

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université De Saida– Dr. Moulay Tahar



Laboratoire De Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation

Biologique Des Plantes

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de

Doctorat 3ième Cycle

Spécialité : Biochimie Et Toxicologie Expérimentale

Filière : Sciences biologiques

Présentée par : M. Grele Karima

Intitulé

Evaluation de l'effet préventif des extraits de quelques plantes endémiques
Thymélaea hirsuta et de *Haloxylon artéculatum* Boiss chez les rats intoxiqués au
Nickel. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale.

Thèse soutenue devant le jury composé de :

N°	Nom et prénom	Grade	Etablissement	Qualité
01	KAHLOULA Khaled	Pr.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Président
02	ADLI Djallel Eddine Houari	MCA	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Rapporteur
03	SIIMANI Miloud	Pr.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Co-rapporteur
04	AIT HAMADOUCHE NADIA	Pr.	Université Oran1- Ahmed Ben Bella	Examineur
05	HACHEM Kadda	Pr.	Université de Saida – Dr. Moulay Tahar	Examineur

Année 2021-2022

Remerciements

Avant tout, j'exprime mes remerciements à Dieu de m'avoir donné le courage et la force d'aller au bout afin de terminer ce travail et pour sa bien vaillance.

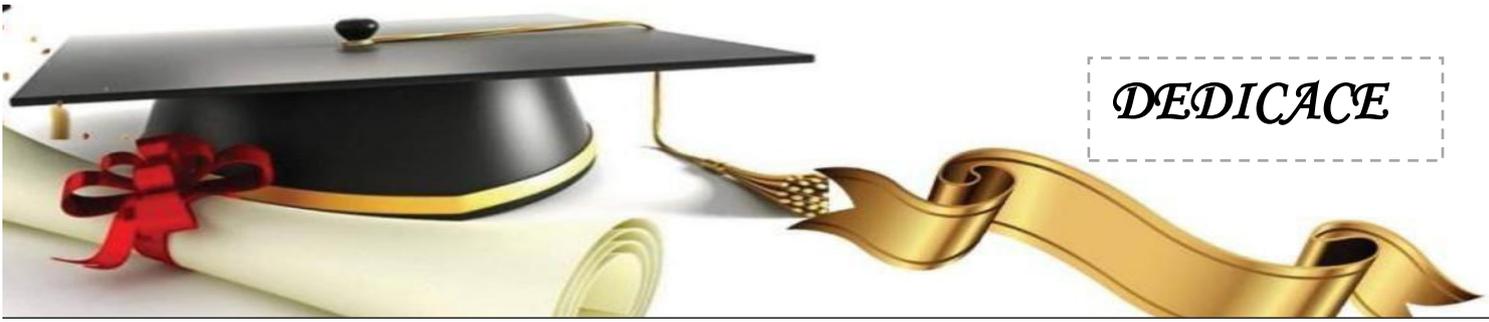
Ma profonde gratitude va à mon promoteur Mr. **ADLI Djallal Eddine Houari**, pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de m'encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations, pour toute son aide et surtout pour sa gentillesse. Aussi je le remercie profondément pour sa compréhension, sa patience et sa politesse incomparable. Vous m'avez accompagné tout au long de mon parcours universitaire, et te voilà en train de terminer avec moi le dernier parcours. Ma relation avec vous est devenue plus humaine que scientifique. J'espère que ses grandes qualités autant scientifiques qu'humaines seront reconnues à leur juste valeur.

Je remercie en particulier mon très cher Co-Encadreur **Mr professeur Slimani Miloud** pour ces conseils précieux, sa patience, son soutien, et sa disponibilité durant tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi pour sa compréhension et sa gentillesse. Vraiment monsieur vous êtes mon idole dans ma vie scientifique, et quand je parle de vous, je ne parle pas de mon professeur mais je parle de la pyramide de la connaissance, vous avez tout mon respect.

Il m'est agréable d'exprimer mes vifs remerciements à Monsieur Professeur **KAHLOULA Khaled** pour avoir accepté de présider ce jury et de participer à l'évaluation de ce travail et de l'enrichir de sa haute compétence scientifique.

Également je remercie chaleureusement Monsieur le Docteur **HACHEM Kadda** et Professeur **AIT HAMADOUCHE Nadia** pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateurs de ma thèse.

Je remercie également toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail ; votre présence, votre aide, vos encouragements m'ont été très utiles, et que j'ai l'honneur de mentionner : **AMMARI Amine**, **HAMMADI Habib** sans oublier mes très chères amies **M.BOUZIANE Amina**, **KHELAF Amel**, **LARJANI Khadidja** et **BRAHIM BRAHIMI Sohila**, **TAHIR Karoumia**. Merci infiniment.



DEDICACE

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde.

- + A mon père que dieu lui accorde son éternelle miséricorde. et mon beau père **Khamchane Merzouk** qui nous a quitté récemment.*
- + A ma douce mère qui m'a éclairée mon chemin et qui m'encouragé et soutenue toutes au long de mes études dans les meilleures conditions.*
- + A mon cher mari pour ses conseils et son soutien inconditionnel.*
- + A ma chère petite princesse **Abir***
- + A mon très cher frère : **Abdelkader** et son épouse et leur enfants freile, lamise et mohamde.
Nouredinne et son épouse et et leur enfants hadil et chirine,
Sidahmed et son épouse et leur enfants nesrin sarah, doaa et djoumana*
- + A ma très chère sœur : **Djalila** et son mari et leur enfants hichem et aya. **Amina** et son mari.*
- + A mon cher beau frère **hcen** et son épouse **Fatima** et ces fils **Reda**, **Aniss**, **Adel** et surtout **lyess** et son épouse **Zahra**.*

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer d'une part, les modifications induites par le Nickel selon différentes approches expérimentales : neurocomportementales, biochimiques et histologique chez des jeunes rats d'autre part, l'efficacité de l'huile essentielle de *Haloxylon artéculatum* (HEHa) et *Thymélaea hirsuta* (HETH) à rétablir ou non les effets néfastes du métal étudié par une injection intrapéritonéale de 0,1 ml HEHa et ou HETH/kg/j durant une période de 21 jours. L'extraction de HE de *Haloxylon artéculatum* et HE de *Thymélaea hirsuta* par hydrodistillation nous a permis d'obtenir une HEHa avec un rendement de 0,11% et HETH avec un rendement de 0,31%. La caractérisation de ces l'huiles essentielles par CPG-SM indique que les composants majeurs de l'huile HEHa sont : Thymol (14,19%), Alphaterpinène (11,02), β -E-Ocimène (9,64), 1,8-Cineole (8,69), Oleuropine (5,17%), Linalol (5,12%), Delta -3- Carène (4,12). L'activité antioxydante de l'HEHa confectionnée in vitro a montré un pouvoir de piégeage du radical libre DPPH avec une IC 50 de l'ordre de $15,06 \pm 1,45 \mu\text{g/ml}$. Même constat pour la *Thymélaea hirsuta* (HETH) qui présente une activité antioxydante ($\text{IC}_{50} = 7,83 \pm 0,307 \mu\text{g/ml}$). L'exposition chronique au Nickel à une concentration de 2g/l des rats, a permis d'observer une baisse du poids corporels et cérébral comparé à ceux des témoins. Les résultats relatifs aux tests de comportement plus précisément ceux de la dépression (froced swimming test), de l'anxiété, le test du compartiment sombre/ clair, Open field et de la mémoire spatiale, dévoilent clairement que l'intoxication au Ni provoque des troubles neurocomportementaux se traduisant par une hypoactivité locomotrice et une réduction du comportement d'exploration du milieu qui reflète l'instauration d'un état des stress, anxiété et dépression. Cette intoxication au Ni a révélé également une perturbation des différents paramètres biochimiques notamment les biomarqueurs rénaux, hépatiques et lipidique. En effet, l'étude histologique a montrée des lésions très marquées au niveau des différents tissus : rénales et hépatiques. Par ailleurs, l'administration de HEHa et HETH ont permis d'enregistrer un regain du poids corporels et cérébral des rats comparé aux rats intoxiqués. De plus, l'utilisation des différentes techniques relatives aux tests de comportements : le test de la nage forcée (FST), le test du compartiment sombre/ clair (dark and light), test de la piscine de Morris et l'Open field dévoilent clairement que HEHa et HETH corrigent l'état dépressif, l'anxiété et hypoactivité locomotrice respectivement observé chez les rats exposer au Ni. Les résultats des dosages biochimiques rénaux (urée, créatinine) et hépatique (TGO, TGP, Bilirubine totale), cholestérol totale et triglycéride montrent une correction des valeurs suite à l'administration de HEHa et HETH comparativement a avec ceux des animaux intoxiqués. L'analyse du statut antioxydant au niveau érythrocytaire indique que HEHa et HETH a rétablit l'activité des différentes enzymes antioxydants (SOD, CAT, GSH-Px) chez les rats intoxiqués et traités par HEHa ou HETH. En effets, l'étude histologique entreprise a illustrée une nette amélioration de l'architecture tissulaire principalement rénale et hépatique chez les rats intoxiqué et traité par HEHa ou HETH ce qui justifie la grande importance du *Haloxylon artéculatum* et *Thymélaea hirsuta* dans la médecine traditionnelle et ces vertus thérapeutiques.

Mots clés : Nickel, *Haloxylon artéculatum* Boiss, *Thymélaea hirsuta*, l'huile essentielle Cerveau, Foie, Rein.

Summary

The objective of this study is to evaluate on the one hand, the modifications induced by nickel according to different experimental approaches: neurobehavioural, biochemical and histological in young rats on the other hand, the effectiveness of the essential oil of *Haloxylon arbusculatum* (EOHa) and *Thymelaea hirsuta* (EOTH) to restore or not the harmful effects of the metal studied by an intraperitoneal injection of 0.1 ml EOHa and or EOTH / kg / d for a period of 21 days. The extraction of EO from *Haloxylon arbusculatum* and EO from *Thymelaea hirsuta* by hydrodistillation allowed us to obtain a EOHa with a yield of 0.11% and EOTH with a yield of 0.31%. The characterization of these essential oils by CPG-SM indicates that the major components of EOHa oil are: Thymol (14.19%), Alphaterpinene (11.02), β -E-Ocimene (9.64), 1,8-Cineole (8.69), Oleupine (5.17%), Linalool (5.12%), Delta -3- Carene (4.12). The antioxidant activity of EOHa made in vitro showed a scavenging power for the free radical DPPH with an IC₅₀ of the order of $15.06 \pm 1.45 \mu\text{g} / \text{ml}$. Same observation for *Thymelaea hirsuta* (EOTH) which exhibits antioxidant activity (IC₅₀ = $7.83 \pm 0.307 \mu\text{g} / \text{ml}$). Chronic exposure to nickel at a concentration of 2g / l in rats, observed a decrease in body and brain weights compared to those of controls. The results relating to behavioral tests, more specifically those of depression (forced swimming test), anxiety, open field and spatial memory, clearly reveal that Ni poisoning causes neurobehavioural disorders resulting in locomotor hypoactivity. and a reduction in environmental exploration behavior which reflects the onset of stress, anxiety and depression. This Ni intoxication also revealed a disruption of the various biochemical parameters, in particular the renal, hepatic and lipid biomarkers. In fact, the histological study showed very marked lesions in different tissues: kidney and liver. In addition, administration of EOHa and EOTH resulted in increased body and brain weights in rats compared to poisoned rats. In addition, the use of different techniques relating to behavioral tests: the forced swimming test (FST), the dark/light compartment test (dark and light), Morris pool test and the Open field clearly reveal that EOHa and EOTH correct the depressive state, anxiety and locomotor hypoactivity respectively observed in rats exposed to Ni. The results of the renal (urea, creatinine) and hepatic (TGO, TGP, total bilirubin total), cholesterol and triglyceride) biochemical assays show a correction of the values following the administration of EOHa and EOTH compared to those of intoxicated animals. Analysis of antioxidant status at the erythrocyte level indicates that EOHa and EOTH restored the activity of various antioxidant enzymes (SOD, CAT, GSH-Px) in poisoned rats treated with EOHa or EOTH. In effect, the histological study undertaken has illustrated a marked improvement in the tissue architecture, mainly renal and hepatic, in rats poisoned and treated with EOHa or EOTH, which justifies the great importance of *Haloxylon arbusculatum* and *Thymelaea hirsuta* in traditional medicine and these therapeutic virtues.

Keywords: Nickel, *Haloxylon arbusculatum* Boiss, *Thymelaea hirsuta*, essential oil, Brain, Liver, Kidney

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التغييرات التي يسببها النيكل من جهة وفق مناهج تجريبية مختلفة: السلوك العصبي والكيمياء الحيوية والنسجية عند الفئران الصغيرة من ناحية أخرى، فعالية الزيت العطري (زا) هالوكسيلون اغتكيلاتوم و تيميليا اغسيتا في استعادة أو عدم الآثار الضارة للمعدن المدروس عن طريق الحقن داخل الصفاق 0.1 مل لمدة 21 يوم. سمح لنا استخراج HE من *Haloxylon artéculatum* و HE من *Thymélaea hirsuta* عن طريق التقطير المائي بالحصول على HEHa بعائد 0.11% و HETH بعائد 0.31%. يشير توصيف هذه الزيوت الأساسية بواسطة GC-MS إلى أن المكونات الرئيسية لزيت HEHa هي: Thymol (14.19%) ، Alphaterpinene (11.02%) ، β -E-Ocimene (9.64%) ، Cineole (8.69%) ، 1.8-Cineole (5.17%) ، Oleuropine (5.12%) ، لينالول (5.12%) ، دلنا -3- كارين (4.12%) . أظهر النشاط المضاد للأكسدة لـ HEHa المصنوع في المختبر قدرة على حبس الجنور الحرة DPPH بـ IC 50 بترتيب 15.06 ± 1.45 ميكروغرام / مل. نفس الملاحظة لـ *Thymélaea hirsuta* (HETH) التي لها نشاط مضاد للأكسدة 7.83 ± 0.307 IC50 ميكروغرام / مل). اتاح التعرض المزمن للنيكل بتركيز 2 جم / لتر من الجرذان ملاحظة انخفاض في وزن الجسم والمخ مقارنةً بالفئران السليمة. نتائج المتعلقة بالاختبارات السلوكية ، وبشكل أكثر تحديداً تلك الخاصة بالاكنتاب (اختبار السباحة المجهد) ، والقلق ، واختبار المقصورة المظلمة / الخفيفة ، والحقل المفتوح والذاكرة المكانية ، تكشف بوضوح أن تسمم النيكل يسبب اضطرابات سلوكية عصبية تؤدي إلى نقص النشاط الحركي وتقليل سلوك الاستكشاف البيئي مما يعكس إنشاء حالة من التوتر والقلق والاكنتاب. كشف تسمم النيكل هذا أيضاً عن اضطراب في المعلمات البيوكيميائية المختلفة ، ولا سيما المؤشرات الحيوية الكلوية والكبدية والدهنية. وبالفعل أظهرت الدراسة النسجية وجود تخريب شديد الوضوح في الأنسجة المختلفة: الكلى والكبد. بالإضافة إلى ذلك ، أتاحت المعالجة بـ HEHa و HETH تسجيل الانتعاش في وزن الجسم ووزن المخ للفئران السليمة مقارنةً بالفئران المسمومة. بالإضافة إلى ذلك ، فإن استخدام التقنيات المختلفة المتعلقة بالاختبارات السلوكية: اختبار السباحة القسري (FST) ، واختبار المقصورة المظلمة / الخفيفة (الظلام والضوء) ، واختبار حمام السباحة Morris والحقل المفتوح يكشف بوضوح أن HEHa و HETH يصححان حالة الاكنتاب والقلق ونقص النشاط الحركي على التوالي الذي لوحظ عند الفئران المعرضة لنيكل. تظهر نتائج الفحوصات الكلوية (اليوريا ، الكرياتينين) والكبد (TGO ، TGP ، البيليروبين الكلي) والكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية الكيميائية الحيوية تصحيحاً للقيم بعد إعطاء HEHa و HETH مقارنةً مع الحيوانات المصابة بالتسمم. يشير تحليل حالة مضادات الأكسدة على مستوى كريات الدم الحمراء إلى أن HEHa و HETH استعادتا نشاط مختلف إنزيمات مضادات الأكسدة (SOD ، CAT ، GSH-Px) لدى الفئران المسمومة والمعالجة بـ HEHa أو HETH. في الواقع، أظهرت الدراسة النسجية التي تم إجراؤها تحسناً ملحوظاً في بنية الأنسجة ، وخاصةً الكلى والكبدية ، لدى الفئران التي تعرضت للتسمم والمعالجة بـ HEHa أو HETH ، مما يبرر الأهمية الكبيرة لمركب *Haloxylon artéculatum* و *Thymélaea hirsuta* في الطب التقليدي وفضائله العلاجية.

الكلمات المفتاحية : نيكل ، هالوكسيلون أرتيكلولاتوم بويس ، تيميليا هرسوتا ، زيت عطري ، المخ ، كبد ، كلى.

