des substances chimiques). (1991). Nickel, Critères d'hygiène de l'environnement, n° 108, Organisation mondiale de la santé, Genève (Suisse). 384.
- Poruba, M., Kazdová, L., Oliyarnyk, O., Malinská, H., Matusková, Z., Tozzi di Angelo, I., *et al.* (2015). Improvement bioavailability of silymarin ameliorates severe dyslipidemia associated with metabolic syndrome. *Xenobiotica.*45(9): 751-6.
- Powers, S., Jackson, M. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88: 1243-76.
- Powers, SK.,Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 58: 1025-33.
- Preynat, A. (2009). Interactions acide folique-vitamine B₁₂-méthionine: effets sur le métabolisme hépatique et la productivité des vaches laitières.Chapitre III Lactational Performance of Dairy Cows According to Folic Acid and Vitamin B₁₂ Supply and Methionine Provision. Université laval. Canada.
- Pradeep, K., Mohan, C.V.R., Gobianand, K., Karthikeyan, S. (2007). Silymarin modulates the oxidant-antioxidant imbalance during diethyl nitrosamine induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol.* 1560: 110-6.
- Prashant, T.,Ahirwae, D., Chandy, A., Ahirwar, B. (2014). Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla*. *Asian Pac J Trop Dis.* 4: 81-6S.

Q

Quenzel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionale. Tome 2 Ed CNRS. 1011.

Quig, D. (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alter Med Rev.* 3: 262-9.

R

Rahman, I., MacNee, W. (2000). Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med.* 28(9): 1405-20.

Raguso, C.A., Regan, M.M., Young, V.R. (2000). Cysteine kinetics and oxidation at different intakes of methionine and cystine in young adults. *Am J Clin Nutr.* 71: 491-9.

Ramakrishnan, G., Raghavendran, H.R.B., Vinodhkumar, R., Devaki, T. (2006). Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. *Chem Biol Interact.* 161(2): 104-14.

Ramasamy, K., Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin, *Cancer Letter.* 269(2): 352-62

Rao, M.V., Chawla, S.L., Sharma S.R. (2009). Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food Chem Toxicol.* 47(6): 1368-71.

Reed, D.J., Orrenius, S. (1997). The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 77: 1257-64

Rendall, R.E.G., Phillips, J.I., Renton, K.A. (1994). Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *Ann Occup Hyg.* 38: 921-30.

Reymond, I., Sergeant, A., Tappaz, M. (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding rat liver cysteinesulfinate decarboxylase. *Biochim Biophys Acta.* 1307 : 152-6.

Robin, S., Courdeot-Masuyer, C., Nicod, L., Jacqueson, A., Richert, L., Berthelot, A. (2004). Opposite effect of methionine supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 15: 80-9.

S

Sabiu, S., Sunmonu, T.O., Ajani, E.O., Ajiboye, T.O. (2015). Combined administration of silymarin and vitamin C stalls acetaminophen-mediated hepatic oxidative insults in Wistar rats. *Rev Bras Farmacogn.* 25: 29-34.

- Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R (2008). An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed.* 15: 9–20.
- Salman, Z.K., Refaat, R., Selima, E., El Sarha, A., Ismail, M.A. (2013). The combined effect of metformin and L-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Eur J Pharmacol.* 15; 714(1-3): 448-55.
- Sanjay, G., Nihal, A., Mirza, M.H., Ramesh, C.S. (2000). Involvement of Nitric Oxide in Nickel-Induced Hyperglycemia in Rats. *Biology and Chemistry.* 4(2): 129-138.
- Satsangi, K., Dua, K.K. (2000). Preventive effects of few dietary nutrients against aluminium toxicity in mice. In *International Conference on Probing in Biological Systems, Mumbai, India, Abstr.* 71: 186.
- Sawamoto, O., Kyo, S., Kaneda, S., Harada, M., Kishimoto, S., Koshitani, O., *et al.* (2003) Four-week intravenous repeated dose toxicity study of L-cysteine in male rats. *J Toxicol Sci.* 28: 95–107.
- Sayed, M.M., Hassaneinb, K.M.A., Senosy, W. (2014). Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Toxicol Rep.* 1: 612–20.
- Sayin, F.K., Buyukbas, S., Basarali, M.K., Alp, H., Toy, H., Ugurcu, V. (2016). Effects of *Silybum marianum* extract on high-fat diet induced metabolic disorders in rats. *Pol J Food Nutr Sci.* 66(1): 43–49.
- Schade, D.S., Eaton, R.P. (1977). The effect of short term physiological elevations of plasma glucagon concentrations on plasma triglyceride concentration in normal and diabetic man. *Horm Metab Res.* 9: 253.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 18: 567–79.
- Sekhar, R.V., McKay, S.V., Patel, S.G., Guthikonda, A.P., Reddy, V.T., Balasubramanyam, A., Jahoor, F. (2011). Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care.* 34: 162–7.
- Selvam, R., Kurien, T.B. (1992). Restoration of antioxidants in liver by methionine feeding in experimental rat urolithiasis. *Indian J Biochem Biophys.* 29(4): 364-70.
- Seow, H. F., Broer, S., Broer, A., Bailey, C. G., et al. (2004) Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet.* 36:1003-7.
- Shackebaei, D., King, N., Shukla, B., Suleiman, M. S. (2005). Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine. *Mol Cell Biochem.* 277 (1-2), 27-31

Shaker E., Mahmoud H., Mnaa S. (2010). Silymarin, the antioxidant component and *Silybum marianum* extracts prevent liver damage. *Food Chem Toxicol.* 48: 803–6.

Shannon, H.S., Walsh, C., Jadon, N., Julian, J.A., Weglo, J.K., Thornhill, P.G., Cecutti A.G. (1991). Mortality of 11,500 nickel workers--extended follow up and relationship to environmental conditions. *Toxicol Ind Health.* 7(4): 277-94.

Shirakawa, Y., Kusaka, Y., Fujimura, N., Kato, M., Heki, S and Morimoto, K. (1990). «Hard Metal Asthma: Cross Immunological and Respiratory Reactivity between Cobalt and Nickel», *Thorax.* 45: 267-71.

Shulman G.I. (2007). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106: 171–6, 47.

Singh, R.P., Tyagi, A., Sharma, G., Mohan, S., Agarwal, R. (2008). Oral silibinin inhibits *in vivo* human bladder tumor xenograft growth involving down-regulation of survivin. *Clin Cancer Res.* 14(1): 300-8.

Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I. (2005). Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition.* 25: 151-75.

Sindel, B.M. (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research.* 31: 189-201.

Sirover, M.A., Loeb, L.A. (1976). Metal-induced infidelity during DNA synthesis. Proc Natl AcadSci, (U.S.A). 73: 2331-5.

Sivitz, W I., Yorek, M.A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.*12: 537-77.

Sli. (2000). Anoral (gavage) two-generation reproduction toxicity study in Sprague-Dawley rats with nickel sulphate hexahydrate. Prepared by Springborn Laboratories, Inc., Spencerville, OH, for Nickel Producers Environmental Research Association, Durham, NC (Study No. 3472.2).

Slyshenkov, V.S., Shevalye, A.A., Liopo, A.V., Wojtczak, L. (2002). Protective role of L-methionine against free radical damage of rat brain synaptosomes. *Acta Biochim Pol.* 49: 907-16.

Smaoui, M., Ghorbel, F., Bougelben, M., Makni-Ayadi, F., El Feki, A. (2000). Impact de l'exposition chronique aux gaz d'échappement d'origine automobile sur certains biomarqueurs touchant la fonction hormonale sexuelle male, la fonction rénale et l'hémogramme chez le rat, *Pollution atmosphérique, (Paris).* 167: 439-49.

Smith, M.K., George, E.L., Stober, J.A., Feng, H.A., Kimmel, G.L. (1993). Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure. *Environ Res.* 61: 200-11.

Sobolova, L., Skottova, N., Vecera, R., Urbanek, K. (2006). Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. *Pharmacol Res.* 53: 104–12.

Solerte, S.B., Gazzaruso, C., Schifino, N., Locatelli, E., Destro, T., Ceresini, G., *et al.* (2004). Metabolic effects of orally administered amino acid mixture in elderly subjects with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 22; 93(8A): 23A-29A.

Song, D., Hutchings, S., Pang, C.C.Y. (2005). Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol.* 508: 205–10.

Sonnenbichler, J., Zetl, I. (1986). Biochemical effects of the flavonolignan silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Progr Clin Biol Res.* 213: 319-31.

Sooriyaarachchi, M., White, W.M., Narendran, A., Gailer, J. (2014). Chemoprotection by D-methionine against cisplatin-induced side-effects: insight from *in vitro* studies using human plasma. *Metallomics.* 6:532-41.