Lite des Tableaux

Tableau 01 : Les propriétés physiques du nickel d'après.....	05
Tableau 02 : voie d'exposition et le taux d'absorption et les organes cible du nickel chez l'homme et l'animal	10
Tableau 03 : Classes des polyphénols	28
Tableau 04 : Principaux acides hydroxybenzoïques	29
Tableau 05 : Principaux acides hydroxycinnamiques	29
Tableau 6 : Tableau représentant la structure de base des principaux flavonoïdes.....	31
Tableau 7 : Principaux types de coumarines	33
Tableau 08: quelques exemples des alcaloïdes et leur effet pharmacologie.	36
Tableau 09 : Les dérivés des alcaloïdes	37
Tableau 10 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes	39
Tableau 11: La composition chimique de <i>Haloxylon articulatum</i>	58
Tableau 12 : Composition chimique de <i>Thymelaea hirsuta</i>	68
Tableau 13 : Batterie de coloration Hématoxyline-éosine	92
Tableau 14: Résultat de l'extrait aqueux (EA) et l'extrait eau-méthanol (EM).	94
Tableau 15 : Résultats d'extraction de l'huile essentielle de Ha et Th.....	95
Tableau 16 : Concentration en % et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse CPG-SM de l'huile essentielle de <i>Haloxylon articulatum</i>	95
Tableau 17 : Résultats du test phytochimique de <i>Haloxylon articulatum</i> Boiss et <i>Thymelaea hirsuta</i>	97
Tableau 18 : Evaluation des paramètres pondéraux des rats témoins, NiSO ₄ et traité par HEHa.	99
Tableau 19: Evaluation des paramètres pondéraux des rats témoins, NiSO ₄ et traité par HETH.	99
Tableau 20: La comparaison du taux de nickel sanguin chez les rats témoins, intoxiqués au Ni, intoxiqués et traités à HEHa.	112
Tableau 21: La comparaison du taux de nickel sanguin chez les rats témoins, intoxiqués au Ni, intoxiqués et traités à HETH.	112
Tableau 22: Effet de HEHa sur le taux d'urée sanguin, d'acide urique et de créatinine chez des rats intoxiqués par NiSO ₄ comparés aux rats témoins.....	114
Tableau 23: Effet de HETH sur le taux d'urée sanguin, d'acide urique et de créatinine chez des rats intoxiqués par NiSO ₄ comparés aux rats témoins.....	114
Tableau 24: Effet de l'huile essentielle de la plante <i>H.articulatum</i> sur l'activité des enzymes hépatiques et la teneur en bilirubine chez des rats intoxiqués par le plomb comparés aux rats témoins.....	114
Tableau 25: Effet de l'huile essentielle de la plante <i>T.hirsuta</i> sur l'activité des enzymes hépatiques et la teneur en bilirubine chez des rats intoxiqués par le manganèse comparés aux rats témoins.....	115
Tableau 26: Effet de l'huile essentielle de la plante <i>H.articulatum</i> sur les différents paramètres biochimiques chez des rats intoxiqués par le Nickel comparés aux rats témoins.....	115
Tableau 27: Effet de l'huile essentielle de la plante <i>T.hirsuta</i> sur les différents paramètres biochimiques chez des rats intoxiqués par le nickel comparés aux rats témoins.....	115

Liste des figures

Figure 01: Représente les interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchio-alvéolaire du poumon.....	18
Figure 02: Biosynthèse des composés phénoliques.....	27
Figure 03 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes.....	30
Figure 04 : Structure des lignanes.....	32
Figure 05: Structure d'un stilbène.....	32
Figure 06 : Structure chimique d'acide gallique et d'acide ellagique.....	34
Figure 07 : Les tanins condensés.....	44
Figure 08 : structure de base de l'isoprène.....	38
Figure 09: les étapes de l'extraction des huiles essentielles.....	44
Figure 10 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	46
Figure 11: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	47
Figure 12: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique.....	48
Figure 13: Structure du DPPH.....	51
Figure 14: Mécanisme réactionnel du test FRAP.....	52
Figure 15 : Morphologie de <i>Haloxylon articulatum</i> Boiss.....	55
Figure 16: Flavonoïde isolé de <i>Haloxylon articulatum</i>	59
Figure 17 : Exemple d'alcaloïdes isolés de <i>Haloxylon articulatum</i>	60
Figure 18 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae.....	62
Figure 19 : <i>Thymelaea hirsuta</i> (Linné) Endlicher.....	64
Figure 20: A- <i>Haloxylon articulatum</i> Boiss (Remt) et B- <i>Thymelaea hirsuta</i> (Metnane) ...	71
Figure 21: Montage d'un hydrodistillateur.....	73
Figure 22: Ampoule à décanté.....	73
Figure 23: Forme libre et réduite du DPPH.....	77
Figure 24 : Schéma représentant le protocole d'expérimentation.....	80
Figure 25: Epreuve de test de la nage forcée (FST).....	82
Figure 26 : L'épreuve d'Open Field.....	83
Figure 27: Dispositif de la piscine de Morris.....	84
Figure 28 : Dispositif du double compartiment sombre/clair.....	85

Figure 29 : Déshydratation, éclaircissement et l'imprégnation en paraffine.....	90
Figure 30 : un bloc de paraffine.....	90
Figure 31 : Microtome à paraffine.....	91
Figure 32 : valeurs des IC50 exprimées en µg/ml des extraits des plantes testées et de l'acide ascorbique (contrôle positif).....	98
Figure 33: Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HEHa, Ni-HEHa. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : ***P < 0.001(T vs Ni), ***P < 0.001 (Ni vs Ni-HEHa).....	100
Figure 34: Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : ***P < 0.001(T vs Ni), ***P < 0.001 (Ni vs Ni-HETH).....	100
Figure 35 : La comparaison des différents paramètres du test d'Open-field entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM: *p<0.05(T vs Ni) ; * p<0.05 (Ni vs T.HEHa).....	102
Figure 36 : La comparaison des différents paramètres du test d'Open-field entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM: * p<0.05 (Ni vs T.HETH).....	102
Figure 37 :L'évaluation de l'effet préventif de l'huile essentielle de <i>H.articulatum</i> sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : Jr2 : **P < 0.01 (Témoin vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs.Ni.HEHa). Jr3 : ***P < 0.001 (Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HEHa). Jr4 : ***P < 0.001(Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HEHa).....	103
Figure 38:L'évaluation de l'effet préventif de l'huile essentielle de <i>T.hirsuta</i> sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : Jr2 : **P < 0.01 (Témoin vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs.Ni.HETH). Jr3 : ***P < 0.001 (Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HETH). Jr4 : ***P < 0.001(Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HETH).....	104
Figure 39: Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : **P < 0.01 (Témoin vs Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HEHa).....	105
Figure 40: Le temps passé dans le quadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : **P < 0.01 (Témoin vs Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HETH).....	105
Figure 41 : Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HEHa).....	106
Figure 42: Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : *P < 0.05 (Témoin vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HETH).....	106
Figure 43: Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM : ***P < 0.001(T vs. Ni), ***P < 0.001(Ni vs T.HEHa).....	107

Figure 44: Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : ***P < 0.001(T vs. Ni), ***P < 0.001(Ni vs T.HETh).....	108
Figure 45: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*:p<0.01).....	109
Figure 46: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*:p<0.01).....	109
Figure 47: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*:p<0.05).....	110
Figure 48: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*: p<0.05).....	110
Figure 49: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la GPx érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*: p<0.05).....	111
Figure 50: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la GPx érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (**:p<0.01).....	111
Figure 51 : Le dosage de la glycémie chez les jeunes rats témoins, intoxiqués au NiSO ₄ , intoxiqués et traités à HEHa. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; (***: p<0.001).....	113
Figure 52 : Le dosage de la glycémie chez les jeunes rats témoins, intoxiqués au NiSO ₄ , intoxiqués et traités à HETh. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; (***: p<0.001).....	113
Figure 53: La microscopie optique de tissu rénal coloré à l'hématoxyline et à l'éosine.....	117
Figure 54: La microscopie optique de tissu hépatique coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G:(x 40).....	118

Liste des abréviations

ACTH : Adénocorticotrophine hormone.

ANOVA: Analysis of variance.

°C : Degré Celsius.

CAT : Catalase.

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

CRH : Corticotrophin Realizing factor.

DDPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

EA : Extrait Aqueux.

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.

EM : Extrait eau-Méthanol.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

H.ES : Huille essentiel.

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène.

Ha : Haloxylon articulatum.

HEHa : Huille Essentiel de Haloxylon articulatum.

HETH : Huille Essentiel de Thymelaea hirsuta.

HS : Haloxylon Scoparium.

IC 50 : Concentration Inhibitrice à 50%.

IP : Intrapéritonéale.

J : jour.

Kg : Kilogramme.

Ni : Nickel.

NiSO₄ : Sulfate de Nickel.

nm : nanomètre.

SEM : erreur standard moyenne.

SOD : Superoxyde dismutase.

T : témoin.

TGO : glutamate-oxaloacetatetransaminase

TGP : glutamate- pyruvatetransaminase.

Th : Thymelaea hirsute.

TIM : Temps d'immobilité.

Liste des communications

PUBLICATIONS

Karima Grele, Djallal Eddine Houari Adli, Miloud Slimani, Hemida Houari, Dallal Kourat, Khaled Kahloula (2021). Evaluation de l'effet néphroprotecteur de l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum* chez les rats Wistar intoxiqués au Nickel. **South Asian Journal of Experimentation Biology (SAJEB)**.

COMMUNICATIONS

Liste des travaux exposés lors de colloques nationaux et internationaux présentés par la personne soulignée.

Communications internationales :

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaked, Slimani Miloud. Isolement et la pre-identification de lactobacillus dans le lait de chevre collecte de willaya de Mascara. In the third international workshop management and genetic improvement of Biological Resources(MGIBR), Milk : Production, Conservation and valorisation. 20 novembre à université Abou Bekr Belkaid à **Tlemcen**.2017.

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Kahloula Khaked, Semahi Houria, Slimani Miloud. Impact des huiles essentielles de clou de girofle «Syzugium Aromaticum » chez des rats soumis à un stress par le nickel. 3eme Congrès international de la SAN (Socité Algérienne de Nutrition) du 28 au 30 Novembre université des frères Mentouri 1 à **Constantine**.2017

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaked, Slimani Miloud. Evaluation biologique de l'efficacité de l'action fertilo-ameliorateur des extraits méthanolique de tamarix chez des rat wistar. The chair of international conference on Biotechnology :perspectives Beyond2020 Decembre 18-19 université Sultane Moulay Slimani à **Morocco**.2017.

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaked, Slimani Miloud. Contribution of the study therapeutic effects of essential oil « Syzygium Aromaticum » on wistar rats exposed for lead. 29^{ème} congrès international de l'ATSB Tunisie, 26-29 Mars-SOUSSE. TUNISIE.2018.

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaked, Slimani Miloud. Contribution à l'étude des effets thérapeutiques essentielles de « Syzygium Aromaticum » sur des rats wistar intoxiqués par le plomb et le manganèse. VI^{ème} congrès international de Biotechnologie et valorisation des Bio-Ressources l'AT-BVBRR du 20 au 23 Mars à Tabarka-Tunisie.2018

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, El Haddad djilali, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaked, Slimani Miloud. Valorisation de certaines plantes médicinales du Sud-Ouest Algérien : *thymelaea hirsuta* (métnane) et *haloxylon articulatum* Boiss (remt), Bio-Activité et caractérisation des composés phénoliques. The International Congress Valorization of Bio Resources : Application and Impact on Sustainable Development organized on November 26-27, 2019, in collaboration with the Research Laboratory Food Technology (LTRA) and National Institute of Agronomic Research of Algérie (INRAA) à **Boumerdes**.

Communications nationales :

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Semahi Houria, Slimani Miloud, Kahloula Khaked. L'effet antibactérien des plantes médicinales du sud Algérien l'*haloxylon articulatum* Boiss et *thymelaea hirsuta*. Laboratoire de recherche LBPVBP « Biotoxicologie, pharmacognosie et Valorisation Biologique des plantes » le 26 Avril 2018 . université Dr. Tahar Moulay à **Saida**.

Communication orale

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaled, Slimani Miloud. Etude biochimique et anatomopathologique de la toxicité par le nickel chez les rats wistar. Quatrième journée scientifique des Géosciences de l'environnement « JSGE4 , Saida le 26 Avril 2018 ». université Dr. Tahar Moulay à **Saida**. **Communication orale**

Grele Karima, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Kahloula Khaled, Slimani Miloud. Etude des effets thérapeutiques des extraits aqueux de *haloxylon articulatum boiss* sur des rats intoxiqués par le nickel. Quatrième journée scientifique des Géosciences de l'environnement « JSGE4 , Saida le 26 Avrie 2018 ». université Dr. Tahar Moulay à **Saida**.

Semahi Houria, Adli Djallal eddine houari, Ammam Abdelkader, Grele Karima, Fidah H, Dellaoui H, Lansari W. Activité antioxydante et composition chimique de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum Vulgare Mill* de la region de Saida. Quatrième journée scientifique des Géosciences de l'environnement « JSGE4 , Saida le 26 Avrie 2018 ». université Dr. Tahar Moulay à **Saida**.

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières	

Revue bibliographique

Introduction.....	01
Chapitre 1 : Le Nickel	03
1.1. Introduction.....	04
1.2. L'identité	04
1.3. Les propriétés physico-chimiques	05
1.4. Le nickel dans tous ses états	06
1.5. Utilisation du Nickel	06
1.6. Sources d'exposition.....	07
1.7. Toxicocinétique	08
1.7.1. L'absorption	08
1.7.2. Distribution.....	09
1.7.3. Métabolisme	09
1.7.4. Excrétion.....	10
1.8. Toxicité du nickel	10
1.8.1. Toxicité aiguë	10
1.8.1.1. Chez l'homme.....	10
1.8.1.2. Chez l'animal	11
1.8.2. Toxicité subchronique	11
1.8.2.1. Chez l'homme.....	11
1.8.2.2. Chez l'animal	11
1.8.3. Toxicité chronique	12
1.8.3.1. Chez l'homme.....	12
1.8.3.2. Chez l'animal	13
1.9. Effet du nickel sur l'organisme	13
1.9.1. Effet du nickel sur les reins	13
1.9.2. Effet du nickel sur le système hépatique	14
1.9.3. Effet du nickel sur l'appareil respiratoire	14
1.9.4. Effet du nickel sur le système endocrinien	15
1.9.5. Effets cardiovasculaires	15
1.9.6. Effets gastro-intestinaux	15
1.9.7. Effets cutanés	16
1.9.8. Effet du nickel sur les paramètres érythropoïétiques	16
1.9.9. Effet du nickel sur le système immunitaire	16
1.9.10. Effets génotoxiques	17
1.9.11. Effets cancérogènes	18
1.9.12. Effets neurogènes	19
1.9.13. Effet du nickel sur la reproduction	19
1.9.13.1. Effets du nickel sur la reproduction chez le male	19
1.9.13.2. Effets du nickel sur la reproduction chez la femelle	19
1.9.14. Le nickel induit un stress oxydatif	20

1.9.14.1. Altération de l'ADN.....	20
1.9.14.2. Oxydation des protéines.....	20
1.9.14.3. Peroxydation lipidique.....	21
1.9.14.4. Défense antioxydants contre la toxicité du nickel	21
1.10. Transfère transplacentaire du nickel	21
Chapitre 2 La phytothérapie et les huiles essentielles.....	23
2. 1.La phytothérapie	24
2.1.1 Définition	24
2.1.2. Différents types de la phytothérapie	24
2.1.2.1. Aromathérapie	24
2.1.2.2. Gemmothérapie	24
2.1.2.3. Herboristerie	24
2.1.2.4. Homéopathie	24
2.1.2.5. Phytothérapie pharmaceutique	24
2.1.3. Les plantes médicinales.....	24
2.1.3.1.Généralités.....	24
2.1.3.2. Définition.....	25
2.1.3.3. les métabolites secondaires des plantes	25
2.1.3.3.1. Classification des métabolites secondaires	25
2.1.3.3.1. 1. Les composés phénoliques	26
2.1.3.3.1.1.1. Structure et catégories des composés phénoliques	27
2.1.3.3.1.1.2. Classification des polyphénols	28
2.1.3.3.1.2. Les alcaloïdes.....	35
2.1.3.3.1.2.1. Propriétés des alcaloïdes	35
2.1.3.3.1.2. 2. Structure des alcaloïdes	35
2.1.3.3.1.2.3. Classification des alcaloïdes	36
2.1.3.3.1.2. 4. Rôle des alcaloïdes	36
2.1.3.3.1.2.5. Les dérivés des alcaloïdes	37
2.1.3.3.1.3. Les terpenoïdes	37
2.1.3.3.1.3. 1. Structure des terpenoïdes	38
2.1.3.3.1.3. 2. Classification des terpenoïdes	38
2.1.3.3.1.3. 2. Classification des terpenoïdes	38
2.2. Les huiles essentielles	39
2.2.1. Généralités	39
2.2.2. Répartition	39
2.2.3. Biosynthèse et composition chimique	39
2.2.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	40
2.2.5. Classification des huiles essentielles.....	40
2.2.6. Principaux domaines d'application.....	41
2.2.6.1. Aromathérapie.....	41
2.2.6.2. Agro-alimentaire.....	42
2.2.6.3. Cosmétologie et parfumerie.....	42
2.2.6.4. Pharmacie.....	42
2.2.7.Toxicité des huiles essentielles.....	42

2.2.8. Les techniques d'extraction des huiles essentielles	43
2.2.8.1. La distillation	44
2.2.8.1.1. L'hydrodistillation (water distillation)	44
2.2.8.1.2. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation)	45
2.2.8.1.3. L'hydrodiffusion	45
2.2.8.2. Extraction par micro-ondes	46
2.2.8.3. L'extraction au CO ₂ supercritique	47
2.2.8.4. Extraction par les solvants et les graisses	48
2.2.8.5. Expression à froid	48
2.2.9. Conditions de conservation et de stockage.....	49
2.2.10. Analyses des huiles essentielles et critères de qualité.....	49
2.2.10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	49
2.2.10.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS.....	50
2.2.11. L'activité antioxydante des huiles essentielles:.....	50
2.2.11.1. Méthodes de détermination de l'activité Antioxydante.....	50
2.2.11.1.1. Le test d'ABTS.....	50
2.2.11.1.2. Le test du DPPH.....	51
2.2.11.1.3. Le test FRAP.....	51
Chapitre 3 Les plantes étudiées.....	53
3. Les plantes étudiées.....	54
3.1. Haloxylon articulatum Boiss	54
3.1.2. Synonymes	54
3.1.3. Systématique	54
3.1.4. Noms vernaculaires	54
3.1.5. Description botanique	54
3.1.6. Aire de répartition géographique	55
3.1.7. Utilisation en médecine traditionnelle	55
3.1.8. Composition et propriétés biologiques	56
3.1.9. Activité biologique	56
3.1.10. Phytochimie	57
3.1.11. Activités Antioxydante.....	60
3.1.12. Toxicité	61
3.2. Thymelaea hirsuta.....	62
3.2.1. Généralité.....	62
3.2.2. Description botanique.....	63
3.2.3. Biologie et Ecologie.....	64
3.2.4. Classification.....	65
3.2.4.1. Classification botanique.....	

3.2.4.2. Classification phylogénétique.....	66
3.2.5. Composition chimique et utilisation.....	66
3.2.6. Activités Antioxydante.....	69
3.2.7. Propriétés et usages thérapeutiques.....	69
3.2.8. Toxicité de la plante.....	69
Partie pratique	70
Materiel et methode.....	71
1. Objectif	71
2. Matériel végétale	71
2.1. Source et conservation	71
2.2. Préparation des extraits	72
2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux (EA)	72
2.2.2. Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM)	72
2.2.3. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation	72
2.2.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/SM ...	74
2.2.5. Etude phytochimique (Analyse qualitative)	74
2.2.6. Evaluation de l'activité antioxydant.....	77
2.2.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	77
2.2.7. Préparation de solution injectable.....	78
3. Matériels chimiques	78
4. Matériel biologique (Animaux d'expérimentation)	78
4.1. Origine des animaux et conditions d'hébergement	78
4.2. Répartition des groupes	78
4.3. Evaluation du poids corporel	81
4.4. Évaluation comportementale	81
4.4.1. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)	81
4.4.2. Test de l' <i>open field</i>	82
4.4.3. La Piscine de Morris	83
4.4.4. Le test du compartiment sombre/ clair	84
4.5. Sacrifice des rats et préparation des échantillons sanguins et tissulaires	85
4.6. Préparation des érythrocytes.....	86
4.6.1. Description des méthodes utilisées pour la mesure des marqueurs du stress oxydant	86
4.6.1.1. Le superoxyde dismutase SOD	86
4.6.1.2. Catalase (CAT).....	86
4.6.1.3. Glutathion peroxydase (GSH-Px)	86
4.7. Dosages biochimiques	86
4.7.1. Détermination de taux sanguin de nickel	86
4.7.2. Dosage du glucose	87
4.7.3. Evaluation des marqueurs du fonctionnement rénal	87
4.7.3.1. Dosage de l'urée	87
4.7.3.2. Dosage de créatinine	87
4.7.4. Evaluation des marqueurs du fonctionnement hépatique	87
4.7.4.1. Dosage des transaminases (TGO-TGP)	87
4.7.4.2. Dosage de la bilirubine	88
4.7.5. Evaluation des paramètres lipidiques.....	88
4.7.5.1. Dosage des triglycérides.....	88

4.7.5.2. Dosage de Cholestérol.....	88
4.7.5.3. Dosage de l'albumine	89
4.8. Etude histologique des organes.....	89
4.8.1. Prélèvement.....	89
4.8.2. Fixation.....	89
4.8.3. Prélèvements des sections tissulaires.....	89
4.8.4. Déshydratation	89
4.8.5. Imprégnation	90
4.8.6. Inclusion	90
4.8.7. Mise en bloc	90
4.8.8. Confection des coupes histologiques	91
4.8.9. Déparaffinage	91
4.8.10. Réhydratation	91
4.8.11. La coloration	91
4.8.12. Montage et observation microscopique	92
5. Expression et analyse statistique des résultats	92
Résultat et interprétation	93
1.1. En extrait aqueux et eau-méthanol	94
1. Détermination du rendement et composition chimique.....	94
1.2. Le rendement en l'huile essentielle	94
1.3. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (<i>Haloxylon articulatum</i>) par CPG/SM	95
1.4. Etude phytochimique (Analyse qualitative)	98
1.5. Evaluation de l'activité antioxydant	99
1.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	99
2. Effet du Nickel sur le poids corporel et le poids des organes	96
3. Evaluation comportementale	99
3.1. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)	99
3.2. Test de l'open field.....	101
3.3. La Piscine de Morris	103
3.3.1. Le probe test	104
3.3.2. Test visible	106
3.4. Le test du compartiment sombre/ clair	107
4. Evaluation du pouvoir antioxydant de HEHa et HETH in vivo	108
4.1. L'activité de la SOD	108
4.2. L'activité de la CAT	109
4.3. L'activité du GPx	111
5. Dosage biochimique	112
5.1. Détermination du taux de Nickel sanguin	112
5.2. Dosage de glycémie	112
5.3. Dosage des biomarqueurs de la fonction rénale	113
5.4. Exploration de la fonction hépatique	114
5.5. Evaluation des paramètres lipidiques.....	115
6. Effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale des organes	116
6.1. Effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale du rein	116
6.2. L'effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale du foie	117
Discussion.....	119
1. Rendement et composition chimique.....	120

2. Etude phytochimique	121
3. Evaluation de l'activité antioxydant	122
4. L'effet du traitement par l'huile essentielle de T.hirsuta et H.articulatum Boiss et du nickel sur le poids corporel et le poids des organes	124
5. Effet du nickel sur le comportement cognitif chez le rat	125
6. Impact du Ni et HE D T.hirsuta et H.articulatum Boiss sur le stress oxydant érythrocytaire	129
7. Les paramètres biochimiques.....	131
7.1. La détermination du taux sanguin de nickel	131
7.2. Effets du Ni et HE D T.hirsuta et H.articulatum Boiss sur le bilan glucidique....	132
7.3. Effets du Ni et HE D T.hirsuta et H.articulatum Boiss sur les biomarqueurs de la fonction rénal.....	134
7.4. Effets du Ni et HE D T.hirsuta et H.articulatum Boiss sur les biomarqueurs de la fonction hépatique.....	135
7.5. Effets du Ni et HE D T.hirsuta et H.articulatum Boiss sur le bilan lipidique.....	137
8. Effet du Ni et HE de (H.articulatum, T.hirsuta) sur l'architecture des organes	138
8.1. Effet Ni et HE de H.articulatum et T.hirsuta sur l'architecture du rein	138
8.2. Effet Ni et HE de H.articulatum et T.hirsuta sur l'architecture du foie	139
Conclusion	141
Références bibliographique	145
Annexe	186



Revue

Bibliographique.



Introduction

Les métaux lourds sont présents naturellement dans l'environnement et sont utilisés industriellement. Cependant, à des concentrations plus élevées que la normale, ils peuvent entraîner des nuisances plus ou moins graves pour l'être humain, la faune et la flore (**Achour et al., 2014**). Parmi ces métaux lourds en évoquera l'exemple du nickel

Le nickel comme étant un des métaux lourds est un polluant environnemental ubiquitaire. Parmi ses effets délétères, des études ont montré qu'il entraîne une peroxydation lipidique, qui serait en relation avec la production de radicaux hydroxyles. Il peut ainsi altérer le statut antioxydant de la cellule (**Hfaiedh et al., 2004 ; Das et al., 2008**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique (**Habibtani, 2005**).

Par ailleurs, l'importance clinique des thérapeutiques à base de plantes (phytothérapie) a reçu une attention considérable ces derniers temps car elles présentent une riche source de médicaments et produisent une foule de molécules bioactives (**Small et Catling, 2000**).

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques (**Quezel et Santa, 1962**), reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique. C'est ce qui nous a encouragés à entreprendre ce travail à la recherche de nouvelles molécules à activité biologique potentielle.

Haloxylon articulatum Boiss est une plante appartenant à la famille des Chenopodiaceae, est employé dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles de la vue (**Boukef, 1986**) ; on rapporte aussi que l'extrait aqueux de cette plante présente une activité anticancéreuse, et larvicide (**Sathiyamoorthy et al., 1999**).

Thymelaea hirsuta communément appelé 'Methnane' en Algérie, Est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des plantes à fleurs " Thymelaeaceae ", Cette plante est utilisée en médecine populaire comme antidiabétique (**Bnouhamet al., 2007**) , Purgatif pour traiter la maladie du rhume commun en médecine vétérinaire, L'hypertension et comme un antiseptique (**Kawano et al., 2007**).

A la lumière de ces données, La présente étude a été visée sur la recherche de l'effet de l'huile essentielle de ces deux plantes *Thymelaea Hirsuta* et *Haloxylon articulatum boiss* chez des rats

intoxiqués par le nickel. A ce titre, nous envisageons d'entreprendre une série d'expériences qui porteront sur :

1- La première série d'expériences porte sur l'extraction, et la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de ces deux plantes par CPG /SM.

2- La deuxième série d'expériences porteront sur l'évaluation des effets préventif de ces deux plantes étudiées chez des rats wistar intoxiqués au nickel par l'exploration du fonctionnement de différents organes (foie, rein, et cerveau) selon :

- une approche neurocomportementale comporte quatre tests à savoir : le test de dépression, open field, test de la mémoire spatiale et test d'anxiété.

- Une approche enzymatique du statut oxydatif au niveau érythrocytaire.

-Une approche biochimique, dans laquelle nous effectuerons les dosages de différents paramètres de fonctionnement des organes (rein et foie).

-Une approche histologique des organes : Foie et Rein

Chapitre 1 :

Le Nickel

1. Le Nickel :

1.1. Introduction

Le nickel, découvert et nommé par Cronstedt en 1751, est le 24^e élément par ordre d'abondance naturelle dans la croûte terrestre. Il est largement répandu dans l'environnement. Les sources naturelles de nickel atmosphérique comprennent les poussières provenant des émissions volcaniques et l'altération des roches et des sols. Les sources naturelles de nickel aqueux proviennent des cycles biologiques et de la solubilisation des composés du nickel des sols. L'apport mondial de nickel dans l'environnement humain est d'environ 150 000 tonnes métriques par an à partir de sources naturelles et de 180 000 tonnes métriques par an à partir de sources anthropiques, y compris les émissions provenant de la consommation de combustibles fossiles et de la production industrielle, l'utilisation et l'élimination des composés et alliages de nickel (**IARC., 1990**).

En plus le nickel est un métal essentiel sur le plan nutritionnel pour plusieurs espèces animales, micro-organismes ainsi que des plantes. Bien qu'un certain nombre d'effets cellulaires et notamment toxiques du Ni ont été mis en œuvre (**Scott- ordsmand, 1997 ; Diagonanolin et al., 2004**).

La toxicité induite par le nickel suite à son exposition par inhalation a pu être à l'origine des effets toxiques au niveau respiratoire et immunitaire d'une part. d'autre part, le sinus, le système immunitaire et la peau, sont des voies importantes d'exposition au Ni (**Haber et al., 2000 ; Lightfoot et al., 2010**).

1.2. L'identité :

Le nickel est un métal blanc argenté qui prend un poli élevé. C'est un métal de transition, dur et ductile. Il se produit le plus souvent en combinaison avec du soufre et du fer dans la pentlandite, avec du soufre dans la millerite, avec de l'arsenic dans la nickeline minérale, et avec de l'arsenic et du soufre dans le nickel (**Nestle et al., 2002**). Est l'un des cinq éléments ferromagnétiques. Le nickel est également un matériau naturellement magnétostrictif, ce qui signifie qu'en présence d'un champ magnétique, le matériau subit une petite variation de longueur (**Hathaway et Clark , 1993**). Il est utilisé dans une grande variété de procédés métallurgiques tels que la galvanoplastie et la production d'alliages ainsi que dans les batteries nickel-cadmium. Il existe des preuves suggérant que le nickel peut être un oligo-élément essentiel pour les mammifères (**Goyer, 1991**).

1.3. Les propriétés physico-chimiques:

Le Nickel (Ni) est le 24 élément abondant dans la croûte terrestre qui peut naturellement exister sous diverses formes minérales (**Cempel et Nikel, 2006**), C'est un métal brillant argenté-blanc; structure cristalline cubique à face centrées; ductile; ferromagnétique, insoluble dans l'eau, se dissout en acide nitrique dilué, légèrement soluble dans la HCL dilué et le H₂SO₄ insoluble dans la solution ammoniacale (**Pradyot, 2003**). Cet élément naturel représente cinq isotopes stables; dix-neuf autres isotopes instables (**Cempel et Nikel, 2006**).

Les propriétés physiques du nickel sont données dans le **tableau 01** suivant :

Tableau 01 : Les propriétés physiques du nickel d'après (**Cotton et Wilkinson, 1988; Nieboer et al., 1992**).

Symbole chimique	Ni
Numéro atomique	28
Masse atomique	58.71
Structure cristalline	Cubique à face centrée (a= 0.352 nm)
Densité (à 20°C)	8.908 g/cm ³
Température de fusion	1,452°C
Température d'ébullition	2,732°C
Résistivité électrique à 20°C	6.97 microhm-cm
Conductibilité thermique à 0-100 °C	30.9 W/(m.K)
Configuration électronique	[2.8.8] 3d ⁸ 4s ²
Isotopes	de 56 à 66

Ce métal appartient, comme le fer, le cobalt, le cuivre et le zinc à la classe des métaux de transition. Il présente deux états principaux d'oxydation correspondant aux espèces ioniques Ni⁺² et Ni⁺³ (**Denkhaus et Salnokow, 2002**).

Il est inaltérable à l'air sec, à la température ordinaire. A l'air humide, il subit une très faible altération superficielle qui le colore en jaune pile. A température élevée, il prend diverses colorations, comme l'acier, et s'oxyde lentement, en se recouvrant d'oxyde de couleur verdâtre. En le maintenant longtemps au rouge, il se transforme en une masse brune cassante qui constitue. Le

nickel obtenu par réduction de l'oxyde, par l'hydrogène à 2400, est pyrophorique, et brûle dans l'air à la température ordinaire, mais avec fort peu d'éclat (**Henri et Louvrard, 1945**).

Le nickel présente une toxicité chimique reconnue : allergies cutanées, fibroses pulmonaires, Une cardiotoxicité et une néphrotoxicité (**Denkhaus et Salnokow, 2002**).

1.4. Le nickel dans tous ses états :

Des centaines de composés du nickel ont été identifiés et caractérisés. Lorsqu'ils sont oxydés, nombre d'entre eux présentent une couleur verte (dans les minerais silicatés par exemple). Dans l'industrie du nickel interviennent les composés inorganiques du nickel que l'on classe en 5 groupes :

- **le nickel métal** : il s'agit de nickel élémentaire, composé uniquement d'atomes de nickel ;
- **le nickel tétracarbonyle** : c'est un liquide utilisé notamment en milieu industriel pour purifier le nickel et est connu pour sa forte toxicité ;
- **les composés oxydés du nickel** : les oxydes de nickel sont des composés formés par l'association d'atomes d'oxygène et de nickel, par exemple NiO, NiO₂, Ni₂O₃ ;
- **les composés sulfurés du nickel** : ils sont formés de nickel lié avec du soufre comme le NiS ;
- **les composés hydrosolubles** : ce sont des composés solubles dans l'eau tels que le chlorure de nickel ou le sulfate de nickel (**web 01**).

1.5. Utilisation du Nickel :

Le nickel est utilisé principalement sous sa forme métallique combinée avec d'autres métaux et non-métaux comme alliages. Les alliages de nickel se caractérisent par leur dureté, leur solidité et leur résistance à la corrosion et à la chaleur.

Le nickel est principalement utilisé dans la production d'aciers inoxydables, d'alliages non ferreux et de superalliages. Le nickel et les sels de nickel sont également utilisés dans la galvanoplastie, comme catalyseurs, dans les batteries nickel-cadmium, dans les pièces de monnaie, dans les produits de soudage et dans certains pigments et produits électroniques (**IARC, 1990**). On estime que 8% du nickel est utilisé pour les appareils ménagers (**IPCS, 1991**). Le nickel est également incorporé dans certains compléments alimentaires, qui peuvent contenir plusieurs microgrammes de nickel par comprimé (**EU, 2004**).

1.6. Sources d'exposition :

La présence de nickel dans l'environnement est naturelle. Elle est de l'ordre de 0,8 à 0,9 % dans la croûte terrestre. Les principales sources anthropiques sont la combustion du charbon, 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 (INERIS, 2006).

Le nickel est un des constituants des poussières en suspension dans l'atmosphère. Sa concentration est de l'ordre de 0,03 % (en relation avec la composition de la croûte terrestre) (INERIS, 2006).

Ce métal est parmi les métaux les plus distribués dans l'environnement. Les sources peuvent être naturelles ou bien suite aux activités anthropiques. De ce fait, il est présent dans l'air, l'eau, le sol ainsi que dans les matériaux biologiques. D'autre part, les niveaux du Ni atmosphérique dérivent des roches et du sol, des émissions volcaniques ainsi que le feu des incendies. De plus, le Ni qui compose l'air ambiant résulte essentiellement de la combustion du charbon, carburant, déchets, eaux d'égouts et d'autres sources. La fumée de la cigarette, les implants dentaires et orthopédiques, les ustensiles, et certains bijoux (Cempel et Nikel, 2005).

- L'eau potable contient le Ni à des concentrations inférieures à 10 µg/l (Cempel et Nikel, 2005).
- La concentration du Ni dans l'air ambiant est variable considérablement, et sa valeur la plus élevée a été élucidée dans les régions industrialisées (Cempel et Nikel, 2005).
- Le Ni est considéré comme un composé normal de la nourriture, son utilisation ne présente pas de danger. Cependant, son taux varie entre 0.1 mg/kg à 0.5 mg/kg. Les aliments riches en Ni sont : Les flocons d'avoine, la fève, les petits pois, les noix, le chocolat noir et les produits à base de soja. De ce fait, la consommation excessive de ces produits peut être à l'origine de l'augmentation de son taux dans l'organisme (Cempel et Nikel, 2005).
- La dose quotidienne admissible varie entre 100-300 µg. tandis que son taux dans certains fruits, légumes, jus naturelles, vins et des cocktails est compris dans cet intervalle (Cempel et Nikel, 2005).

1.7. Toxicocinétique :

1.7.1. L'absorption :

Le nickel peut être absorbé par les voies pulmonaires, cutanée et gastro-intestinale. Bien que la voie pulmonaire soit la voie majeure de son exposition (**Cameron et al., 2011**), tandis que l'absorption cutanée soit habituellement négligeable, cette dernière peut devenir significative lorsque des composés solubles du nickel (chlorure et sulfate) entrent en contact avec une peau présentant des lésions. L'absorption cutanée peut être favorisée par la présence de sueur, de solvants ou de détergents sur la peau (**Larese et al., 2007; Zhao et al., 2009**). Le Nickel joue un rôle primordial dans divers processus physiologiques comme un cofacteur indispensable pour l'absorption intestinale du Fer. Cependant l'interaction Nickel-Fer ne peut survenir que sous certaines conditions spécifiques (**Das et al., 2008**).