Soto, C., Mena, R., Luna, J., Cerbón, M., Larrieta, E., Vital, P., *et al.* (2004). Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. *Life Sci.* 75: 2167-80.

Soudani, N., Ben Amara, I., Sefi, M., Boudawara, T., Zeghal, N. (2011). Effects of selenium on chromium (VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol.* 63: 541–54.

Sridar, C., Goosen, T.C., Kent, U.M., Williams, J.A., Hollenberg, P.F. (2004). Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyl transferases. *Drug Metab Dispos.* 32: 587–94.

Stadtman, E.R., Levine RL. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25: 207–21.

Statistiques Canada. (2012). Enquête canadienne sur les mesures de la santé: Cycle 2 (2009-2011). Sommaires et résultats relatifs aux métaux et oligo-éléments. Chapitre 8.12 Nickel. 117-25.

Stawiarska-Pieta, B., Bielec, B., Birkner, K., Birkner, E. (2012). The influence of vitamin E and methionine on the activity of enzymes and the morphological picture of liver of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem Toxicol.* 50(3-4): 972-8.

Stipanuk, M.H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr.* 24: 539-77.

Stipanuk, M.H., Londono, M., Lee, J.I., Hu, M., Yu, A.F. (2002). Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J Nutr.* 132: 3369-78.

Stengel, B. (1996). Maladies rénales d'origine toxique professionnelle. *Encycl. Med. Chir (ELSEVIER. Paris). Toxicologie. Pathologie professionnelle.* 16-530 H.10. Néphrologie-Urologie.18-067- A-10- 8.

Sun, H., Wu, W., Guo, J., Xiao, R., Jiang, F., Zheng, L., Zhang, G. (2016). Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress and male reproductive dysfunction in *Spodopteralitura Fabriciu*. *Chemosphere.* 148: 178-87.

Sunderman, F.W. (1977). A review of the metabolism and toxicology of nickel. *Ann Clin Lab Sci.* 5: 377-98.

Sunderman,F.W. (1989). A pilgrimage into the archives of nickel toxicology. *Ann Clin Lab Sci.* 19:1–6.

Sunderman, F.W., Oskarsson, A. (1988). «Nickel», *Metals and their Compounds in the Environment*, E. Merian (éd.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinhem (R.F.A.). 1-19.

T

Tamayo, C., Diamond, S. (2007). Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). *Integr Cancer Ther.* 6: 146-57.

Tandon, S.K., Singh, S., Prasad, S., Khandekar, K., Dwivedi, V.K., Chatterjee, M., Mathur, N. (2003). Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat. *Toxicol Lett.* 145: 211-7.

Taniguchi, M., Nagao, K., Inoue, K., Imaizumi, K. (2008). Cholesterol lowering effect of sulfur-containing amino acids added to a soybean protein diet in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 54(6): 448-53.

Théron, P., Denis, B. (2005). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote: effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In: Delatte, J., Beaudeau, J., Bonnefont-Rousselot, D., editors.(eds), *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques.* Cachan, France: Éditions Médicales internationales. 114–67.

Tikare, S.N., Yendigeri, S., Das Gupta, A., Dhundasi, S.A., Das, K.K. (2013). Protective effect of α -tocopherol against hematotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by nickel sulfate in male albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 57(3): 280-92.

Tissier, M. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin. Thèse Méd. Vét., Lyon.

Toborek, M., Kopieczna-Grzebieniak, E., Drozd, M., Wiczorek, M. (1996). Increased lipid peroxidation and antioxidant activity in methionine-induced hepatitis in rabbits. *Nutrition.* 12:534–7.

Torjussen, W., Solberg, L.A., Hogetveit, A.C. (1979). Histopathological Changes of the Nasal Mucosa in Active and Retired Nickel Workers, *Br. Cancer*. 40: 568-79.

Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., Marette, A. (2007). Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu Rev Nutr*. 27: 293–310.

Troen, A.M., Lutgens, E., Smith, D.E., Rosenberg, I.H., Selhub, J. (2003). The atherogenic effect of excess methionine intake. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 15089–94.

Tweeddale, H.J., Kondo, M., Gebicki, J. M. (2007). Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Arch Biochem Biophys*. 459: 151-8.

Tyagi, A., Raina K., Singh R.P., Gu M., Agarwal C., Harrison G., *et al.* (2007). Chemopreventive effects of silymarin and silibinin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Mol Cancer Ther*. 6(12 Pt 1): 3248-55.

Tyagi, A., Sharma, Y., Agarwal, C., Agarwal, R. (2008). Silibinin impairs constitutively active TGF α -EGFR autocrine loop in advanced human prostate carcinoma cells. *Pharm Res*. 25(9): 2143-50.

U

U.K.W.I.R. (1996). A review of allergy and dermatitis associated with domestic water supplies - Rapport n°95/DW/05/14, U.K. Water Industry Research Limited eds. 27.

USAF. (1990). Nickel, In: *Installation Restoration Program Toxicology Guide*.5. Harry G. Armstrong Aerospace Medical Research Laboratory, Wright Patterson AFB, OH.

Uthus, E.O., Paellot, R.A. (1996). Dietary folate affects the response of rats to Ni deprivation. *Biol. Trace Element Res*. 52: 23-5.

V

Valenzuela, A., Aspillaga, M., Vial, S., Guerra, R. (1989). Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med*. 55: 420-2.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Inter*. 160(1): 1–40.

Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *Pharma Méd*. 18(1): 16-23.

Varghese, L., Agarwal, C., Tyagi, A., Singh, R.P., Agarwal, R. (2005). Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.*1; 11(23): 8441-8.

Velez-Carrasco, W., Merkel M., Twiss C.O., Smith J.D. (2008). Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 19(6): 362-70.

Velmurugan, B., Gangar, S.C., Kaur, M., Tyagi, A., Deep, G., Agarwal, R. (2010). Silibinin exerts sustained growth suppressive effect against human colon carcinoma SW480 xenograft by targeting multiple signaling molecules. *Pharm Res.* 27(10): 2085-97.

Velussi, M., Cernigoi, A.M., De Monte, A., Dapas, F., Caffau, C., Zilli, M. (1997). Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol.* 26: 871-9.

Viau, A.T., Leatham, J.H. (1973). Excess dietary methionine and pregnancy in the rat. *J Reprod Fert.* 33: 109-11.

W

Wahlberg, J.E. (1990). Nickel chloride or nickel sulphate, irritation from patch-testpreparations as assessed by laser doppler flowmetry». *Dermatol Clin.*8: 41-4.

Wallace, S.N., Carrier, D.J., Clausen, E.C. (2003). Extraction of nutraceuticals from Milk Thistle. part II. Extraction with organic solvents. *Appl Biochem Biotechnol.* 105-108: 891-903.

Wang, D., Verney, E., Sidransky, H. (1985). Protective effect of tryptophan and cysteine against carbon tetrachloride-induced liver injury. *Exp Mol Pathol.* 43(3): 364-74.

Wang, H.J., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T. (2008). Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor signaling enhanced silibinin-induced activation of death receptor and mitochondrial apoptotic pathways in human breast cancer MCF-7 cells. *J Pharmacol Sci.* 107(3): 260-9.

Wang, X.X., Zhu Y.Z. (2003). Effect of nickel sulfate on gonad of female rats. *Chung-Kuo Kung Kung Wei Sheng. China Public Health.* 19: 946-7.

Waring, W.S., Convery, A., Mishra, V., Shenkin, A., Webb, D.J., Maxwell, S.R. (2003). Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci.* 105(4): 425-30.

Weischer, C.H., Oldiges, H., Hochrainer, D., Kordelw. (1980). Subchronic effect induced by NIO-inhalation in wistar rats»In «Mechanisms of toxicity and hazard evaluation.Ed. 555-8.

Weiss-Sadan, T., Gotsman, I., Blum, G. (2017). Cysteine proteases in atherosclerosis. *The FEBS J.* 264(10): 1455-72.

Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., Halliwell, B. (2002). A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad. Sci.* 962:242-59.

Wiersema, j., Leon, B. (1999). *World economic plants : A standard reference*. Boca raton (FL): CRC press. LLC.

Woo, C.W.H., Prathapasinghe, G.A., Siow, Y.L., Karmin, O. (2006). Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: protective effect of folic acid supplementation. *Biochim Biophys Acta.* 1762: 656–65.

Wozniak, K., Blasiak, J. (2004). Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. *Cell Mol Biol Lett.* 9: 83-94.