L'exposition au nickel est à l'origine de diverses sources. Il est présent naturellement dans les tissus, et sous certaines expositions excessives, son taux peut s'augmenter considérablement (**Cempel et Nickel, 2005**). Son absorption dépend essentiellement de sa forme physicochimique (chlorure, nitrate et sulfate) et se fait majoritairement par voie digestive (**Haber et al., 2000**). Cependant, l'absorption qui s'effectue au niveau respiratoire dépend essentiellement de la solubilité du composé de nickel (**Cempel et Nickel, 2005**). La prise alimentaire, la vidange gastrique et le péristaltisme de l'intestin sont les principaux marqueurs de sa biodisponibilité (**Nielsen et al., 1999 ; Haber et al., 2000**). L'absorption est influencée par la quantité d'aliment ingéré, l'acidité intestinale, ainsi que la présence du phosphate, phytates, fibres alimentaires et d'autres métaux (**Cempel et Nickel, 2005**).

Plusieurs études ciblant des animaux comme modèle d'étude ont révélé que suite à l'administration orale des sels de Nickel, ce dernier a été trouvé au premier lieu au niveau des reins, des poumons, du foie, ensuite le cœur. D'autre part, l'administration orale du Ni⁺² a permis son accumulation dans la moelle épinière puis le cortex frontal. L'absorption pulmonaire est considérée comme la voie majeure de la toxicité induite par le Nickel (**Das et al., 2008**).

la forme soluble (Ni⁺²) du Nickel peut être absorbé cependant sa forme peu soluble est généralement phagocytée (**Das et al., 2008**). Un pourcentage de 20 à 35 % du Ni inhalé et retenu par les poumons est absorbé par la circulation sanguine (**Das et al., 2008**).

1.7.2. Distribution:

Des études ont indiqué que suite à l'inhalation, les particules du Ni restent dans les poumons (oxyde de nickel) sinon sont absorbées et excrétées par la suite dans les urines (sulfate de nickel). D'autres parts, des taux importants en ce métal ont été trouvés dans le foie, le cœur, les poumons, le tissu adipeux, le système nerveux périphérique et le cerveau. Il est évident que le Ni comme étant un métal lourd, se lie aux protéines spécifiques et quelques acides dans le sang et le placenta qui sont indispensables pour son transport et sa distribution dans le corps (**Das et al., 2008**).

cependant, les concentrations ont diminué dans l'ordre poumon > thyroïde > surrénale > rein > cœur > foie > cerveau > rate > pancréas (**Chin et al., 1983**). Cela reflète probablement mieux l'accumulation à long terme que la clairance et la distribution initiales dans les études à court terme. La clairance du plasma obéit à un modèle à deux compartiments (**Hotchkiss et al., 1993**) dominé par la filtration glomérulaire et un « puits » des tissus mous. Le nickel présenté aux cellules sous forme de Ni²⁺ soluble pénètre principalement dans les organites extranucléaires, alors que les particules phagocytées se concentrent près du noyau enveloppe et sont ensuite solubilisés après quoi le nickel s'accumule dans le noyau (**Brunmark, 1995**). Cela peut expliquer le potentiel cancérigène plus élevé des particules, telles que NiS et Ni₂S₃.

1.7.3. Métabolisme :

Le métabolisme du Ni implique essentiellement la conversion de ses différentes formes ainsi que sa liaison aux ligands. La première voie responsable d'induire une toxicité est la voie pulmonaire pour l'exposition par inhalation (**voir Tableau 02**), et les reins pour sa pénétration par voie orale. Cependant le Ni peut cibler d'autres organes y compris le système cardiovasculaire, le système immunitaire ainsi que l'appareil circulatoire (**Nielsen et al., 1999 ; Cempel et Nikel, 2005**). Chez l'humain, environ 20-35 % des composés moins solubles du nickel retenus dans les poumons passent dans la circulation sanguine (**Zhao et al., 2009**).

Le Ni ne se détruit pas dans le corps, mais sa forme chimique est susceptible d'être altérée. De ce fait, son métabolisme devient palpable suite à sa liaison dans le but de former un ligand d'une part et son transport dans le corps d'autre part. Cependant, sa toxicité est due à son interférence avec le processus physiologique du manganèse, zinc, calcium, et magnésium (**Das et al., 2008**).

Tableau 02 : voix d'exposition et le taux d'absorption et les organes cible du nickel chez l'homme et l'animal (INERIS, 2006).

Substance chimique	Voix d'exposition	Taux d'absorption		Organe cible	
		Homme	Animal	Principale	Secondaire
	Inhalation	20-35%		poumon	Thyro.de, surrénales, reins
Nickel	Ingestion	0.7-27% ¹	0.01%à33.8% ²	Reins	Foie, cœur, poumons
	Cutanée	ND	ND		

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

2 : selon la forme chimique du nickel,

ND : non disponible.

1.7.4. Excrétion:

L'élimination du nickel plasmatique se fait principalement par voie urinaire ; quelques pour cent pénètrent dans la bile et l'élimination se produit dans la sueur, la salive, les cheveux et les ongles, mais elle n'est guère significative. Le nickel ultrafiltrable subit une filtration glomérulaire rapide mais jusqu'à 99 % est réabsorbé dans le tubule (Farmer et al., 1981). Les demi-temps plasmatiques après la prise orale par des volontaires à jeun sont d'environ 12 à 24 h (Clapp et al., 1991 ; Kusters, 1992). Le demi-temps d'excrétion urinaire semble dépendre de la source d'exposition par inhalation et varie de 17-39 h pour les composés solubles du nickel inhalés par les nickeurs à 53 h pour les composés du nickel inhalés par les soudeurs, avec une valeur intermédiaire de 30-50 h pour les composés insolubles du nickel inhalés par les moulistes dans les usines de bouteilles en verre (Ward et al., 1987). L'élimination du nickel ingéré par voie orale est presque complète en 4 jours, avec très peu de rétention dans l'ensemble du corps (Clapp et al., 1991).

Donc, Le Ni est excrété dans les urines et les fèces, et son taux dépend de la voie d'exposition ainsi que la forme chimique (Cempel et Nikel, 2005).

1.8. Toxicité du nickel

1.8.1. Toxicité aigüe

1.8.1.1. Chez l'homme

L'inhalation accidentelle de nickel carbonyle provoque généralement des effets toxiques aigus en deux étapes, immédiate et différée. Les symptômes immédiats comprennent des maux de tête, des vertiges, des nausées, des vomissements, de l'insomnie, de l'irritabilité, qui durent généralement quelques heures, suivis d'un intervalle asymptomatique de 12 h à 5 jours. Des symptômes tardifs apparaissent alors : oppression thoracique, toux non productive, dyspnée, cyanose, tachycardie, palpitations, sueurs, troubles visuels, vertiges, faiblesse et lassitude (**Sunderman et al., 1975**). Un cas mortel d'empoisonnement au nickel a été signalé chez une fillette de 2 ans et demi qui avait ingéré 15 g de sulfate de nickel (**Daldrup et al., 1983**). La cause du décès était un arrêt cardiaque. Un décès dû au syndrome de détresse respiratoire de l'adulte induit par le nickel (SDRA) a été signalé chez un travailleur pulvérisant du nickel à l'aide d'un procédé à arc thermique (**Rendall et al., 1994**).

Nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, maux de tête, toux, essoufflement et vertiges ont été signalés chez les travailleurs d'une usine de galvanoplastie qui buvaient de l'eau contaminée par du chlorure de nickel et du sulfate de nickel (1,63 g/l) (**Sunderman et al., 1988**).

1.8.1.2. Chez l'animal

Chez les rats mâles, une dose unique d'injection de chlorure de nickel a provoqué une augmentation profonde et constante des taux de prolactine circulante après un jour et a duré pendant quatre jours (**Clemons et Garcia, 1981**). Des lésions rénales et une hématurie franche ont également été observées dans la toxicité aiguë du nickel (**Kasprzak et al., 1980**). Il a été démontré que les composés du nickel solubles dans l'eau sont plus toxiques que les moins solubles. La DL50 orale à dose unique chez le rat pour l'oxyde et le sous-sulfure de nickel moins solubles était > 3 600 mg Ni/kg p.c., tandis que la DL50 orale pour le sulfate et l'acétate de nickel plus solubles variait de 39 à 141 mg Ni/kg p.c. rats et souris (**ATSDR , 2005**).

1.8.2. Toxicité subchronique :

1.8.2.1. Chez l'homme

Dans une évaluation de travailleurs soudant des alliages à haute teneur en nickel, il a été rapporté qu'une exposition de 6 semaines aux fumées de nickel (0,07 à 1,1 mg de nickel/m³) provoquait une

augmentation des irritations des voies respiratoires et des yeux, des maux de tête et de la fatigue (Akesson et Skervfing, 1985).

1.8.2.2. Chez l'animal

Le gain de poids corporel, l'hémoglobine et la phosphatase alcaline plasmatique ont été significativement réduits chez les rats sevrés exposés au nickel (sous forme d'acétate de nickel) à des concentrations de 500 ou 1000 mg/kg dans l'alimentation (équivalent à 25 ou 50 mg/kg de poids corporel par jour) pendant 6 semaines par rapport aux témoins (Whanger, 1973). Aucun effet n'a été observé chez les rats exposés à 100 mg/kg dans l'alimentation (équivalent à 5 mg/kg de poids corporel par jour).

Dans une étude de 13 semaines dans laquelle des rats Sprague-Dawley ont reçu 0, 44,7, 111,75 ou 223,5 mg de nickel par litre dans l'eau de boisson sous forme de sulfate de nickel (correspondant à 0, 4,5, 11,2 et 22,4 mg de nickel par kg de poids corporel par jour), aucun signe clinique apparent de toxicité n'a été observé. Les poids corporels moyens finaux n'ont pas été affectés, à l'exception d'une diminution dans le groupe recevant la dose la plus élevée par rapport aux témoins. Aucun changement macroscopique ou microscopique n'a été observé dans aucun des tissus examinés (Obone et al., 1999). L'évaluation des risques de l'UE (2004) a déterminé une NOAEL de 44,7 mg/litre sur la base de modifications mineures du poids corporel et du poids relatif des reins et des poumons.

1.8.3. Toxicité chronique :

1.8.3.1. Chez l'homme

La plupart des expositions chroniques par inhalation impliquent une exposition professionnelle à la poussière ou aux vapeurs de nickel résultant du soudage d'alliages de nickel. En général, l'exposition chronique par inhalation aux poussières et aérosols de nickel contribue aux troubles respiratoires tels que l'asthme, la bronchite, la rhinite, la sinusite et la pneumoconiose (USA, 1990). Sur la base d'analyses d'études réalisées avant 1975, la National Academy of Sciences (NAS) a conclu que les travailleurs des raffineries de nickel ont démontré une augmentation de l'incidence des cancers pulmonaires et des cavités nasales, en particulier les cancers épidermoïdes, anaplasiques et pléomorphes. **Enterline et Marsh à 1982** ont montré qu'il existait un risque excessif de cancer des sinus nasaux chez les travailleurs des raffineries de nickel.

Chashschin et al à 1994 ont signalé des effets possibles sur la reproduction et le développement chez l'homme de l'exposition professionnelle au nickel (0,13-0,2 mg nickel/m³).

Chez des travailleurs exposés au nickel (composé non précisé), une augmentation significative des IgG, des IgA et des 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. (**Tebani, 2014**).

1.8.3.2. Chez l'animal

Des rats et des souris ont été exposé par inhalation a du sous sulfure de nickel par inhalation 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 90 jours à des concentrations de 0,1 à1, 8 mg de nickel/m³ (**Bencko et al., 1983 ; Dunnick et al., 1989**). Une hyperplasie des macrophages alvéolaire a été notée chez les rats à toutes les concentrations et chez les souris à partir de 0,2 mg/m³. Pour les plus fortes concentrations, une inflammation chronique active et une fibrose interstitielle focale chez certaines souris à été observée.

L'exposition chronique (6 heures/jour, 5 jours/semaine pendant 78 semaines) à des poussières de sous sulfure de nickel (0,97mg/m³ de nickel, soit une concentration d'environ 0,7 mg/m³) a entraîné une augmentation des lésions pulmonaires chez des rats Fisher 344 (**Benson et al., 1990**). Les lésions étaient de type pneumonie, atélectasie, bronchite, bronchectasie, emphysème. De plus, une diminution du poids corporel de 20 à 30% a été observée (**Tebani, 2014**).

1.9. Effet du nickel sur l'organisme :

Un certain nombre d'étude chez l'homme et l'animal suggèrent que l'exposition aux sels de nickel entraîne l'apparition d'effets systémique sur les reins, le foie, les poumons, la mortalité néonatale et des effets sur le système immunitaire. Les reins et les poumons constituent les principaux organes cibles tant chez l'animal que chez l'homme (**Ambrose et al., 1976 ; Dieter et al., 1988; Smith et al., 1993; Vyskocil et al., 1994a, 1994b**).

1.9.1. Effet du nickel sur les reins :

Des effets néphrotoxiques, comme un œdème suivi d'une hyperémie et d'une dégénérescence du parenchyme, ont été observés chez des travailleurs de sexe masculin qui ont accidentellement ingéré de l'eau de boisson contaminée au nickel sulfate et chlorure. En outre, il y avait une élévation des concentrations d'albumine dans l'urine (68, 40 et 27 mg/g de créatinine), qui sont revenues à la

normale le cinquième jour après l'exposition. Les résultats suggèrent une néphrotoxicité transitoire légère.

Chez les rats exposés pendant 13 semaines au sulfate de nickel dans l'eau potable, une diminution significative du volume urinaire et des taux de glucose urinaire et une augmentation du poids relatif des reins ont également été observées (**Obone et al., 1999**).

Il existe des travaux sur différents paramètres du dysfonctionnement rénal dans des échantillons d'urine provenant d'ouvriers de raffinerie de nickel électrolytique (**Sanford et al., 1988**).

1.9.2. Effet du nickel sur le système hépatique :

Une augmentation transitoire de la bilirubine sérique a été observée chez 3 des 10 travailleurs qui ont été hospitalisés après avoir bu de l'eau d'une fontaine à eau contaminée par du sulfate de nickel (**Sunderman et al., 2007**). Chez le rat, une diminution du poids du foie a été observée après une exposition de 28 jours à 2 ans à 0,97-75 mg/kg/jour de chlorure de nickel ou de sulfate de nickel (**Weischer et al., 1980**). Des études récentes sur des rats par **Das et al à 2006** ont révélé un effet dégénératif induit par le sulfate de nickel sur le tissu hépatique. Ils ont observé qu'après l'injection intrapéritonéale de sulfate de nickel, l'architecture hépatique normale était fortement altérée, ainsi que l'apparition d'un cytoplasme vacuolé (foie gras), de noyaux excentriques et d'une hypertrophie des cellules de Kupffer. Un rapport a décrit une diminution des activités des transaminases hépatiques et rénales après un traitement au nickel chez le rat, ce qui s'est avéré plus nocif dans un régime alimentaire restreint en protéines (**Das et al., 2007**). Le sulfate de nickel diminue également les taux hépatiques d'acide ascorbique et de cholestérol chez le rat (**Das et al., 1998**).

1.9.3. Effet du nickel sur l'appareil respiratoire :

Les études chez l'homme et l'animal indiquent que le système respiratoire est la cible principale de la toxicité du nickel 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 captage cellulaire. La muqueuse nasale peut retenir du Ni pendant de nombreuses années (**Torjussen et al., 1978, 1979a, 1979b**). 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 Ni₃S₂ (**Zhong et al., 1990 ; Huang et al., 1994**).

Des changements histopathologiques par des dommages aux poumons (congestion, inflammation, fibrose et œdème) ont été noté chez des rats et des souris exposés au sulfate de nickel

hexahydraté pendant 12 jours (**Bensou et al., 1987 ; Dunnick et al., 1988**). Parmi les effets observés dans les voies respiratoires, on compte une inflammation des poumons accompagnée d'une pneumonie nécrosante et d'une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires chez les souris, une dégénération de l'épithélium respiratoire chez les rats et une atrophie de l'épithélium olfactif chez les deux espèces (**Dunnick et al., 1988 ; Haley et al., 1990**).

1.9.4. Effet du nickel sur le système endocrinien :

Le nickel provoque des effets indésirables graves sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, qui sont encore aggravés en cas de régime alimentaire restreint en protéines (**Das et Dasgupta, 2002**). Il a été rapporté que l'inhalation de nickel n'a pas d'impact sur les profils endocriniens chez l'homme mais altère sérieusement les fonctions de la plupart des glandes endocrines vitales du rat ou de la souris (**NTP, 1996a , 1996b , 1996c**).

Les rats exposés au oxyde de nickel ont présenté une hyperplasie médullaire surrénale avec un phéochromocytome bénin (**ATSDR, 2003 ; NTP, 1996b, 1996c**). Le chlorure de nickel administré par voie orale a montré une augmentation des glandes pituitaires uniquement chez les rats mâles (**RTI, 1986 ; RTI, 1988**). Des rats femelles traitées avec du chlorure de nickel ont montré une diminution du taux de prolactine (**Das et Dasgupta, 2002 ; Smith et al., 1993**).

Des effets sur la régulation de la glycémie ont été observés, comme une hyperglycémie due à l'augmentation du taux de glucagon (**Sanjay et al., 2000**).

1.9.5. Effets cardiovasculaires :

Pas d'augmentation du nombre de décès d'origine cardiovasculaire des maladies ont été signalées chez des travailleurs exposés à nickel (**Cornell et Landis, 1984**).