Υ

Yamagishi, Y., Igarashi, M., Suzuki, A., Suguro, S., Hirano, S.I., Nagaoka, I. (2012). Evaluation of the effect of methionine and glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Exp Ther Med.* 4(4): 640-644.

Yan, Y., Wang, Y., Tan, Q., Lubet, R.A., You, M. (2005). Efficacy of deguelin and silibinin on benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia.* 7(12): 1053-7.

Yanaiida, Y., Kohno, H., Yoshida, K., Hirose, Y., Yamada, Y., Mori, H., *et al.* (2002). Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis.* 23(5): 787-94.

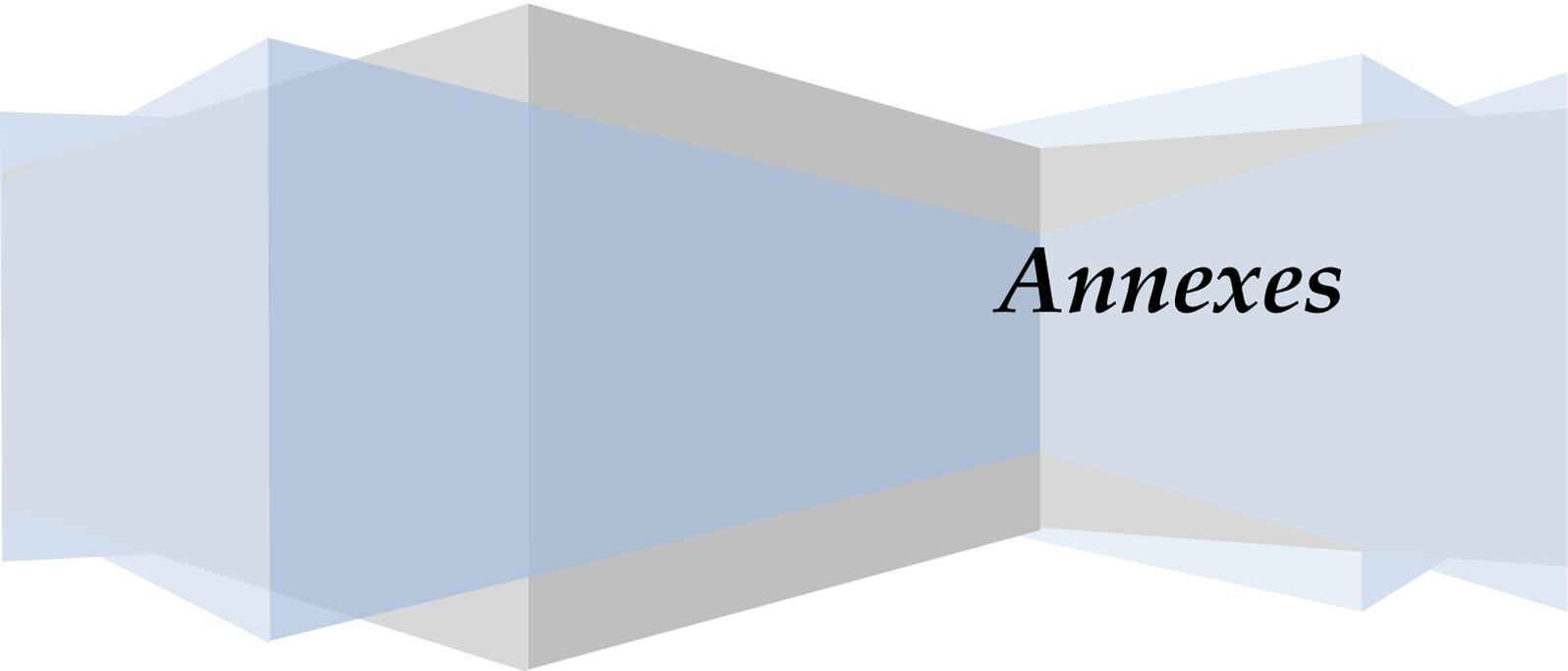
Yang, S.H., Lin, J.K., Chen, W.S., Chiu, J.H. (2003). Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *J Surg Res.* 113(1): 133-8.

Yang, Y.S., Ahn, T.H., Lee, J.C., Moon, C.J., Kim, S.H., Jun, W., *et al.* (2008). Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 46: 380–7.

Yokota, F., Matsuno, N., Suzue, R. (1979). Developmental and convalescent changes of the anemia caused by excess methionine in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol.* 25: 411-7.

Z

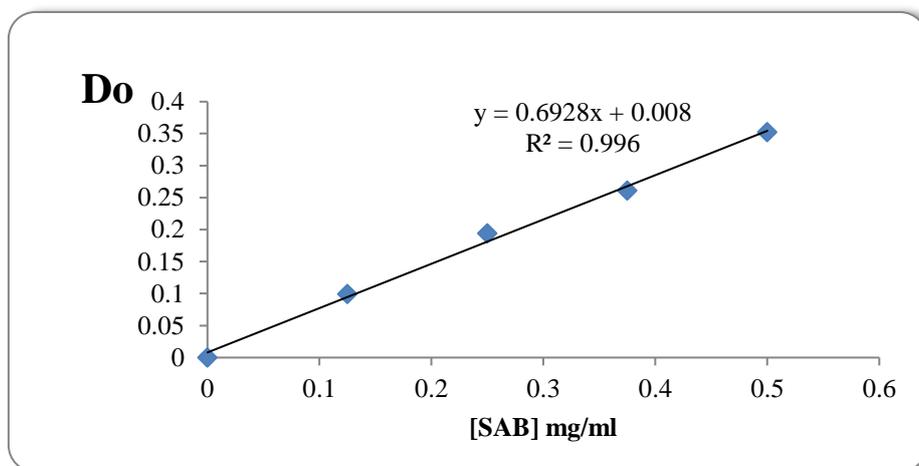
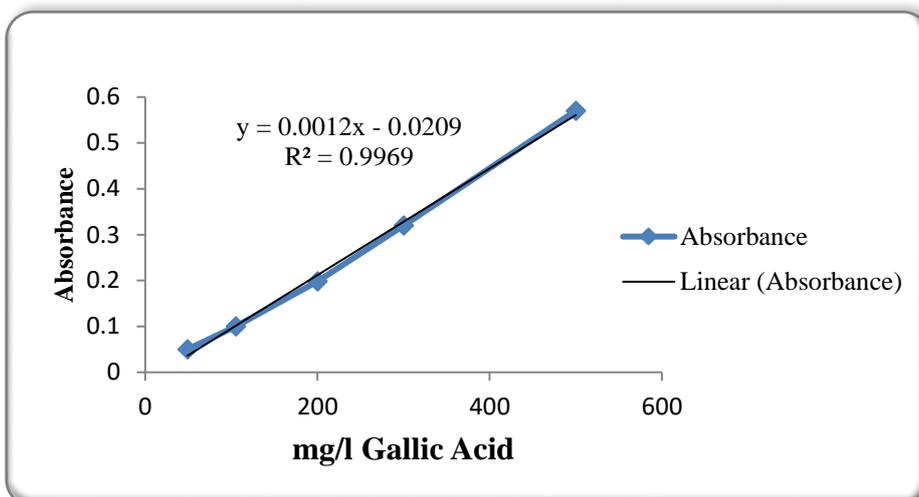
Zeynab, K.h., Shereen, B. (2014). Silymarin improves pancreatic endocrine function in rats. *Pak Vet J.* 34(2): 214-8.



Annexes

Tableau 1. Composition de l'alimentation pour un kilogramme d'aliment (ONAB).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage
Mais	620	62
soja	260	26
phosphate	16	1.6
calcaire	9	0.9
cellulose	10	1.0
minéraux	10	1.0
vitamines	10	1.0

**Figure 01:** Courbe d'étalonnage du sérum albumine bovin**Figure 02.** Droite d'étalonnages de l'acide gallique (moyenne \pm SD).