Une étude sur l'exposition au nickel a montré une augmentation significative des concentrations de lipoperoxyde et de lipides totaux dans le tissu cardiaque. Le mécanisme par lequel le nickel agit pour augmenter les facteurs de risque cardiovasculaire reste inconnu, bien que l'altération du métabolisme des antioxydants et le stress oxydatif puissent être considérés comme des possibilités (**Novelli et al.,2015**).

Le traitement au chlorure de nickel chez le rat a montré une réduction du poids des organes, y compris le cœur (**ABC, 1988**). Fait intéressant, une augmentation du poids cardiaque chez les rats exposés à une dose plus élevée par apport au premier sous forme de sulfate de nickel pendant 2 ans a été signalée, bien qu'aucun changement histopathologique sur les tissus cardiaques n'ait été

observé (Ambrose et al., 1976 ; Obone et al., 1999). L'inhalation de Ni à faible dose a provoqué un retard de bradycardie, une hypothermie et une arythmogénèse (Campen et al., 2001).

1.9. 6. Effets gastro-intestinaux :

Les travailleurs qui ont consommé de l'eau au cours d'un quart de travail d'une cascade d'eau contaminée au nickel ont présenté des symptômes liés à des troubles gastro-intestinaux (GI) (Sunderman et al., 1988). Les symptômes comprenaient des nausées, des crampes abdominales, de la diarrhée et des vomissements. Dans le cas de rats traités au chlorure de nickel, les animaux présentaient une gastrite sévère, incluant des diarrhées (Whanger, 1973). Cependant, de tels troubles gastro-intestinaux n'ont pas été trouvés chez les rats traités avec du sulfate de nickel alimentaire (Obone et al., 1999) ou du sulfate de nickel (Ambrose et al., 1976 ; Burrows et al., 1981 ; . Das et Dasgupta, 1998).

1.9.7. Effets cutanés :

L'exposition cutanée au nickel provoque une dermatite de contact dans la population générale. Plusieurs investigations sur des doses orales uniques ou multiples de sulfate de nickel ont montré une augmentation de la sévérité de la dermatite chez les individus sensibles au nickel (Das et al., 2010 ; Burrows et al., 1981 ; Veien et al., 1987). L'étude a en outre révélé un érythème corporel, un eczéma des mains et une poussée sur le site du test épicutané après avoir été en contact avec du sulfate de nickel. Une dose d'épreuve orale de sulfate de nickel (0,014 mg/kg) a montré des signes et des symptômes de dermatite chez les sujets qui avaient subi un test épicutané 1 mois avant le test (Kadota et Kurita, 1955).

1.9.8. Effet du nickel sur les paramètres érythropoïétiques :

Aucune étude humaine n'a été localisée concernant les effets hématologiques après inhalation ou exposition cutanée au nickel. En ce qui concerne l'exposition orale, une étude a rapporté une augmentation transitoire des réticulocytes sanguins chez les travailleurs qui buvaient de l'eau d'une fontaine à eau contaminée par du sulfate de nickel, du chlorure de nickel et de l'acide borique (Das et al., 2008).

1.9.9. Effet du nickel sur le système immunitaire :

Le nickel génère de multiples réactions dans le système immunitaire humain de manière diverse (Hostynek, 2006). le nickel est un agent immunomodulateur et immunotoxique. Il a été rapporté que le contact avec le nickel provoquait une dermatite allergique et une urticaire immunologique ; par conséquent, le nickel peut être marqué à la fois comme sensible au système immunitaire et

comme allergène (**Das et al., 2010 , 2008 ; Dearman et Kimber, 1992**). Cependant, on ne sait toujours pas comment une petite particule de nickel génère une manifestation allergique.

Lorsque le métal s'oxyde, il développe une substance appelée haptène, qui peut déclencher une réponse immunitaire en se liant à des protéines tissulaires comme de grosses molécules (**Das et Buchner, 2007**). L'exposition au nickel des travailleurs s'est avérée avoir un impact significatif sur l'augmentation des IgG, IgA et IgM avec la diminution concomitante des taux d'IgE (**Bencko et al., 1983, 1986**). D'autres élévations significatives d'autres protéines sériques de l'immunité à médiation cellulaire, y compris l' α 1-antitrypsine, la α 2-macroglobuline et la céruloplasmine, ont également été observées (**Das et al., 2008**). Le nickel peut également réduire la réponse des anticorps circulants des rats immunisés traités avec un antigène viral (**Das et al., 2008 ; Graham et al., 1978 ; Figoni et Treagan, 1975**).

1.9.10. Effets génotoxiques :

L'exposition au subsulfure de nickel chez des individus sensibilisés et non sensibilisés au nickel a montré une génotoxicité comme l'altération de la configuration de l'ADN, entraînant une réticulation et une rupture de brin dans le lymphocyte humain (**Arrouijal et al., 1992 ; Das et Dasgupta, 2000**). Un degré très élevé de mutagénicité au niveau du gène de la guanine phosphorybosyl transférase avec une faible exposition au composé du nickel soluble dans la lignée cellulaire G12 de hamster chinois a été rapporté (**Klein et al., 1994**). Le nickel provoque la mutation du gène p53, qui est un important gène suppresseur de tumeur et facteur de transcription, dans les cellules épithéliales rénales (**Maehle et al., 1992**).

Le nickel inhibe également la réparation de l'ADN (**Figure 1**) en se liant éventuellement aux enzymes de réparation de l'ADN et génère des radicaux libres entraînant une dégradation irréversible des protéines (**Das et Dasgupta, 1997 ; Lynn et al., 1997**).

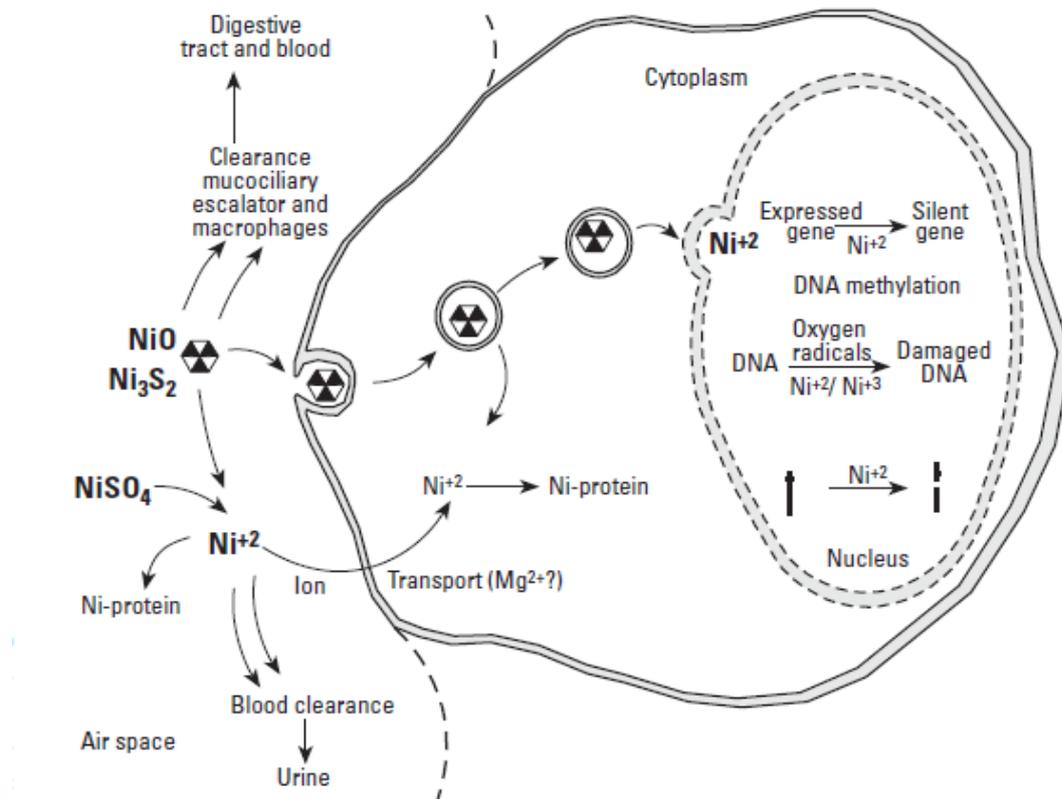


Figure 1: Représente les interactions des composés de nickel avec les cellules épithéliales (de cible) dans la région bronchio-alvéolaire du poumon (Oller et al. 1997).

1.9.11. Effets cancérogènes :

L'exposition au nickel de divers travailleurs des industries du nickel a démontré des effets cancérogènes. Diverses études ont rapporté que le nickel divalent est un puissant cancérogène qui peut induire une malignité chez les humains et les rongeurs. L'exposition humaine au nickel dans des industries telles que les raffineries, les mines et les fonderies, les industries de l'acier inoxydable et les installations de fabrication de batteries provoque le cancer, bien qu'il soit difficile d'identifier la spéciation des composés du nickel (ICNC, 1990).

Des études animales ont montré le potentiel cancérogène de divers composés du nickel comme le sous-sulfure de nickel, le chlorure de nickel, l'oxyde de nickel et le sulfate de nickel, etc. (Diwan et al., 1992). Une étude sur des rongeurs a montré des tumeurs pulmonaires, dont des adénomes, des adénocarcinomes, des carcinomes épidermoïdes et des fibrosarcomes avec une exposition à l'oxyde de nickel (Ottolenghi et Haseman, 1974).

Il a également été rapporté que certains des composés du nickel induisent une prolifération cellulaire, ce qui peut induire de légères abrasions de l'ADN en mutations extrêmes (**Valko et al., 2005**).

1.9.12. Effets neurogènes :

Des effets neurologiques, notamment des vertiges, de la lassitude et des maux de tête, ont été observés chez des employés de quart qui consommaient de l'eau contaminée au nickel (**Sunderman et al., 1988**). Une étude sur l'homme a révélé qu'une personne ayant ingéré une dose unique de nickel (NiSO_4 ; 0,05 mg Ni/Kg, poids corporel) a développé une hémianopsie homonyme (effet intraoculaire) pendant 2 h (**Sunderman, 1989**).

Le gavage forcé avec du chlorure de nickel pendant 3 mois chez le rat a entraîné de graves troubles neurologiques, notamment une lenteur, une respiration anormale, une altération de la régulation de la température corporelle et une ataxie (**ABC, 1988 ; Gupta et al., 2008**).

1.9.13. Effet du nickel sur la reproduction :

1.9.13.1. Effets du nickel sur la reproduction chez le male :

Une dégénérescence testiculaire a été observée chez les rats et les souris exposés au sulfate de nickel et au subsulfure de nickel (**NTP, 1996a, 1996b**). Chez les rats mâles exposés au NiSO_4 , plusieurs modifications testiculaires, telles que la prolifération des cellules interstitielles, les parois des vaisseaux de transport, et une réduction du nombre de spermatozoïdes et de certaines enzymes testiculaires telles que la stéroïde 3β hydroxystéroïde déshydrogénase ont été observées (**EPA , 1985**) L'exposition au nickel élève la peroxydation des lipides testiculaires et supprime les activités enzymatiques antioxydantes chez le rat (**Gupta et al., 2007**).

1.9.13.2. Effets du nickel sur la reproduction chez la femelle :

Une augmentation du taux d'avortements spontanés (15,9%) a été signalée parmi un groupe de 356 femmes qui travaillaient dans une usine de raffinage hydrométallurgique du nickel dans la région arctique de la Russie par rapport au taux (8,5%) de 342 ouvrières locales de la construction (**Chashschin et al., 1994**).

Chez la femelle cyclique le nickel affecte le développement et la maturation des follicules de l'ovaire, réduit également la stéroïdogénèse ovarienne et perturbe la fonction hypophysaire (**Wang et zhu,2003**).

1.9.14. Le nickel induit un stress oxydatif :

Le nickel induit un stress oxydatif avec génération de ROS peut stimuler les voies de signalisation cellulaire en développant un microenvironnement intracellulaire à faible teneur en oxygène. Ceci, à son tour, active le facteur de transcription hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) et régule toutes les expressions du gène de l'hypoxie. La voie peut se transformer en réponse adaptative contre l'hypoxie cellulaire induite par le nickel ou en apoptose. En outre, il a également été observé que les métaux lourds comme le nickel (II) via les ROS peuvent imiter l'hypoxie cellulaire mais peuvent ne pas toujours activer les gènes dépendants de HIF-1 (Salnikow et al., 1994 ; Kusal et al., 2019).

La raison possible derrière l'activation induite par le nickel du facteur de transcription HIF-1 α est que Ni(II) remplace Fe(II) dans le transporteur d'oxygène et produit une forme hybride d'hémoglobine non fonctionnelle. Ce phénomène évolue vers une hypoxie intracellulaire permanente, qui active alors HIF-1 α (Lynn et al., 1998 ; Kusal et al., 2019).

1.9.14.1. Altération de l'ADN

Les ROS générées pourraient endommager l'ADN de manière non sélective, ce qui pourrait entraîner des modifications génétiques dans les gènes actifs. La mutation de l'ADN est une étape critique de la carcinogenèse (Valko et al., 2006). Le nickel peut se lier aux enzymes de réparation de l'ADN et générer des frées radicales oxygénées entraînant la dégradation des protéines. Ces dommages irréversibles aux protéines impliquées dans la réparation, la réplication, la recombinaison et la transcription de l'ADN pourraient être importants pour les effets toxiques du nickel (Lynn et al., 1998).

1.9.14.2. Oxydation des protéines

Bien que le nickel en soi ne provoque pas une génération efficace de radicaux libres à partir d'oxygène, H₂O₂ hydroperoxydes lipidiques, la réactivité de Ni avec ces dérivés d'oxygène peut être modulée par chélation avec certains ligands contenant de l'histidine et de la cystéine (Shi et al., 1993 ; Shi et al., 1992). L'incubation de Ni avec de la cystéine en milieu aérobie génère le radical hydroxyle, qui réagit ensuite avec la cystéine pour générer un radical alkyle carboné. Les radicaux libres peuvent également être générés à partir d'hydroperoxydes lipidiques par Ni en présence de plusieurs oligopeptides (Chen et al., 2003). Entraînent des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases.

1.9.14.3. Peroxydation lipidique

Le nickel augmente la peroxydation lipidique dans le foie, les reins et le poumon, mesurée par la réaction de l'acide thiobarbiturique pour le Malondialdéhyde (MDA) dans des homogénats de tissu frais (Sudermann, et al., 1985). La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques ou d'autres éléments contenant des lipides (Montagnier et al., 1998).

1.9.14.4. Défense antioxydants contre la toxicité du nickel

Défense antioxydants contre la toxicité du nickel par des mécanismes appropriés sont présents dans le corps humain afin que la concentration constante de radicaux libres dérivés de l'oxygène potentiellement toxiques soit contrôlée dans des conditions physiologiques normales par le système de défense anti-oxydant intrinsèque de l'organisme. Mais une génération accrue de ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut submerger les antioxydants intrinsèques des cellules et en résulter une condition connue sous le nom « oxydative stress » (Das et al., 2006). Les antioxydants exogènes jouent un rôle essentiel dans la prévention des dommages cellulaires en interagissant avec les frées radicales et en mettant fin à la réaction en chaîne. une augmentation de la formation de peroxyde lipidique et une diminution des taux de glutathion, de SOD, de CAT, de GSH-Px et d'appauvrissement en acide ascorbique ont été observées dans les tissus les plus métaboliquement actifs de l'organisme, à savoir le foie et les reins (Das , et al., 2006 ; Das et al., 1998). De plus, une diminution des enzymes antioxydants suggère une interaction avec les radicaux libres accumulés et les acides aminés actifs des enzymes, entraînant une altération fonctionnelle et des lésions tissulaires (Rodriguez et al., 1991).

1.10. Transfère transplacentaire du nickel :

Durant la gestation, le traitement de la souris par le chlorure de nickel provoque deux heures après l'exposition une augmentation de la concentration dans le sang maternel, le placenta et le liquide amniotique. Le chlorure de nickel se distribue dans les tissus fœtaux 8 heures après l'injection, puis la concentration de nickel se diminue après deux jours du traitement (Lu et al., 1979; Morvai V., 1992).

La concentration du chlorure de nickel augmente dans le sac amniotique au début de la gestation et dans le placenta allantochorial à la fin de la gestation (Mas et al., 1985).

La souris traitée par le chlorure de nickel montre que le passage du NiCl₂ radioactif de la mère vers le fœtus est très rapide et que les concentrations sont plus élevées chez les tissus fœtaux que ceux de la mère (Jacobsen et al., 1978; Lu et al., 1979). De plus chez la rate lactante, le nickel est

transféré vers le nourrisson par le lait (**Dostal et al., 1989**) et provoque une altération de la composition du lait maternel par augmentation des lipides et diminution des protéines et de lactose.

Chapitre 2

La phytothérapie et les huiles essentielles

2. La phytothérapie et les huiles essentielles :

2.1. La phytothérapie

2.1.1. Définition :

La phytothérapie est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes.

La phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces (**ZEGHDAD, 2009**).

2.1.2. Différents types de la phytothérapie :

2.1.2.1. Aromathérapie : science naturelle fascinante et complexe dont l'origine remonte à des milliers d'années ; est une thérapeutique utilisant les huiles essentielles provenant des plantes dites « aromatiques ». D'une façon générale, il s'agit de recueillir par entraînement de la vapeur d'eau les principes odorants et volatils des drogues (**kerboub, 2017**).

2.1.2.2. Gemmothérapie : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules (**kerboub, 2017**).

2.1.2.3. Herboristerie : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale (**kerboub, 2017**).

2.1.2.4. Homéopathie : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive ; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale (**kerboub, 2017**).

2.1.2.5. Phytothérapie pharmaceutique : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats.... (**STRANG, 2006**).

2.1.3. Les plantes médicinales

2.1.3.1. Généralités

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme.

On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**LOUCIF, 2020**).

Les progrès de la physiologie, ont permis de comprendre les mécanismes d'action de ces substances naturelle .Depuis quelques décennies, la compréhension des relations qui existent entre la structure d'une molécule et son activité biologique permet la conception et la fabrication de médicaments synthétiques aux performances améliorées ou aux effets indésirables mieux contrôlés (**Iserin.p, 1996**).