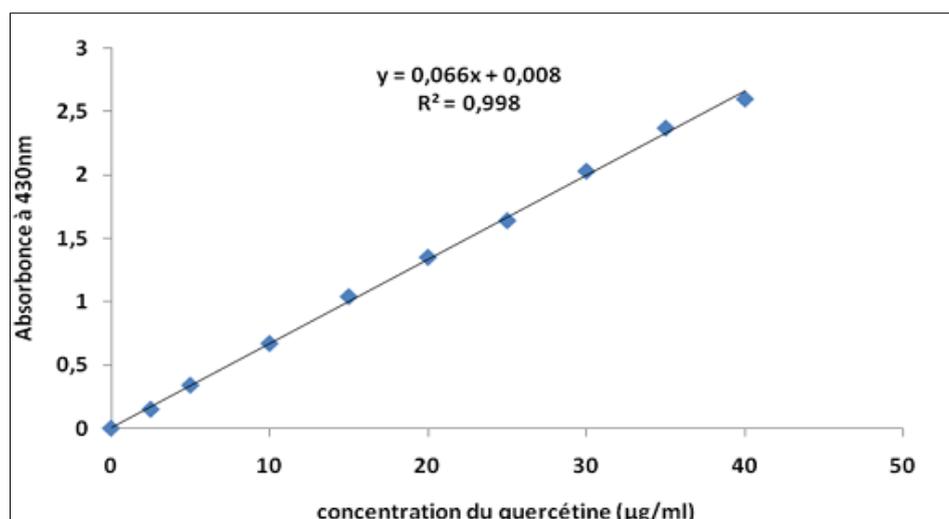


Figure 03. Droite d'étalonnages de la quercétine (moyenne \pm SD)

- ❖ Le mélange de la silymarine commercial est composé de : taxifoline (4.4%), silychristine et silydianine (17.6%) et la silybine(78%) (silybinine A et B et isosilybine A et B)

❖ Préparation des solutions

1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

- BSA (1 mg/ml) : Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.
- Réactif de Bradford : Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50 ml d'éthanol (95%). Agiter par l'agitateur pendant 2 h, puis ajouter 100 ml d'acide orthophosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1 L de solution). Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière

2. Dosage du glutathion

- Tris (0,4 M), EDTA (0,02 M) et pH 9,6 : Dissoudre 12,114 g Tris et 1,871 g EDTA dans 250 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 9,6.
- EDTA (0,02 M) : Dissoudre 5,613 g EDTA dans 750 ml d'eau distillée.
- DTNB (0,01 M) : Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.
- L'acide salicylique (0,25%) : Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100 ml d'eau distillée.

3. Dosage du MDA

- **tampon TBS** : (PH = 7,4) : Tris (50mM), NaCL (150mM) Dissoudre 8,775 g NaCL dans 1 litre d'eau distillée, puis poser 6,057g Tris et compléter le volume à 1 litre par la solution NaCl (150 mM) et ajuster le pH à 7,4.
- **La solution d'H Cl** (0,6 M) : 51,569 ml de HCl 36% dans 1litre d'eau.
- **La solution de Tris - TBA** : Dissoudre 3,149 g Tris dans 1litre d'eau distillée, puis poser 17,299 g TBA et compléter le volume à 1 L par la solution Tris(26 mM).
- **La solution de TCA – BHT** : Dissoudre 20 g TCA (**20%**) dans 100 ml d'eau distillée puis poser 1 g de BHT et compléter le volume à 100 ml par la solution TCA 20% et agiter à chaud.

4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

- GSH (0.1 mM) : Dissoudre 3,073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- TCA (1%) : Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- DTNB (1,0 mM) : Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.
- La solution de H₂O₂ (1,3mM) : 13 µl de H₂O₂ (10M) dans 100 ml d'eau distillée

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

- Tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4)
Solution A, dissoudre 6,24 g NaH₂PO₄ (2 H₂O) dans 200 ml d'eau distillée.
Solution B, dissoudre 14.32 g Na₂HPO₄ (12 H₂O) dans 200 ml d'eau distillée.
Mélanger 16 ml de la solution A avec 84 ml de la solution B

6. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD)

- Le tampon phosphate (50mM), PH = 7,8 :
Na₂HPO₄ : 4,476g } dans 250ml d'eau
NaH₂PO₄ : 1,95g } distillée.
- La solution de Na₂EDTA : 50mg dans 50ml de tampon phosphate.
- La solution EDTA – Méthionine : 11,16ml (Na₂ – EDTA) + 580mg Méthionine et compléter à 100ml par le tampon phosphate.
- La solution de NBT : 10,79mg dans 5ml de tampon phosphate.
- La solution de Riboflavine : 10mg dans 100ml de tampon phosphate

❖ Réactifs pour le dosage des paramètres biochimiques (Spinréact, Espagne)**• Réactifs pour le dosage de glucose:**

R1:	- Tampon Tris pH 7	92 mmol/l
Solution tampon	- Phénol	0,3 mmol/l

R2:	- Glucose oxydase	} R2 dissous dans R1	15 000 U/l
Enzyme	- Peroxydase		1000 U/l
	- Amino-4-Antipyrine		2,6 mmol/l

Glucose cal :	- Etalon de glucose aqueux primaire	100 mg/dl
---------------	-------------------------------------	-----------

• Réactifs pour le dosage des lipides totaux :

Réactif principale :	- phosphovainilline	235 mmol/l
Etalon :	- Etalon des lipides totaux	750 mg/dl
Réactif optimal	- Acide sulfurique H ₂ SO ₄	80 %

• Réactifs pour le dosage de cholestérol sérique :

R1:	- Pipes pH 6,9	}	90 mmol/l
Solution tampon	- Phenol		26 mmol/l

R2	- Cholestérol oxydase	R2 dissous	300 U/l
	- Peroxydase	dans R1	1250 U/l
	- Amino-4-antipyrine		0,4 mmol/l
Cholestérol cal	Standard		200 mg/dl

• Réactifs pour le dosage des triglycérides sériques :

R1:	- GOOD pH 7.5		50 mmol/l
	- P-chlorophénol		2 mmol/l
R2:	- Lipoprotéine lipase	} R2 dissous dans R1	150000 U/l
	- Glycérokinase		800 U/l
	- Glycérol 3-P-Oxydase		4000 U/l
	- Peroxydase		440 U/l
	- Amino-4- antipyrine		0,7 mmol/l
	- ATP		0,3 mmol/l
Triglycérides cal			200 mg/dl

• Réactifs pour le dosage de l'urée sérique :

R1: Tampon	- Phosphate		50 mmol/l
	- EDTA		2 mol/l
	- Salicylate de sodium		60 mmol/l
	- Nitroprussiate de sodium		32 mmol/l
R2 NaClO:	- Hypochlorite de sodium		140 mmol/l
	- Hydroxyde de sodium		150mmol/l
R3 Enzymes :	-Uréase		3000 U/l
Dissoudre une tablette R3 (enzymes) dans R1 (tampon). R2 (NaClO) est préparé pour l'utiliser.			
R4 Etalon:			50 mmol/l

• Réactifs pour le dosage de la créatinine sérique :

R1:	- Acide picrique	} Mélanger R1 et R2.	17,5 mmol/l
R2:	- Hydroxyde de sodium		0,27 mol/l
R3 Etalon:			2 mg/dl

• Réactifs pour le dosage de l'acide urique :

R1 tampon:	- Tampon Phosphate pH 7,4		50 mmol/l
	- Dichloro 2-4 Phénolsulfonate		4 mmol/l
R2 Enzymes:	- Uricase	} R2 dissous dans R1	60 U/l
	- Peroxydase		660 U/l
	- Amino-4-Antipyrine		1 mmol/l
R3 Etalon:			6 mg/dl

• Réactifs pour le dosage des protéines totales :

R1 de Biuret	- Sodium potassium tartrate		15 mmol/l
--------------	-----------------------------	--	-----------

	- Sodium iodique	100 mmol/l
	- Potassium iodique	5 mmol/l
	-Cuivre de sulfate	19 mmol/l
R2 Etalon:	-Sérum bovine albumine	7 g/dl

• **Réactifs pour le dosage de l'activité de la bilirubine totale:**

R1 Solution tampon:	- Acide sulfonique	30 mmol/l
	- Acide hydro chlorhydrique	150 mmol/l
R2 substrat et enzymes:	- Acide sulfonique	30 mmol/l
	- Acide hydro chlorhydrique	150 mmol/l
	- Dimethyl sulfoxyde	7 mol/l
R3:	- Nitrite de sodium	29 mmol/l
R4 Facultatif:	- Etalon de bilirubine	Ref : 1002250

• **Réactifs pour le dosage de l'activité de l'aspartate amino-transférase (ASAT)**

R1 Solution tampon:	- Tampon Tris pH 7,8	80 mmol/l
	- L-aspartate	200 mmol/l
R2 substrat et enzymes :	- NADH	0,18 mmol/l
	- LDH	800 U/l
	- MDH	600 U/l
	- Oxoglutarate	12 mmol/l

} R2 dissous
dans R1

• **Réactifs pour le dosage de l'activité de l'alanine amino-transférase (ALAT)**

R1 Solution tampon:	- Tampon Tris pH 7,5	100 mmol/l
	- Alanine	500 mmol/l
R2 substrat et enzymes:	- NADH	0,18 mmol/l
	- LDH	1200 U/l
	- A-Cétoglutarate	15 mmol/l

} R2 dissous
dans R1

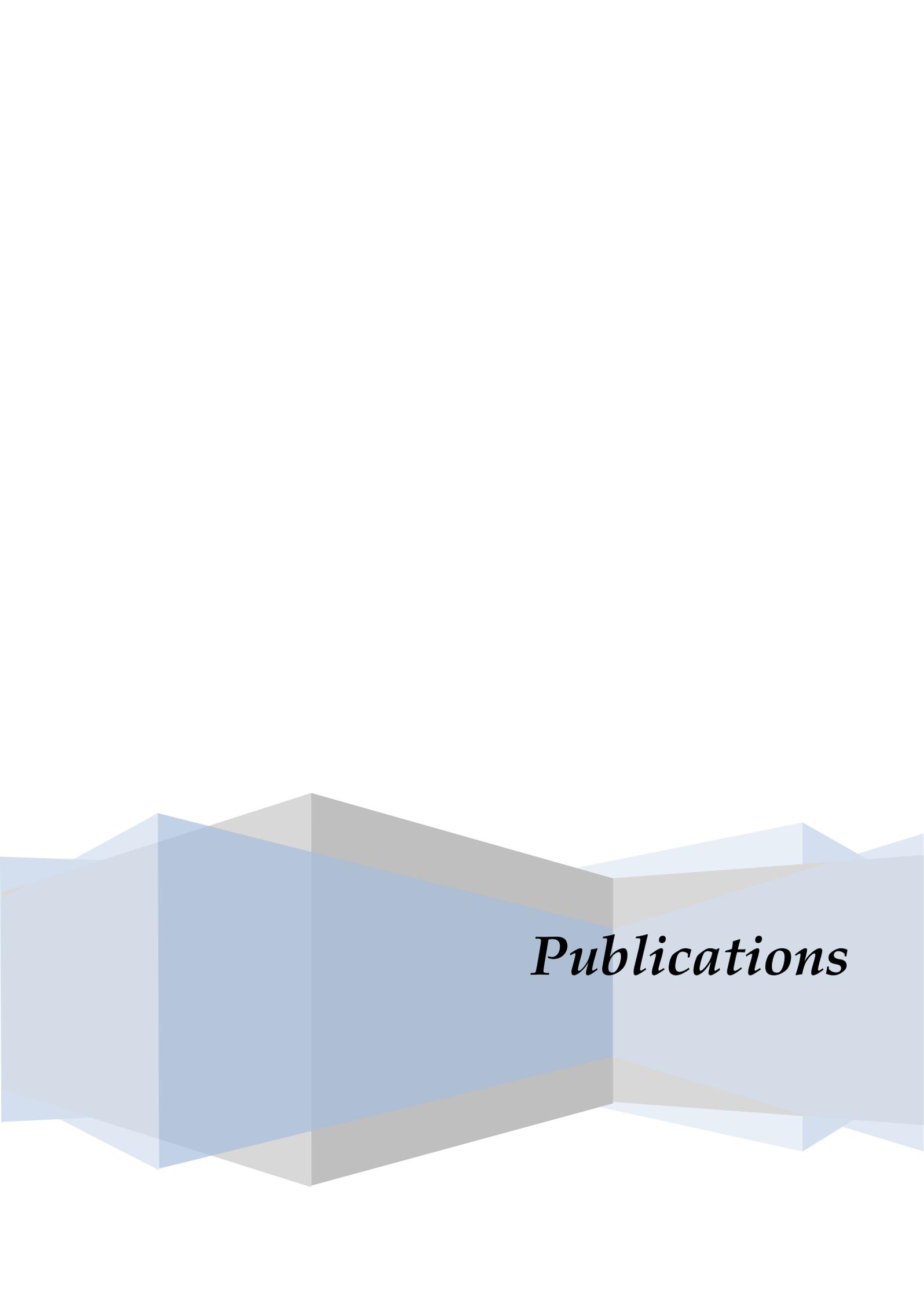
• **Réactifs pour le dosage de l'activité de l'alcalin phosphate (ALP) :**

R1 Solution tampon:	- Diethanolamine pH 10.4	1 mmol/l
	- Chloride de magnésium	0,5 mmol/l
R2 substrat:	- p-Nitrophenylphosphate	10 mmol/l

Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans une bouteille du réactif 1 (tampon).

• **Réactifs pour le dosage de l'activité de lactate dehydrogénase (LDH)**

R1 Solution tampon:	- Imidazole	65mmol/l
	- Pyruvate	0,6 mmol/l
R2 substrat:	- NADH	0,2 mmol/l
R2 dissous dans R1		



Publications

Publications

- 1- **BOUHALIT S**, Kechrid Z. Protective Effect of Silymarin Extracted from *Silybum marianum* Seeds upon Nickel-Induced Hepatotoxicity in Albino Wistar Rats. *Annals of Microbiology and Immunology*. 2018 ;1(1) :1-5.
- 2- **BOUHALIT S**, Kechrid Z. Assessment of the potential role of L- methionine on nickel sulfate induced renal injury and oxidative stress in rat. *Asian J Pharm Clin Res*, 2018 ; 11(5) : 390-394
- 3- **BOUHALIT S**, ...et al. Effect of silymarin extracted from *Silybum marianum* on nickel hematotoxicity and nephrotoxicity in male albino wistar rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2017 : 9(8), 84-89.
- 4- Hamdiken M, **BOUHALIT S**, Kechrid Z. Effect of *Ruta chalepensis* on Zinc, Lipid Profile and Antioxidant Levels in the Blood and Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats Fed Zinc-Deficient Diets. *Canadien journal of diabetes*. 2017; 1-9.
- 5- Kechrid Z, **BOUHALIT S**. Preventive Effect of Zinc on Nickel Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Albino (Wistar) Rats. *Inter J Chem Mol Eng*. 2014 :1;6.
- 6- Khiari M, Hamdikhen M, **BOUHALIT S**, Kechrid Z. An Investigation Of Enzymes Activities In Nickel Toxicity Of Albino (wistar) Rats Administrated Magnesium. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2012:50 (4);A153.

ASSESSMENT OF THE POTENTIAL ROLE OF L- METHIONINE ON NICKEL SULFATE INDUCED RENAL INJURY AND OXIDATIVE STRESS IN RAT

SAMIRA BOUHALIT*, ZINE KECHRID

Department of Biochemistry, Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of Annaba, 23000 Annaba, Algeria. Email: bouhalitsamira@yahoo.fr

Received: 26 December 2017, Revised and Accepted: 16 February 2018

ABSTRACT

Objective: The study was designed to investigate the possible protective role of methionine (Met) in nickel sulfate induced oxidative stress in renal tissue.

Methods: Rats were divided into the following groups: Healthy control; L-methionine (Met, 100 mg/kg, orally); nickel sulfate (Ni, 20 mg/kg, intraperitoneally); and combination Ni+Met. The experiment lasted 21 days. Antioxidant and renal function parameters with histological study were performed.

Results: In the Ni group, marked renal damage was noticed with the significant elevation in the levels of creatinine, urea, and uric acid in serum. Animals also showed a significant rise in the lipid peroxidation level with a concomitant decrease in glutathione (GSH) and various antioxidant enzymes GSH peroxidase, catalase, and superoxide dismutase. Moreover, these changes in rats given the combined therapy nickel plus methionine were significantly less than those of group nickel, met prevented these alterations and maintained the antioxidant status. Histopathological examination of the kidney tissue proved the protective effect of Met against nickel toxicity.

Conclusions: These results demonstrated that methionine augments antioxidant defense against nickel-induced toxicity and provides evidence that it has therapeutic potential as a renoprotective agent.

Keywords: Nickel, Methionine, Nephrotoxicity, Oxidative stress.

© 2018 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i5.24432>

INTRODUCTION

The toxicity of nickel (Ni) has become an object of great interest because of extensively distributed in environmental occurrence. Humans are exposed to nickel through food, water and air produced from wide different sources, including the production of stainless steel, alloys, electroplating, catalysts, foundries, batteries, welding rods, coinage, jewelry, paints, and dental and medical implants [1]. Several studies have reported that nickel can cause harmful effects to people and animal health; nickel provokes oxidative stress and induces cytotoxicity [2]. It may generate reactive oxygen species (ROS), which react with several cellular molecules, causing lipid peroxidation (LOP), protein oxidation, DNA damage, and results in cell apoptosis, and various cell injuries [3]. The oxidative damage may be related also to the destruction of thiol groups of amino acids and proteins [4]. Moreover, this metal decreases reduced glutathione (GSH) and a large number of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase, resulting a cell damage which has related to the accumulation of free-radicals in the cell [5]. A significant medical improvement has been shown to be associated with giving antioxidants as adjuvant therapy. The coadministration of sulfur-containing amino acids has been proved to be beneficial in the decline of oxidative stress and increase the tissue antioxidant status of rats. Methionine, in addition to its role as a methyl donor and as an essential amino acid to protein synthesis, serves as a precursor for GSH synthesis and has a crucial role in the detoxification of free radicals [6]. Since methionine can also help with chelation, the thiol group tightly binds with metals and thus serves as an important antioxidant [7,8]. The purpose of this study was to investigate the possible protective effect of methionine against nickel-induced renal oxidative stress in rats.