2.1.3.2. Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple, en fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Se sont des plantes qu'ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique (**Mohammedi, 2006**). De façon plus large, une plante médicinale est un végétale doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à dose normale (**Gérard et François, 2009**).

Les plantes médicinale sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui continue de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Zaghad , 2009 et Beddou, 2014**).

2.1.3.3. Les métabolites secondaires des plantes :

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base (acides nucléiques, lipides, protéines, acides aminés et glucides). Les plantes produisent, en plus, un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont appelés métabolites secondaires. De nos jours, un grand nombre de ces composés sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Nous citerons ci- dessous quelques importants groupes phytochimiques, source de molécules biologiquement actives (**MOHAMMEDI, 2013**).

2.1.3.3.1. Classification des métabolites secondaires :

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003**).

2.1.3.3.1. 1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques constituent un des groupes les plus importants chez les végétaux, issus de la grande voie d'aromagenèse ; shikimates ou acide shikimique (**figure 2**) et de la voie acétate-malonate et peuvent être divisés en diverses classes sur la base de leur structure moléculaire, et plus de 8000 composés différents ont été décrits. Les plus abondants sont les acides phénols, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes, dont les flavonoïdes et les acides phénols comptent 60% et 30%, respectivement, de polyphénols diététiques. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées, et partagent un squelette carboné commun de diphenylpropanes (C6– C3–C6 ; c.-à-d., deux noyaux benzènes jointifs par une chaîne linéaire de troiscarbones formant un hétérocycle oxygéné). Les flavonoïdes peuvent être divisés en diverses classes selon leur structure moléculaire ; les groupes principaux sont les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavonols, les isoflavones et les anthocyanidines. (**MOHAMMEDI, 2013**).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**MACHEIX, 2005**).

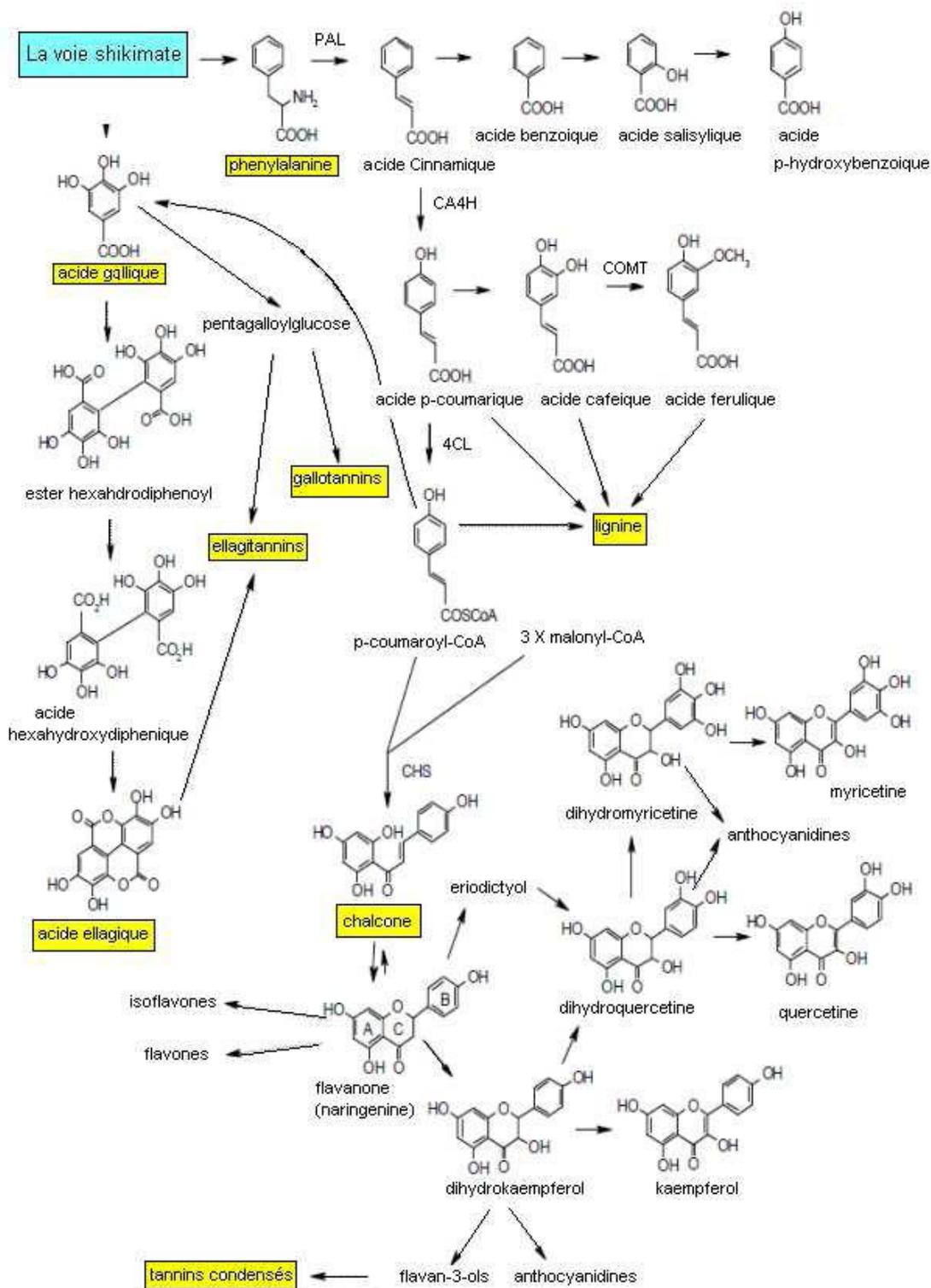


Figure 2: Biosynthèse des composés phénoliques.

2.1.3.3.1.1. Structure et catégories des composés phénoliques :

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se

polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés ; malgré la grande diversité structurale, ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols.

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou poly saccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (**HARBONE, 1980**). Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes ; comme le montre le **tableau 3**(**NAGENDRAN et al., 2006**).

Tableau 03 : Classes des polyphénols (**MAKHLOUFI, 2010**).

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C6
acide hydroxybenzoïque	C6-C1
acéthophénones,acide phénylacétique	C6-C2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones)	C6-C3
flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6-C3-C6
lignanes, néolignanes	(C6-C3)*2
biflavonoïdes	(C6-C3-C6)*2
tannins condensés (proanthocyanidines, ou flavolans)	C6-C3-C6)*n

2.1.3.3.1.1.2. Classification des polyphénols :

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes On distingue les acides phénoliques (phénols simples), les flavonoïdes, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les tannins (**Boros, 2010**).

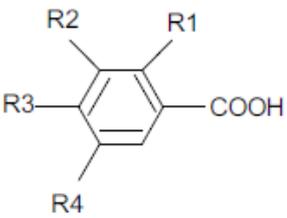
A/ Les acides phénoliques :

Cette classe est divisée en trois sous classes :

A.1 / Acides hydroxybenzoïques :

- Sont des dérivés de l'acide benzoïque
- Ont une structure générale de base de type (C6-C1)
- Existents souvent sous forme d'esters ou de glycosides
- Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le **tableau 4**:

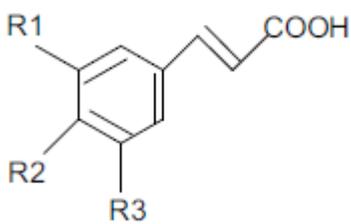
Tableau 04 : Principaux acides hydroxybenzoïques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

A.2 / Acides hydroxycinnamiques :

- Dérivent de l'acide cinnamique
- Ont une structure générale de base de type (C6-C3)
- Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques
- Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, **le tableau 5** représente les principaux acides hydroxycinnamiques (ZAGHDAD, 2009).

Tableau 05 : Principaux acides hydroxycinnamiques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

B. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent chez les plantes un groupe très diversifié de métabolites secondaires qui se produisent naturellement sous leurs formes conjuguées (MACEIJ, 2000). Ils sont des composés phénoliques et interviennent probablement pour protéger les plantes des herbivores et contrôler le transport des auxines (JUDD et al., 2002).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (PIQUEMAL, 2008), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (BOUDET, 2000).

Les flavonoïdes sont classés selon plusieurs critères : présence ou non d'une double liaison en position 2, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position 3. Des groupements hydroxyles (mais également méthoxyles) peuvent le plus souvent se situer en position 2', 3', 4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7 (Figure 3).

Les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique (du carbone C2 vers le carbone C3) ; les flavones et flavonols d'une oxydation (formation de la double liaison sur le cycle C) respectivement des flavanones et des dihydroflavonols.

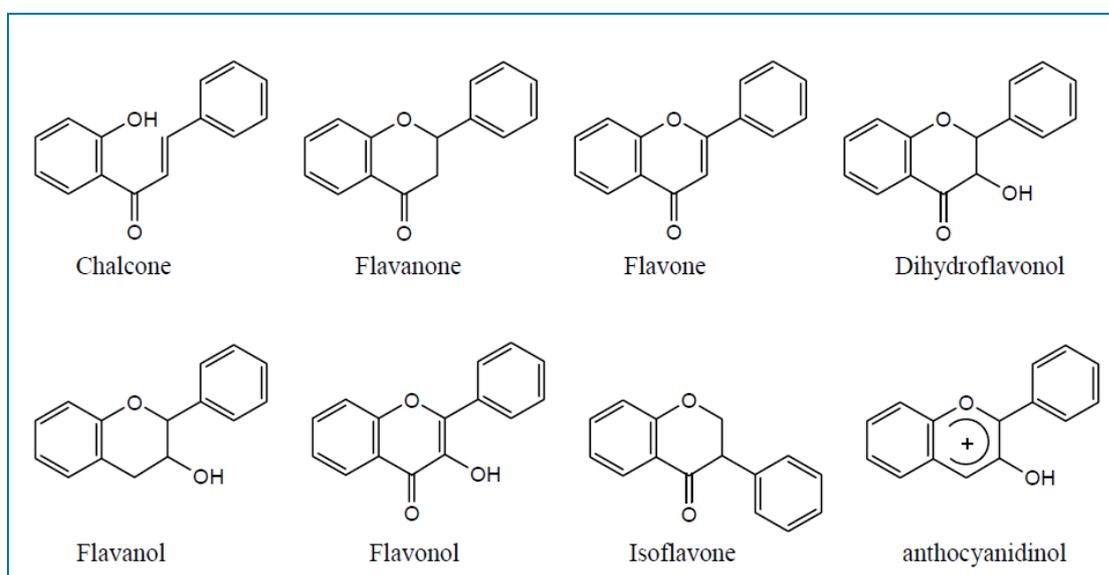
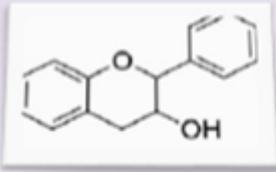
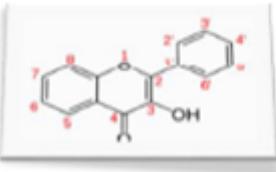
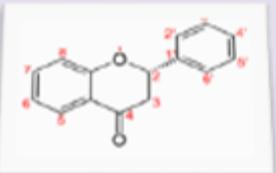
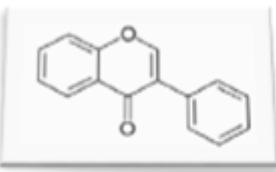
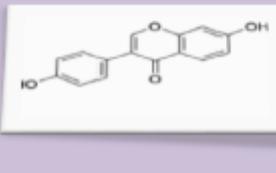


Figure 3 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes (MAKHLOUFI, 2010).

B.1/Classification des flavonoïdes :

Les groupes représentatifs de flavonoïdes sont énumérés dans le **Tableau 6** ainsi que leur structure moléculaire et le composé le plus connu de chaque groupe

Tableau 6 : Tableau représentant la structure de base des principaux flavonoïdes

Classe	Formule	Source	Propriété
Flavanols		Raisins, Thé, cacao	Antioxydants naturels anticancéreuses
Flavonols		Oignon, pomme, brocoli, fruits rouges	antihistaminique, anti- inflammatoire et antioxydante.
Flavanones		Les Agrumes : orange, citron, pamplemousse, mandarine.	neutralisation des radicaux libr.es. amélioration de l'absorption de la vitamine C.
Isoflavones		Soja	phytoestrogéniques. - Source de phytoestrogènes.
Anthocyanes		Myrtille, mûre, raisin noir.	la lutte contre le vieillesse cellulaire en améliorant l'élasticité et la densité de la peau. - antiseptiques urinaires.

C. Les lignanes:

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936. Ils sont les dimères des unités de phenylpropane (C6 C4) (**Benarous, 2009**).

Les lignanes jouent sans doute un rôle important pour la défense des végétaux. En effet, des propriétés antibactériennes, antifongiques et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe (**Bruneton, 1999**).

La distribution botanique est large : plusieurs centaines des composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles (**Midoun, 2011**).

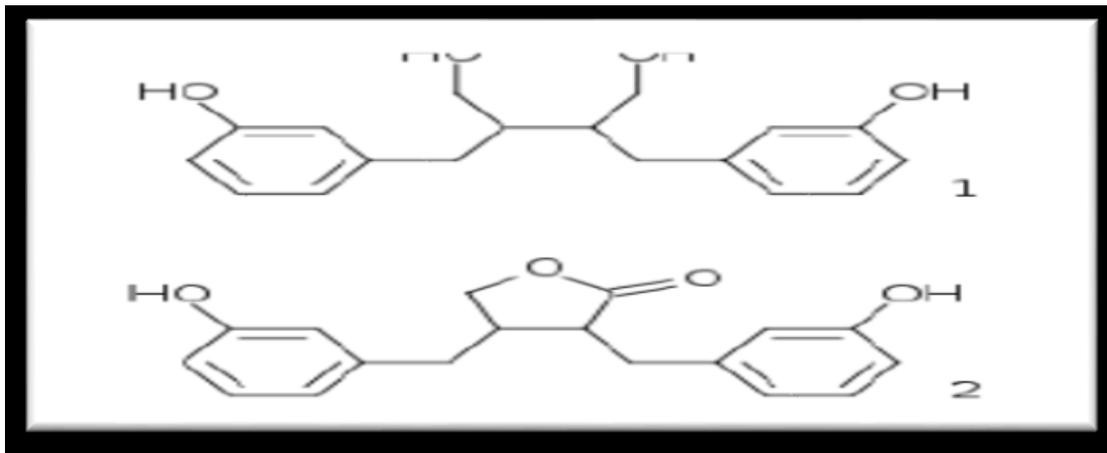


Figure 4 : Structure des lignanes (Midoun, 2011).

C.1 Structure des lignanes :

Les lignanes sont répartis en huit groupes structuraux (les furanofuranes, les aryltétralines, les furanes, les arylnaphtalènes, les dibenzylbutanes, les dibenzocyclooctadiènes, les dibenzylbutyrolactones et les dibenzylbutyrolactols.), classés selon le mode d'incorporation du (ou des) atome (s) d'oxygène dans le squelette carboné et selon le type de cyclisation (Umezawa, 2003).

C.2. Activité biologique :

Selon (McRae et Towers, 1984), les lignanes présentent plusieurs activités biologiques montrant les Antiviral, anticancéreux, antimicrobien et antioxydant.

D. Les stilbènes :

Les Stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par un double liaison, dont la structure est C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, formant un système conjugué. Ils dérivent de la voie des phénylpropanoïdes (Donnez et al., 2009).

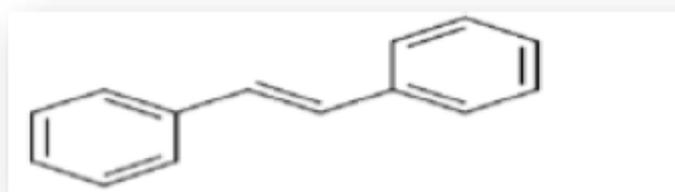


Figure 5: Structure d'un stilbène (Midoun, 2011).

Les stilbènes sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier *et al.*, 2006).

E. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorata* Wild., Fabaceae) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine, d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Leur squelette de base est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford *et al.*, 2001). Elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien.

La famille *Thymelacées* est plus riches en coumarines, et elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Booth *et al.*, 2004).

E.1 Classification des coumarines :

Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles.

La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. selon la nature des substituant sur leurs structures On peut classer les coumarines en cinq catégories : Coumarines Simples, furanocoumarines, pyranoco , dicoumarines ,tricoumarines. (Booth *et al.*, 2004).

Tableau 7 : Principaux types de coumarines (MACHEIX *et al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbéllifécol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Dophnétole

E.2. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques :

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (Stefanova *et al.*, 2007).

F. Les tannins :

Sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3ème groupe important des composés phénoliques. Les tannins possèdent 2 sous groupes; tannins hydrolysables et tannins condensés. Les premiers sont esters acide gallique (gallo et ellagi tannins). Les derniers

sont des polymères de polyhydroxyflavan 3-ol monomères (aussi connu proanthocyanidine) (MACHEIX et al., 2005).

Parmi les caractéristiques des tannins le goût astringent qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (PHILIPPE, 2000).

F.1/Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables anciennement appelés tanins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d'acide-phénols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (Tannases) en ose et en un acide-phénol. Selon la nature de ces tanins, on distingue les tanins galliques dans le cas d'acide gallique et les tanins ellagiques dans le cas d'acide ellagique (Figure 6).

L'acide ellagique résulte de la condensation de deux acides galliques (BOUHADJRA, 2005).

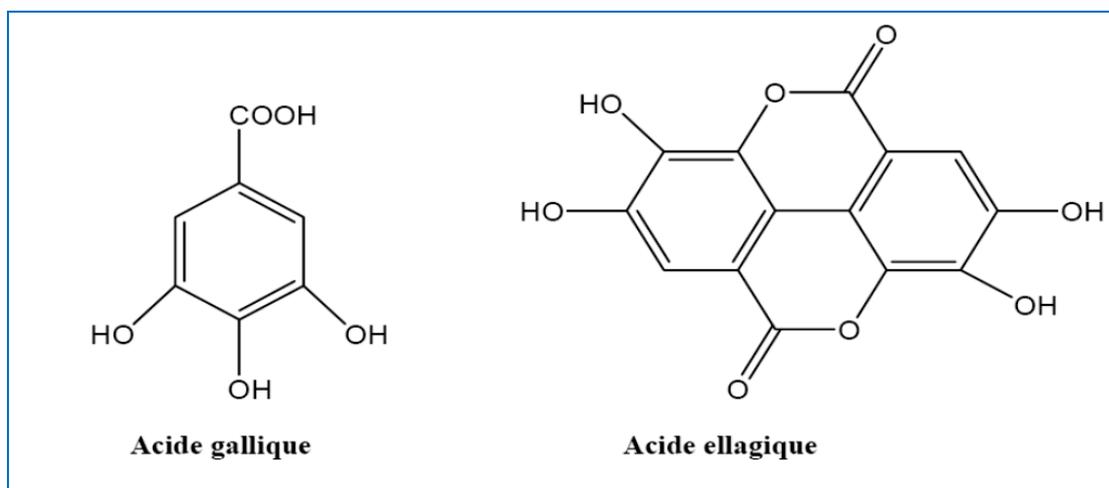


Figure 6 : Structure chimique d'acide gallique et d'acide ellagique (FRANÇOIS-NSEMI, 2010).

F.2/ Tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent fondamentalement, des tanins galliques et ellagiques (Figure 7). Leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas de sucre dans la molécule. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, leur union se fait par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent en position 4-8 ou 4-6, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables (BOUHADJRA, 2005).

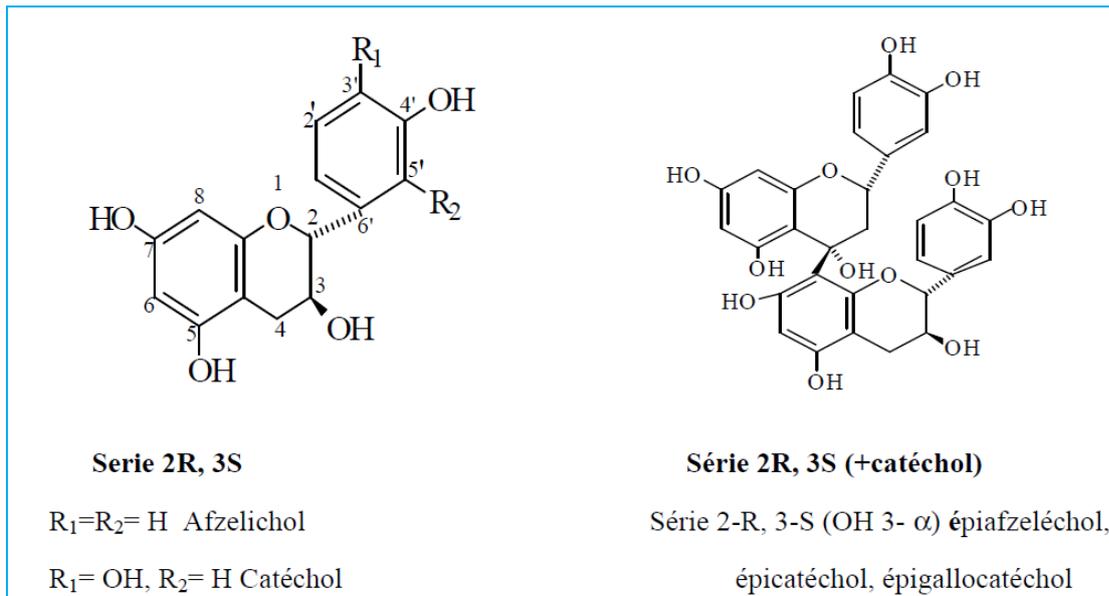


Figure 7 : Les tanins condensés (BOUHADJRA, 2005).

2.1.3.3.1.2. Les alcaloïdes:

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d’origine végétale), hétérocyclique avec l’azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Zenk et Juenger, 2007**).

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications, ils se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (**Krief, 2003**).

Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures (**Stöckigt et al, 2002**).

2.1.3.3.1.2.1. Propriétés des alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiques très hétérogènes. (**Hartmann, 1991**). Leur caractéristiques communes sont leur solubilité faible dans l’eau, facilement soluble dans l’alcool et la propriété de réagir avec des sels de métaux lourds, ce qui permet leur caractérisation aisée (réactifs de Mayer, de Dragendorff, de Wasicky, de Bouchardat). (**Rakotonanahary ; 2012**).

2.1.3.3.1.2. 2. Structure des alcaloïdes :

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d’acide aminés tels que le tryptophane, la lysine, l’aspartate... (Cyril, 2001). On distingue trois grandes classes selon qu’ils possèdent ou non un acide

aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent ou non au atome d'azote dans un hétérocycle (Hartmann ,1991).

2.1.3.3.1.2.3. Classification des alcaloïdes

A. Les alcaloïdes vrais :

Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. (Badiaga ; 2011).

B. Les pseudo-alcaloïdes :

Les pseudo-alcaloïdes ne sont pas des dérivés des acides aminés. (Badiaga ; 2011). Généralement Les pseudo-alcaloïdes sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (Rakotonanahar.y ; 2012).

C. Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils sont élaborés in vivo à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques ». (Badiaga ; 2011).

2.1.3.3.1.2. 4. Rôle des alcaloïdes

A. Effet sur la plante

Les alcaloïdes jouent un rôle de défense pour le végétale la plupart entre eux ont un gout amer si bien qu'ils caractérisés comme composé répulsifs vis-à-vis des animaux et des insectes (Hartmann ,1991) .certain alcaloïdes sont fortement toxique .la nicotine, par exemple, est un poison violent pour les insectes et a été la premières insecticides utilisés par l'homme. (Yang et al ; 2010) et ils Protègent la plante contre les rayons ultraviolets comme ils ont des effets contre les herbivores. (Mauro, 2006).

B. Effet pharmacologique

Tableau 08: quelques exemples des alcaloïdes et leur effet pharmacologie. (Badiaga, 2011).

Les alcaloïdes	Image	Effet pharmacologie
caféine		stimulant centrale
Morphine		dépressant cardiaque et diurétique narcotique
Ephédrine		anti-tumeur et sympathomimétique

2.1.3.3.1.2.5. Les dérivés des alcaloïdes

Tableau 09 : Les dérivés des alcaloïdes (Mauro, 2006).

Les dérivés des alcaloïdes	Exemple	Les propriétés
Alcaloïdes dérivés de la lysine	la lobéline, la spartéine.	-Utiliser en médecine comme agent stimulant de rythme cardiaque
Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine	l'éphédrine, la papavérine	-Inhibe la sensation de douleur.
Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique	La fébrifugine	-Antipyrétiques, antiparasitaires et antitumorale.
Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique	La nicotine	Effet contre les attaques des herbivores et des insectes.
Alcaloïdes dérivés de l'histidine	La pilocarpine	-Utilisée en ophtalmologie dans le traitement du glaucome
Alcaloïdes dérivés du tryptophane	La quinine	-Utilisée dans les traitements de la crampe nocturne de la jambe.
Alcaloïdes dérivés de l'ornithine	La cocaïne	-Utilisée dans le domaine de l'odontologie.

2.1.3.3.1.3. Les terpenoïdes :

Le terme **terpène** innover par Kekulé, être **originaire** : de l'arbre de terebinth : « PistaciaTerebinthus » (Ayad, 2008).

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaissa, 2011)

L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (Huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Malecky, 2005).

2.1.3.3.1.3. 1. Structure des terpénoïdes :

Les terpènes sont des hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_8)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8

Le terme terpénoïde (Terpènes) regroupent un ensemble de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, Etc.) (Malecky, 2005. Benaissa, 2011).

Avec plus de 40 000 molécules connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux (Aharoni et al., 2005).

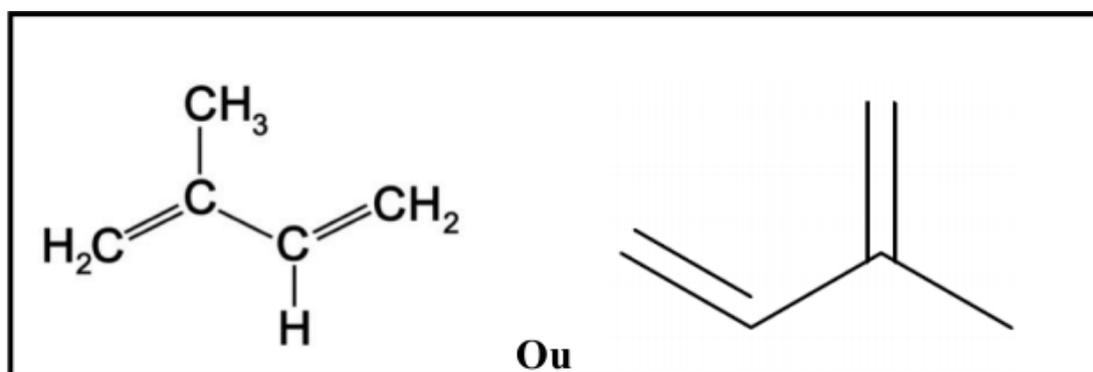


Figure 08 : structure de base de l'isoprène (khenaka, 2011).

2.1.3.3.1.3. 2. Classification des terpénoïdes

La classification des terpénoïdes est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de Base isoprène en donnant des hémiterpènes (C_5), monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}), tetraterpènes (C_{40}) et Polyterpènes (Mebarki, 2010).

Tableau 10 : Quelques exemples des différents types de terpénoïdes (Belbache, 2003).

N	Squelette carboné	Type de terpenoïdes	Exemple de molécule
1	C5	Hemiterpène	Isoprène
2	C10	Monoterpène	Nérol, citronnelle, huiles essentielles
3	C15	Sesquiterpènes	B-cadinène
4	C20	Diterpène	Scalaréol, phytol
6	C30	Triterpène	Lanostérol
8	C40	Tetraterpène	Caroténoïdes
> 8	> 40	Polyterpène	Caoutchouc

2.2. Les huiles essentielles :

2.2.1. Généralités :

Une huile essentielle est un extrait liquide très complexe qui contient les principes actifs d'une partie d'un végétal, c'est le résultat de l'extraction de l'essence d'une plante aromatique (**Calvet, 2012**).

Une huile essentielle est définie comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physique ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par des distillations sèche » (**Duval, 2012**).

2.2.2. Répartition :

Les huiles essentielles peuvent être stockées, dans tous les organes végétaux : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou grains (carvi). Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes (**Ochoa, 2005**).

2.2.3. Biosynthèse et composition chimique :

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc (**Garnéro, 1996**). Il en résulte que les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes de composés organiques,

possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Lahlou, 2004**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Le groupe des terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (**Clarke, 2008**).
 - Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents.
- Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

2.2.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**). Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de saffran, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (**Bruneton, 1999; Desmares et al., 2008**).

Elles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras. Par évaporation, peuvent retourner à l'état de vapeur sans laisser de traces, ce qui n'est pas le cas des huiles fixes (olive, tournesol ...) qui ne sont pas volatiles et laissent sur le papier une trace grasse persistante (**Bernadet, 2000**).

Elles sont liposolubles, entraînaient à la vapeur d'eau. En ce qui concerne leurs propriétés chimiques (**Benayad, 2008**). Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (**Bruneton, 1999**). Les huiles essentielles sont constituées de différents composants : Terpènes, aldéhyde esters, cétones, lactones....

2.2.5. Classification des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont classées usuellement selon la nature chimique des principes actifs majeurs, plus rarement sur le mode d'extraction (infra), ou les effets biologiques (infra: pharmalcosmétique ou sanitaire); selon **GEORGES, 1979** on retient huit classes principales (les carbures sesquiterpéniques et terpéniques, les alcools, les esters et alcools, les aldéhydes, les cétones, les phénols, les éthers et les peroxydes) avec les composants importants suivants:

- ✓ Huiles essentielles riches en **carbures terpéniques et sesquiterpéniques:**

H.E de térébenthine (alpha-pinène, camphène), H.E de genévrier (alpha-pinène, camphène, cadinène), H.E de citron (limonène)

✓ Huiles essentielles riches en **alcools**:

I-I.E de coriandre (linalol), H.E de bois de rose (linalol), H.E de rose (géraniol)

✓ Huiles essentielles **mélanges d'esters et d'alcools**:

H.E de lavande (linalol, acétate de linalyle), H.E de menthe (menthol, acétate de menthyle)

✓ Huiles essentielles riches en **aldéhydes**:

H.E de cannelle (aldéhyde cinnamique), H.E de citronnelle (citral et citrannal), HE d'eucalyptus citriodora (citronellal)

✓ Huiles essentielles riches en **cétones**:

H.E de carvi (carvone), H.E de sauge (thuyone), H.E de thuya (thuyone), ME de camphrier (camphre)

✓ Huiles essentielles riches en **phénols**:

H.E de thym (thymol), H.E de sarriette (carvacrol), H.E d'origan (thymol et carvacrol), H.E de girofle (eugénol)

✓ Huiles essentielles riches en **éthers**:

H.E d'anis vert, de badiane (anéthol), H.E de fenouil (anéthol), H.E d'eucalyptus globulus (eucalyptol), H.E de cajepout (eucalyptol), H.E de niaouli

✓ Huiles essentielles riches en **peroxydes**:

H.E de chénopode (ascaridol), H.E d'ail (allicine) Huiles essentielles **sulfurées** : H.E de crucifères et de Liliacées

2.2.6. Principaux domaines d'application

En raison de leurs diverses propriétés, les H.Es sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique..., en alimentation par leur activité anti-oxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante.

2.2.6.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les H.Es ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique (**Sallé, 1991**).

2.2.6.2. Agro-alimentaire

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisantes, les H.Es sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym,...). Elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées, kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat,...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du *smen* par exemple par le thym et le romarin (**Teissedre et al, 2000 ; Ismaili Alaoui et al, 1990; Latloui et al, 1994**).

2.2.6.3. Cosmétologie et parfumerie

Les H.Es sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine,... Les H.Es sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, etc (**Seu-Saberno et al., 1984**).

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'H.Es pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

2.2.6.4. Pharmacie

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,...) et sous la forme de préparations galéniques^{2b}. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple *gastralgine* est un digestif anti-acide qui se compose d'H.E de carvi (**Pharmacopée Européenne, 1999**).

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'H.Es comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs,... (**Richard, 1999**).

2.2.7. Toxicité des huiles essentielles

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue ; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérogènes (**Bruneton, 1993**). La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le safrole, l'estragole, la β -arasonne, et le méthyl-eugénol (**Guba, 2001**).

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation

aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin (**BERNADET , 2000**).

D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (**BREMNESS, 1998**).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de pratiques telles que l'aromathérapie et autres, conduisent à une utilisation souvent abusive. L'automédication est dangereuse, souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique (**BRUNETON, 1999**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible: une DL₅₀ comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées: anis, eucalyptus, girofle... ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg: l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg); l'essence de moutarde (0.34 g/kg); l'origan et la sarriette (1.37 g/kg); le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**BRUNETON ,1999**). Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (**BERNADET ,2000**).

Les huiles essentielles peuvent provoquer: agitation, tremblements généralisés, coma, hématurie, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. Dans certains cas la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation (**BRUNETON ,1999**). En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants "allyl et propénylphénols" de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers (chez les rongeurs). Mais actuellement, l'apiol, le dillapiol, l'eugénol et la myristicine ne sont pas considérés comme cancérogènes. Ainsi le cinnamaldéhyde n'induit pas l'apparition de tumeurs, dans certaines conditions (**BRUNETON, 1999**).

2.2.8. Les techniques d'extraction des huiles essentielles :

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le « type » d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (**Lucc, 2005**) (**Figure 9**).

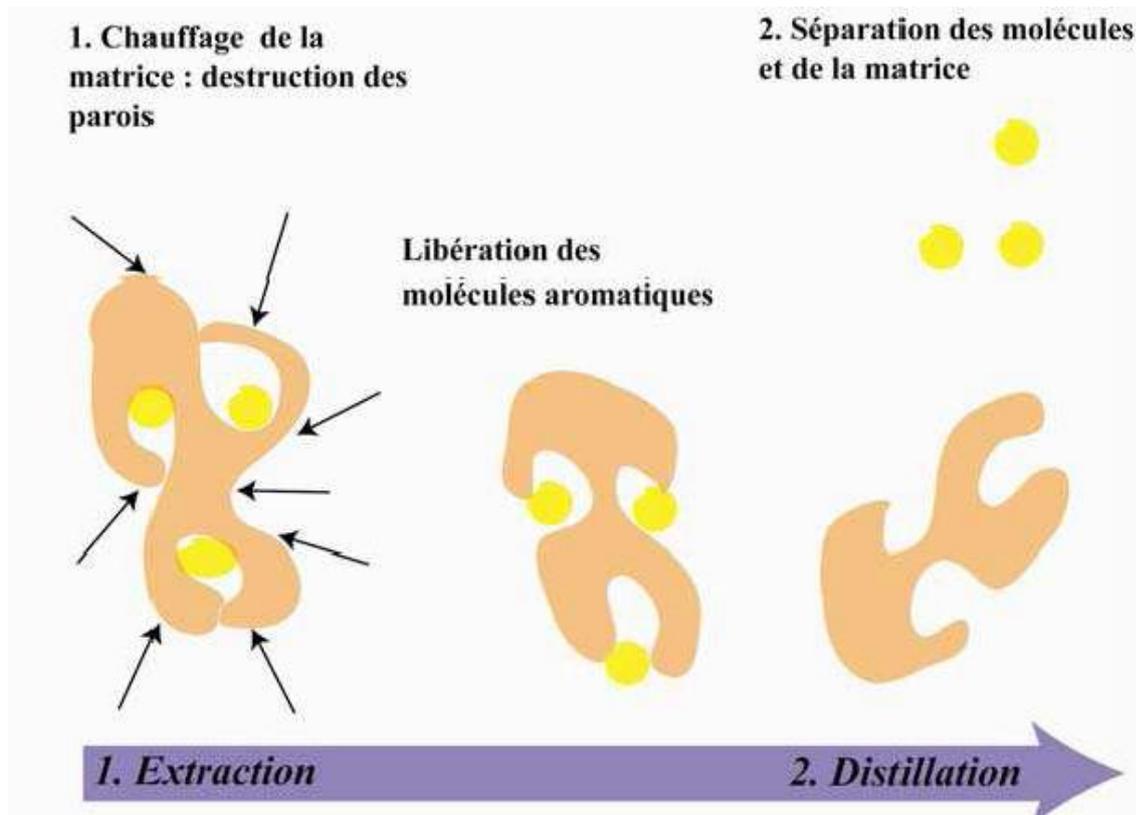


Figure 9: les étapes de l'extraction des huiles essentielles (Lucc, 2005).