METHODS

Chemicals

Ni as nickel sulfate, (L-methionine) and all other chemicals used in the experiment were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, France, all other chemicals used were of analytical grade.

Experimental procedure

Male Wistar rats weighing 180–220 g (provided by the Pasteur Institute of Algiers) were used in this study. Animals were housed in cages and maintained under standard conditions of temperature and humidity with 12 h light/dark cycle, with free access to the standard pellet diet and water for 2 weeks as an adaptation period. The experimental procedures were carried out according to the guidelines for the care and use of animals approved by the National Institute of Health and the Ethics Committee of our institution. The rats were divided into four groups (seven rats each): The first group served as a control? The second group treated with L-methionine (100 mg/kg bw. orally). The third Group administrated with nickel sulfate (20 mg/kg bw. i.p), and the fourth was given both nickel and L-methionien on alternate days for 3 weeks. At the end of the experimental period, animals were sacrificed by cervical decapitation after overnight fasting. Serum was separated by centrifugation (at 3000 g for 10 min) and the resultant supernatant was stored at -20°C for the biochemical analysis. The kidneys were removed, weighted, and rinsed with a physiological saline solution. A portion of the kidney was homogenized in 2 mL of buffer solution of Tris-buffered saline (TBS and pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C, and the resultant supernatant was used for the determination of LOP (MDA), reduced GSH levels, and the activity of GPx, CAT, and SOD. The kidney was dissected, fixed in 10% formalin solution and processed immediately for histological examination.

Determination of biochemical parameters

Creatinine, urea, and uric acid were measured as functional markers for nephrotoxicity. They were assessed using commercially available diagnostic kits (Spin react, Spain, ref: Creatinine - 1001111, urea - 1001329, and uric acid - 1001011), according to the enzymatic colorimetric method and using a spectrophotometer.

Protein quantification

The protein content of kidney homogenate was determined according to the method of Bradford [9] using bovine serum albumin as a standard.

Estimation of LPO levels

The kidney tissue malondialdehyde concentrations, an index of LOP, were determined spectrophotometrically according to Buege and Aust [10]. The process is determined in the supernatant of homogenate kidney tissue by the thiobarbituric acid (TBA) method. The absorbance of the resulting TBA-MDA complex was measured at 530 nm, and the level of hepatic MDA was expressed as nmol/mg protein.

Estimation of reduced GSH concentration

Kidney reduced GSH was estimated by the method of Jollow *et al.* [11] based on the reaction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) with compounds containing sulfhydryl groups and the development of yellow color. The maximum absorbance was recorded at 412 nm. Total GSH content was expressed as nmol/mg protein.

Estimation of antioxidant enzymes activities

GSH peroxidase activity (GPx) was assayed by the method based on the reaction between GSH remaining in the solution after enzyme-catalyzed reaction with DTNB acid to form a complex which is absorbed in a maximum wavelength of 412 nm [12]. CAT activity was measured spectrophotometrically according to Aebi [13], this assay is based on the ability of the enzyme to induce the decomposition of hydrogen peroxide. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by the nitroblue tetrazolium NBT test, the oxidation of the NBT is used to determine the production of superoxide anions O₂⁻ in such superoxide-generating systems as of riboflavin/methionine complex [14].

Histopathology examination

Small pieces of kidney tissues were collected in 10% buffered formalin for proper fixation. These tissues were processed and embedded in paraffin wax. Sections of 4 µm in thickness were made and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination [15].

Statistical analysis

All experimental expressed as means ± SEM. Data comparisons were analyzed by one-way analysis of variance, followed by student's t-test. The results were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Evaluation of body and organ weights

No death was observed in any group during the experimental period. The (Ni) group showed a significant decrease in body weight ($p < 0.01$), kidney absolute weight ($p < 0.01$), and kidney relative weight ($p < 0.01$) compared to control group (Table 1). While the (Met) group along with Ni exposure (Ni+Met) observed significant restoration in the body weight, kidney both absolute, and relative weights as compared to (Ni) group.

Effect of treatments on functional kidney markers

Treatment of rats with 20 mg/kg bw. of nickel caused a significant increase ($p < 0.01$) in the levels of serum nephritic markers (urea, creatinine, and uric acid) when compared with the control group. However, met in combination with nickel ameliorated significantly the elevation in the above-mentioned parameters (respectively, $p < 0.05$; $p < 0.01$; and $p < 0.05$) when compared with those seen in Ni-treated group (Table 2).

Effects of treatments on renal oxidative stress parameters

Table 3 shows the effect of the Met and Ni on LOP in the control and experimental groups of rats. MDA levels in renal tissues were

significantly higher ($p < 0.01$) in Ni-treated rats compared to control rats. It caused also a significant reduction of the GSH level (Fig. 1), and in the activities of GPx ($p < 0.001$), CAT ($p < 0.01$), and SOD ($p < 0.01$) (Table 3). However, the coadministration of Ni+Met led a recovery in the above-mentioned oxidative stress parameters as compared to Ni group.

Kidney histopathological changes

Next, to confirm the previous data, the histopathology of kidney was examined. Normal histology of the cortex and medulla was observed in the kidney of controls rats and the rats treated with methionine (Met) alone (Fig. 1a and b), while some nephrotoxic lesions, as indicated by glomerular and tubular degeneration and necrosis characterized by destruction of tubular epithelial cells, were noticed in rats treated with nickel (Fig. 1c). In contrast, the supplementation of the Met with Ni (Ni+Met) showed a remarkable improvement in the kidney histology (Fig.1d).

DISCUSSION

The biochemical mechanism of nickel-induced nephrotoxicity appears to trigger oxidative stress, by inducing overproduction of ROS by enhancing LOP and depleting the cellular antioxidant capacity. The increased level of Ni accumulation in the kidney could be discussed by his great affinity for SH-containing molecules such as GSH and metallothionein [16]. Hence, SH group is involved in the function of many enzymes; the Ni-SH complex possibly disturbs many functions of cell mainly mitochondrial dysfunction. The treatment of this toxicity can include chelation or antioxidant administration to remove nickel and scavenge generated ROS. There are many appreciated studies have demonstrated the potential use of methionine, as ROS scavenger, possesses potent antioxidant activity on the basis of its sulfhydryl group within its structure, has metal chelating property [17] and is currently being used clinically to diminish hepatic injuries after acetaminophen poisoning [18]. Therefore, this study aimed to assess and examine the possibility of methionine to prevent the alterations induced by nickel sulfate in kidney tissues of male albino Wistar rats.

The body weight change is used as a good indicator of the overall health status. In our study, changes in rats' body weight along with kidney weights can act as an essential indication of Ni toxicity. This is in agreement with earlier reports that nickel treatment leads to retarded

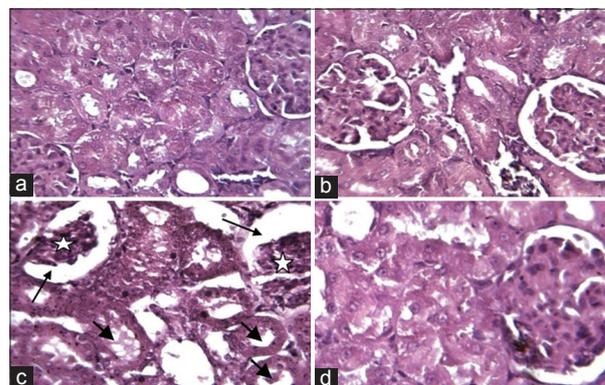


Fig. 1: Light photomicrograph of kidney sectional histology from control rats (a), L-methionine (c), nickel (d) and Ni+ Met (f) (H&E, X 400). (a and b) Kidney sections from control and methionine groups show the normal appearance of glomeruli and tubules.

(c) Kidney section from nickel treated rat showing a severe glomerular degeneration (star), wide Bowman's space (single arrow), vacuolar degeneration of tubular epithelial cells (dashed arrow), and tubular necrosis invaded by inflammatory cells. (d) Kidney section from a rat coadministered methionine with nickel showing improvement in the kidney architecture shown by slight lesion of the tubules when compared with those receiving only Ni

Table 1: Body weight (g), absolute (g), and relative kidney weights (g/100 g bw) of rats in control and treatment groups

Parameters	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Absolute kidney weight (g)	Relative kidney weight (g/ 100 gbw)
Control	201.33±6.5	250.3±6.8	0.6±0.03	0.45±0.02
Met	201.2±5.15	239.3±4.9	0.58±0.04	0.48±0.03
Ni	202.33±6.9	181.7±11.3 ^{a1}	0.8±0.03 ^{a1}	0.92±0.1 ^{a1}
Ni+Met	200±4.9	216.3±7.6 ^a	0.63±0.03 ^b	0.58±0.04 ^{ab}

Values are given as mean±SEM of seven rats each group. Statistically differences from control: ^ap<0.05, ^{a1}p<0.01, ^{a2}p<0.001; from Ni: ^bp<0.05, ^{b1}p<0.01, ^{b2}p<0.001

Table 2: Serum biochemistry changes of control and rats treated with methionine (Met), nickel (Ni), or their combination (Nit+Met) after 3 weeks of treatment

Parameters	Urea	Creatinine	Uric acid
Control	37.32±2.28	5.68±0.34	2.5±0.17
Met	31.75±1.98	6.15±0.17	2.81±0.14
Ni	55.02±5.29 ^{a1}	8.1±0.44 ^{a1}	3.88±0.24 ^{a1}
Ni+Met	38.3±1.93 ^b	5.76±0.29 ^{b1}	3.0±0.2 ^b

Values are given as mean±SEM of seven rats each group. Statistically differences from control: ^ap<0.05, ^{a1}p<0.01, ^{a2}p<0.001; from Ni: ^bp<.05, ^{b1}p<0.01, ^{b2}p<0.001

animal growth and increase in organ-somatic index [19,20]. Our results were in accordance with those reported by Amudha and Pari [2], who mentioned a significant increase in the relative kidney weight in Ni-treated male rats. However, our results were opposing those reported by Dahmen-Ben Moussa *et al.* [21] and Adeyemi and Elebiy [20] who exhibited that Ni treatment resulted in a significant decrease in relative kidney weight. In the present work, coadministration of methionine prevented changes in relative kidney weight and body weights. Methionine is essential amino acids for the adequate growth and development of mammals, his ingestion in diet and supplements is required [22,23]. Tsiagbe *et al.* [24] reported that methionine directly influences broiler chicken's growth. Furthermore, excess usage of methionine can also have an adverse influence on growth. However, methionine deficiency diminishes the relative weight of the lymphoid organs, which can affect the growth [25]. In the study above, supplementation with 20 or 40 g/kg excessive methionine was found to diminish food intake and reduce weight gain [26].

Renal dysfunction is often manifested with elevation in serum levels of creatinine and urea. This elevation in the levels of renal functional markers is an indicator of impaired glomerular filtration rate and renal failure [27]. In this way, tissue damage occurs, and renal markers are released into the circulatory system. Rats given a nickel exhibited a marked elevation in serum urea, creatinine, and uric acid, suggesting the induction of nephrotoxicity in nickel treated rats. Likewise, Hfaiedh *et al.* [28] and Boulila *et al.* [5] as they noted increased creatinine and urea due to nickel and reflects its interaction with the cell membrane. Our results are also analogous to the findings of Chen *et al.* [29] and Adeyemi and Elebiyo [20].

The presence of notable histological damage in renal tissue following treatment with nickel strengthens the variation of kidney markers function. Nickel revealed severe glomerular degeneration and tubular necrosis invaded by inflammatory cells, signal the onset of chronic renal failure. According to Stengel *et al.* [30], the reduction in glomerular filtration is characterized by increased serum creatinine associated with a decrease in the number of functional nephrons. Hence, methionine might have performed an important role in maintaining the structural integrity of kidneys cells, which has resulted in reduced leakage of creatinine, urea, and uric acid, coadministration of methionine exhibited few changes after 3 weeks of treatment compared to nickel group. Methionine plays an important role as intermediary in the maintenance of cell membranes [31], and it has an important function for some reactions involved in protein and DNA synthesis [32].

These renal functional abnormalities were known to be accompanied by high renal oxidative stress. Lipid peroxidation is the main mechanism for oxidative stress induced by nickel [33], MDA is the major metabolite of LOP, and widely used as a biomarker for the assessment of LOP, its elevated levels could reflect the degrees of LOP injury in the rat kidney receiving Ni. Similar results were observed by Boulila *et al.* [5] and Hasanein and Felegari [34]. However, treatment with methionine significantly reversed these changes and reduced the levels of MDA in Ni-exposed rats suggesting its protective effects against oxidative damage. Hence, it may be plausible that the mechanism of renal protection of methionine is due to its antioxidant effect, methionine acts as a powerful free radical scavenger and confers some protection on the kidney tissue of Ni treated animals [22,35].

The antioxidant defense systems function relies on GSH and endogenous antioxidative enzymes, act cooperatively as free radical scavengers that protect and repair damage. Therefore they can protect the body from oxidative stress and degenerative diseases. GSH is an essential endogenous antioxidant, acts as a cofactor for antioxidant enzymes, directly scavenging ROS and protects cells against free radicals and toxic compounds [36]. The results of nickel exposure were coincide with the findings of Amudha and Pari [2] and Boulila *et al.* [5]. A significant increase in the renal GSH level was observed in the rats treated with nickel and methionine might be due to GSH regeneration. Methionine is readily adopted by the hepatocytes than cysteine for the direct synthesis of GSH [37]. In addition, GSH is influenced by dietary sulfur amino acid intake [38]. Reports have proved that supplementation of methionine can enhance the formation of GSH in human, rat, and broiler cells [39-41]. Antioxidant enzymes (GPx, CAT, and SOD) can protect against free radicals by converting them back to more stable molecules in the cell. The primary function of GPx is to lessen lipid hydroperoxides to their corresponding alcohols and assist to reduce free hydrogen peroxide to water and oxygen at the expense of the GSH. SOD and CAT are the enzymes, which act by converting superoxide (O₂⁻) into H₂O₂ and then into H₂O and O₂. It has been reported that Ni itself may catalyze hydroxyl radical generation through the Haber-Wiess reaction [42]. Through the absence of enough GPx activity or GSH levels, LOP and hydrogen peroxide are not detoxified and perhaps converted by transition metals to hydroxyl radicals and lipid peroxyl radicals. The findings were similar to the results of Kubrak *et al.* [36] and Dahmen-Ben Moussa *et al.* [21] who found decreased GPx, CAT and SOD activities in the rat kidney by Ni cytotoxicity of antioxidant capacity may be coupled with the depletion of GSH and reduced total sulfhydryl contents or with their increased utilization for quenching free radicals and/or their inactivation by excessive Ni oxidation. Furthermore, Ni was reported to trigger nitric oxide (NO) creation [43], which may inhibit both CAT activities by binding to its heme prosthetic group [44] and GPx activity [45]. The coadministration of methionine showed marked elevation in the antioxidant activities in kidney tissue in comparison with the toxic group. Dietary methionine supplementation protects against renal injury induced by fluoride intoxication in rats and improved the activities of SOD and GSH-Px [46]. In addition to GSH synthesis and other metabolites, thiol groups in this amino acid might have helped in chelation of nickel from the tissue. Moreover, methionine can even directly scavenge the ROS including the hydroxyl radical and hydrogen peroxide, which can cause the oxidation of methionine as a free amino acid or protein residue [35].

Table 3. Lipid peroxidation levels and antioxidants parameters in kidney of control and rats treated with methionine (Met), nickel (Ni) or their combination (Nit+Met) after 3 weeks of treatment

Parameters	MDA (nmol/mg protein)	GSH (nmol/mg protein)	GPx (nmolGSH/mg prot)	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg}$ protein)	SOD (U/mg protein)
Control	0.5 \pm 0.03	90 \pm 1.62	0.83 \pm 0.02	67.58 \pm 2.6	75.92 \pm 1.98
Met	0.46 \pm 0.01	88.8 \pm 2.36	0.72 \pm 0.01	58.88 \pm 2.87	67.58 \pm 2.6
Ni	0.75 \pm 0.05 ^{a1}	70.83 \pm 2.67 ^{a1}	0.66 \pm 0.02 ^{a2}	53.17 \pm 1.96 ^{a1}	52.2 \pm 2.28 ^{a1}
Ni+Met	0.48 \pm 0.02 ^b	86.55 \pm 2.9 ^{b1}	0.83 \pm 0.03 ^b	60.03 \pm 2.1 ^{b1}	60.07 \pm 2.63 ^b

Values are given as mean \pm SEM of seven rats each group. Statistically differences from control: ^ap<0.05, ^{a1}p<0.01, ^{a2}p<0.001; from Ni: ^bp<.05, ^{b1}p<0.01, ^{b2}p<0.001

CONCLUSION

The findings in our study clearly showed that methionine ameliorated the oxidative and histological damage caused by nickel. These results may indicate that methionine is beneficial as a protective agent in nickel-induced nephrotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research project N^o: F01120140045 funded by the Ministry of Higher Education, Algeria. Furthermore, authors are thankful to Pr. Elfeki abdalfattah for providing all the facility to successfully complete our work.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

Author Bouhalit S, data collection and analysis, interpretation of data, drafting article, writing manuscript, author Pr. Kechrid. Z critical revision of the article and validated the manuscript.

CONFLICT OF INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Buekers J, De Brouwere K, Lefebvre W, Willems H, Vandenbroele M, Van Sprang P, *et al.* Assessment of human exposure to environmental sources of nickel in Europe: Inhalation exposure. *Sci Total Environ* 2015;521-522:359-71.
- Amudha K, Pari L. Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2011;193:57-64.
- Sun H, Wu W, Guo J, Xiao R, Zheng L, Zhang G. Effects of nickel exposure on testicular function, oxidative stress and male reproductive dysfunction in *Spodopteralitura Fabriciu*. *Chemosphere* 2016;148:178-87.
- Saravanan N, Senthil D, Varalakshmi P. Effect of l-cysteine on lipid peroxidation in experimental urolithiatic rats. *Pharm Res* 1995;32:165-9.
- Boulila S, Elfeki A, Oudadesse H, Elfeki H. Substitution effects of a carbonated hydroxyapatite biomaterial against intoxication chloride nickel-exposed rats. *Toxicol Mech Methods* 2015;25:155-65.
- Reed DJ. Glutathione: Toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:603-31.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amic A, Climent I, Lenz AG, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1999;186:464-78.
- Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha-tocopherol, ascorbic acid and l-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology* 2001;162:81-8.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 1984;105:302-10.
- Jollow DL, Mitchell JR, Zampaglione Z, Gillette JR. Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacol* 1974;11:151-69.
- Flohé L, Günzler WA. Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-20.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. In: Packer L, edior. *Methods in Enzymology*. 2nd ed., Vol. 105. Orlando: Academic Press; 1984. p. 121-6.
- Asada K, Takahashi M, Nagate M. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem* 1974;38:471-3.
- Haoult R. *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Ed Maloine 1984;19:225-7.
- Kadi IE, Dahdouh F. Vitamin C pretreatment protects from nickel-induced acute nephrotoxicity in mice. *Arh Hig Rada Toksikol* 2016;67:210-5.
- Caylak E, Aytakin M, Halifeoglu I. Antioxidant effects of methionine, a-lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Exper Toxicol Pathol* 2008;60:289-94.
- Onaolapo OJ, Adekola MA, Azeze TO, Salami A, Onaolapo YA. L-Methionine and silymarin: A comparison of prophylactic protective capabilities in acetaminophen-induced injuries of the liver, kidney and cerebral cortex. *Biomed Pharmacother* 2017;85:323-33.
- Dahdouh F, Attalah S, Djabar MR, Kechrid Z. Effect of the joint supplementation of Vitamin C and Vitamin E on nickel Heamatotoxicity and nephrotoxicity in male swiss albino mice. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8:234-9.
- Adeyemi OS, Elebiyo TC. *Moringa oleifera* supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in wistar rats. *J Nutr Metab* 2014;2014:958621.
- Dahmen-Ben Moussa I, Bellassoued K, Athmouni K, Naifar M, Chtourou H, Ayadi H, *et al.* Protective effect of *Dundaliella* sp., lipid extract rich in polyunsaturated fatty acids, on hepatic and renal toxicity induced by nickel in rats. *Toxicol Mech Methods* 2016;26:221-30.
- Al-Masri SA. Effect of doum and methionine combination on hepatotoxicity in rats. *Aust J Basic Appl Sci* 2012;6:392-7.
- Shen YB, Weaver AC, Kim SW. Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. *J Anim Sci* 2014;92:5530-9.
- Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE, Sunde ML. Enhanced immune-responses in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. *Poult Sci* 1987;66:1147-54.
- Carew LB, McMurtry JP, Alster FA. Effects of methionine deficiencies on plasma levels of thyroid hormones, insulin-like growth factors-I and -II, liver and body weights, and feed intake in growing chickens. *Poult Sci* 2003;82:1932-8.
- D'Mello JP, D'Mello J. An outline of pathways in amino acid metabolism. In: D'Mello JP, editor. *Amino Acids in Animal Nutrition*. Wallingford: CABI Publishing; 2003. p. 71-86.
- Karale S, Kamath JV. Protective role of daidzein against cyclophosphamide induced nephrotoxicity in experimental rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9:103-7.
- Hfaïedh N, Allaqui MS, Hfaïedh M, El Feki A, Zougui L, Croute F. Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *J Food Chem Toxicol* 2008;46:3759-63.
- Chen CY, Lin TK, Chang YC, Wang YF, Shyu HW, Lin KH, *et al.* Nickel(II)-induced oxidative stress, apoptosis, G2/M rest, and genotoxicity in normal rat kidney cells. *J Toxicol Environ Health A* 2010;73:529-39.
- Stengel B. Toxicologie, Pathologie professionnelle, 16-530-H-10; Néphrologie-Urologie 18-067-A-10. *Maladies Rénales D'origine Toxique Professionnelle*. Encyclopédie Médico Chirurgicale. Paris: Elsevier; 1996. p. 8.
- Vara E, Arias DJ, Villa N, Hernandez J, Garica C, Orti P, *et al.* Beneficial effect of S-adenosylmethionine during both cold storage and cryopreservation of isolated hepatocytes. *Cryobiology* 1995;32:422-7.
- Ahmed HH, Abdel-Wahhab MA. Protection against cadmium-induced toxicity in the rats: Potential for hidden risks. *J Egypt Soc Toxicol* 2000;22:51-7.
- Kubrak O, Husak VV, Rovenko BM, Poigner H, Mazepa MA,

- Kriews M, *et al.* Tissue specificity in nickel uptake and induction of oxidative stress in kidney and spleen of goldfish *Carassius auratus*, exposed to waterborne nickel. *J Aqua Toxicol* 2012;118-119:88-96.
34. Hasanein P, Felegari Z. Chelating effects of carnosine in ameliorating nickel-induced nephrotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2017;95:1426-32.
35. Soares MS, Oliveira PS, Debom GN, da Silveira Mattos B, Polachini CR, Baldissarelli J, *et al.* Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino Acids* 2017;49:129-38.
36. Priya G. Antioxidant mediated defense role of *Ecliptaalba* herbal extract against ccl4 induced toxic hepatitis. *Int J Curr Pharm Res* 2017;10:29-32.
37. Reed DJ, Orrenius S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;77:1257-64.
38. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489-92.
39. Slyshenkov VS, Shevalye AA, Liopo AV, Wojtczak L. Protective role of L-methionine against free radical damage of rat brain synaptosomes. *Acta Biochim Pol* 2002;4:907-16.
40. Németh K, Mézesgaál M, Gaál T, Bartos Á, Balogh K, Husvéth F. Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox system of growing chickens. *Acta Vet Hung* 2004;52:369-78.
41. Grimble RF. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *J Nutr* 2006;136:1660-5.
42. Chen CY, Wang YF, Lin YH, Yen SF. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Arch Toxicol* 2003;77:123-30.
43. Joshi S, Hasan SK, Chandra R, Husain MM, Srivastava RC. Scavenging action of zinc and green tea polyphenol on cisplatin and nickel-induced nitric oxide generation and lipid peroxidation in rats. *Biomed Environ Sci* 2004;17:402-9.
44. Machiavelli LI, Poliandri AH, Quinteros FA, Cabilla JP, Duvilanski BH. Reactive oxygen species are key mediators of the nitric oxide apoptotic pathway in anterior pituitary cells. *Nitric Oxide* 2007;16:237-46.
45. Rauen U, Li T, Ioannidis I, de Groot H. Nitric oxide increases toxicity of hydrogen peroxide against rat liver endothelial cells and hepatocytes by inhibition of hydrogen peroxide degradation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;92:1440-9.
46. Błaszczuk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E. Influence of methionine upon the activity of antioxidative enzymes in the kidney of rats exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem Res* 2010;133:60-70.