2.2.8.1. La distillation :

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme et al., 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc (Lucchesi, 2005).

2.2.8.1.1. L'hydrodistillation (water distillation) :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant

plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Lucchesi, 2005).

2.2.8.1.2. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation) :

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le principe de la distillation à la vapeur d'eau consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la plante à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide formant un mélange «eau + huile essentielle». Recueillies dans un essencier, l'huile essentielle et l'eau florale se séparent par simple différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Neffati, 2010).

2.2.8.1.3. L'hydrodiffusion :

Est une variante de l'entraînement à la vapeur (**Figure 10**). Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau.

Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « Vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (luc, 2005).

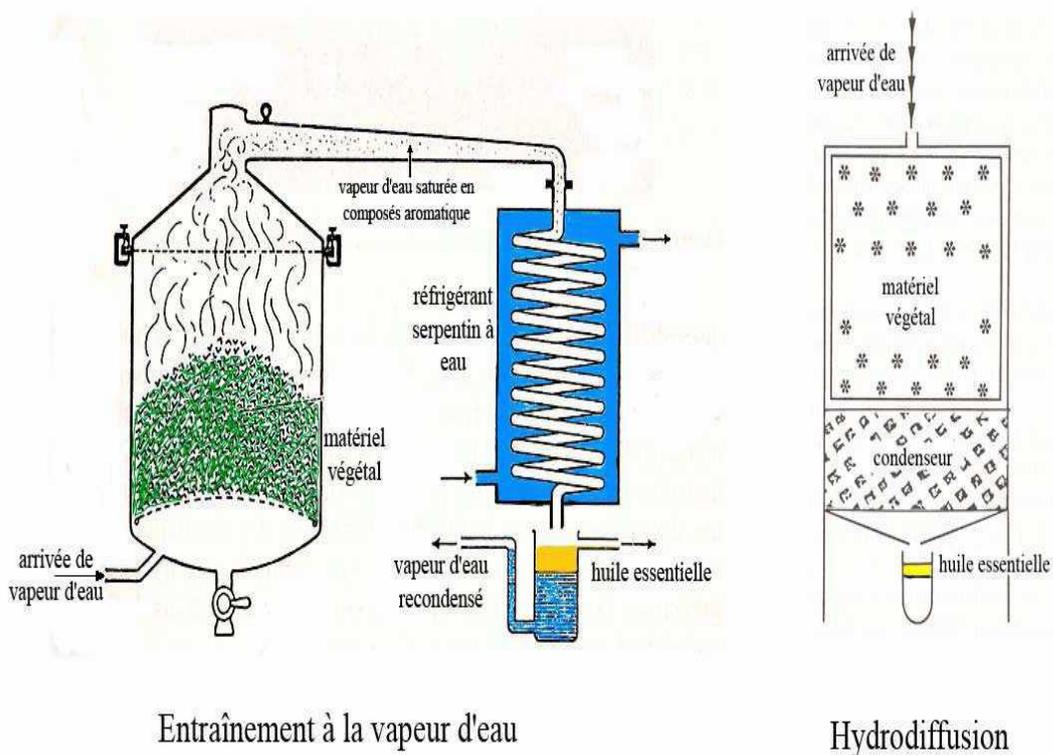


Figure 10 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Lucc, 2005).

2.2.8.2. Extraction par micro-ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelé Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants : rapidité, gain de temps, d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvants résiduels (Chemat, 2009 ; Brian, 1995 ; Mompon, 1994) (Figure 11).

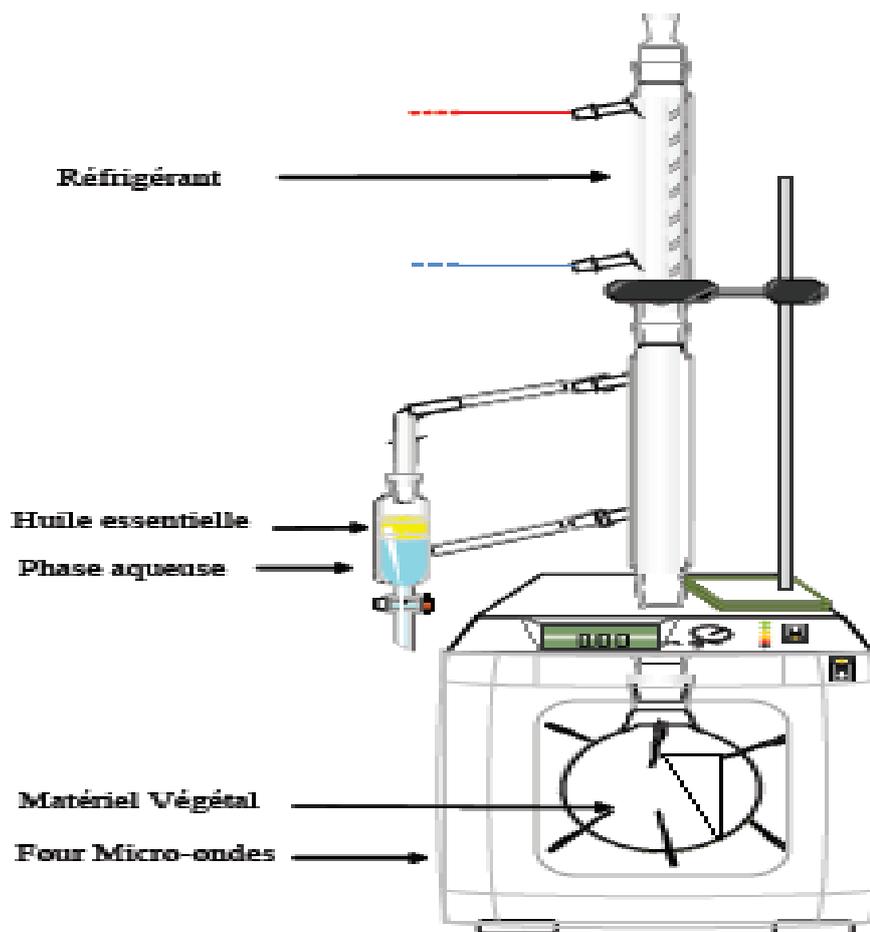


Figure 11: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi et al., 2004)

2.2.8.3. L'extraction au CO₂ supercritique :

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit. Au-delà du point critique ($P= 73,8$ bars, $T^{\circ} = 31,1$ ° C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Piochon, 2008) (Figure 12).

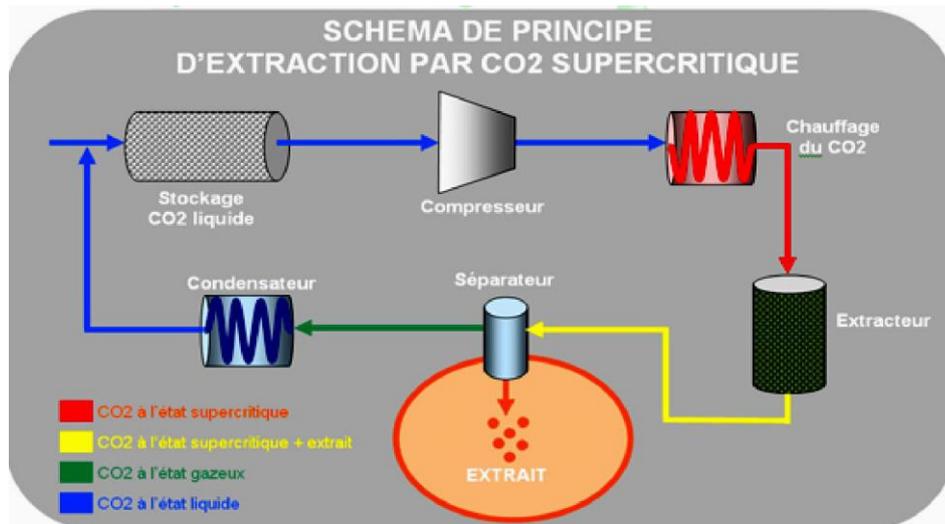


Figure 12: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (Pourmortazavi, 2007).

2.2.8.4. Extraction par les solvants et les graisses :

Il s'agit d'extraits des plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre des composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Richard, 1992 ; Robert, 2000). Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à -10 °C pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle (Proust, 2006).

L'extraction à l'aide des solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (Bruneton, 1999).

2.2.8.5. Expression à froid :

Le procédé de l'expression à froid est plus rentable que l'hydrodistillation pour l'obtention d'huiles essentielles de zestes d'hespéridés. Le principe en est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois, via une gamme variée d'appareillage (Roux, 2008 ; Florent, 2011).

2.2.9. Conditions de conservation et de stockage

Une huile essentielle se conserve dans un contenant propre et sec en aluminium vernissé, acier inoxydable ou en verre teinté de manière à le protéger de la lumière. Ce contenant doit être étanche et permettre de limiter le contact avec l'air (il est possible d'utiliser un gaz inerte ou de l'azote), d'où l'intérêt de remplir intégralement le flacon avec l'huile essentielle. Le stockage doit se faire à l'abri de la lumière et de chaleur. Ces exigences s'appliquent tant au stockage chez le producteur qu'au conditionnement utilisé pour la vente au détail.

L'utilisation de contenants en plastique parfois constatée est à éviter en raison du risque d'interactions entre le produit et la matière plastique (Morel, 2008 ; AFSSAPS, 2008).

2.2.10. Analyses des huiles essentielles et critères de qualité

Seulement une connaissance détaillée des constituants d'huile essentielle mènera à une utilisation appropriée (Buchbauer, 2000), Selon la Pharmacopée, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle comme masse volumique, indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester, etc. Ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. (Afnor, 1996 ; Iso, 1997).

D'autres types d'analyse qui ont pour but d'identifier les différents constituants de l'huile essentielle afin d'en connaître la composition chimique : la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS. (Bourkhiss et al., 2007 ; bouguerra,2012).

2.2.10.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est un outil incontournable dans l'analyse des HE. Cette technique d'analyse est utilisée depuis le milieu du siècle dernier. Elle s'est rapidement imposée de par son coût relativement modéré, son automatisation, sa robustesse ainsi que sa large gamme de colonnes et de détecteurs disponibles. Son principe repose sur la séparation de composés volatils selon leurs affinités pour la phase stationnaire (colonne).

L'analyse des composés liquides ou solide impose donc la nécessité de les volatiliser à haute température. Ce point étant son inconvénient majeur. Plusieurs détecteurs sont utilisés pour l'analyse des HE, principalement, le détecteur à ionisation de flamme (FID) et le détecteur à conductibilité thermique (TCD) (EL-HACI, 2015).

2.2.10.2. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS

Le détecteur SM permet, via les spectres, de donner des informations sur la structure des composés d'une HE permettant ainsi leur identification. En sortie de colonne (partie CPG), le composé élué est bombardé par un faisceau d'électrons de haute énergie (70eV). La molécule s'ionise et se fragmente en différents ions. Ces ions sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z). Cette séparation se fait dans le quadripôle. Tout le processus se fait à vide afin d'éliminer toutes les entités non chargées positivement et d'augmenter la durée de vie des ions formés (EL-HACI, 2015).

2.2.11. L'activité antioxydante des huiles essentielles:

Les HEs sont des composés qui possèdent de fortes propriétés antioxydantes. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure HS et l'activité antioxydante (Bolwer et al., 1995). Parmi les agents qui augmentent cette activité le nombre des groupements hydroxyles sur le noyau B, quand le nombre augmente l'activité augmente (Cook et Samman, 1996).

Cette approche est attestée par la chimie de plusieurs tests développés pour doser l'activité antioxydante d'extraits naturels ou de composés phytochimiques isolés, basés sur la réaction de l'antioxydant potentiel avec certains radicaux persistants colorés (ex DPPH• ou ABTS•+) ou avec certaines espèces non-radicalaires oxydantes telles que les ions Fe³⁺ (par exemple, dosage FRAP) (Amorati et al., 2013).

2.2.11.1. Méthodes de détermination de l'activité Antioxydante

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante

- le test de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) .
- le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH).
- Le test de FRAP.

2.2.11.1.1. Le test d'ABTS

L'extrait de plante est mis en contact avec les radicaux libres d'ABTS préformés et l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à 734 nm. Les radicaux libres d'ABTS sont fondamentalement créés de deux manières : A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium K₂S₂O₈ : les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage. A partir de l'ABTS et du chlorure de 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) (AAPH) jouant le rôle

d'initiateur de réaction dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7.4. Le mélange est chauffé à 68°C. L'absorbance de la solution obtenue (bleu — vert) est ajustée à $0,650 \pm 0,020$ à 734 nm (Kim et al., 2003).

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. Les réactions qui se déroulent peuvent être du type ABTS / *trans*-3,3',4', 5,7-pentahydroxyflavan (catéchine) ou ABTS / 1, 3,5- trihydroxybenzène (phloroglucinol) (Ferryhough et al., 2006).

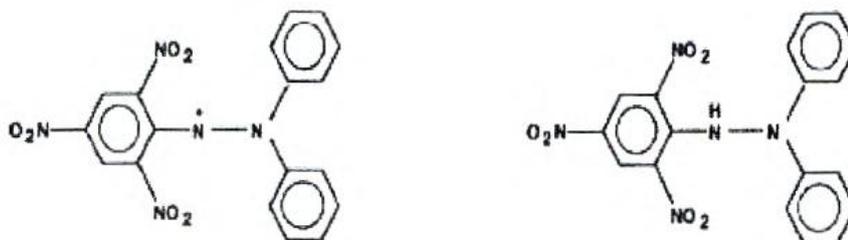
2.2.11.1.2. Le test du DPPH

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violette intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) (Rolland, 2004).

Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un hydrogène (Figure 13), alors cette réaction donne lieu à la forme réduite avec perte de la couleur violette (avec une couleur jaune pâle résiduelle du groupement picryl encore présent).

Ce dernier subira d'avantages de réactions et réagira avec une autre molécule de la même espèce. Produite par une réaction parallèle avec inhibition du radical.

Ainsi le DPPH vise à représenter un radical libre dont l'activité doit être supprimée par la substance antioxydante (polyphénols)



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Diphenylpicrylhydrazine (non radicalaire)

Figure 13: Structure du DPPH (Rolland, 2004).

2.2.11.1.3. Le test FRAP

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition

de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode Hinneburg adaptée par **Lamien- Meda et al. en 2008**. Le dosage consiste à réduire à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)- TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (**Figure 14**). La variation de la coloration est mesurée 700 nm.

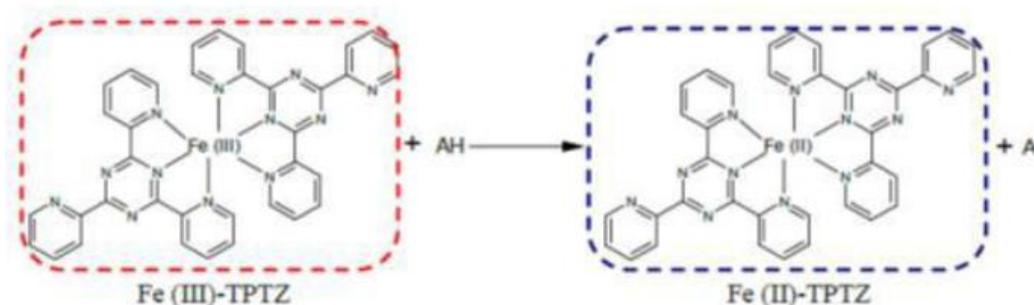


Figure 14: Mécanisme réactionnel du test FRAP (**Lamien- Meda et al., 2008**)

Chapitre 3

Les plantes étudiées

3. Les plantes étudiées

3.1. *Haloxylon articulatum* Boiss

La famille des Chenopodiaceae comprend 1400 espèces réparties en 103 genres, cosmopolites, habitant surtout les régions arides du globe. Beaucoup d'espèces sont halophiles, nitrophiles ou rudérales. Le genre *Haloxylon* comprend 10 espèces, réparties en Méditerranée et Asie aride (Emberger, 1960).

3.1.2. Synonymes :

Haloxylon scoparium Pomel (Ozenda, 1958 ; Quezel et Santa, 1963); *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. ; *Arthrophyton scoparium* Pomel (Quezel et Santa, 1963) ; *Haloxylon tamariscifolium* Pau. (Ozenda, 1958).

3.1.3. Systématique :

Selon la classification phylogénétique (APG II, 2003) *H. articulatum* appartient aux taxa suivants :

Embranchement :	<i>Spermaphytae.</i>
Sous-Embranchement :	<i>Angiospermae.</i>
Classe :	<i>Magnoliophyta.</i>
Ordre :	<i>Caryophyllales ou Sapindales.</i>
Famille :	<i>Chenopodiaceae.</i>
Genre :	<i>Haloxylon.</i>
Espèce :	<i>articulatum Boiss.</i>

3.1.4. Noms vernaculaires :

Arabe : Remt (الرمت), Nadjrem (Quezel et Santa, 1963).

Français : saligne à balai (IUCN, 2005).

3.1.5. Description botanique :

H. articulatum est un arbrisseau à tiges grêles dressées, portant des rameaux érigés, verts foncés noircissant en séchant (Ozenda, 1958) et cylindriques, souvent articulés, sans feuilles distinctes, assez proches des *Anabasis* par leurs caractères botaniques (Mohammedi, 2013). Les épis floraux sont courts groupées au sommet des rameaux (Figure 15). Ses fleurs sont discrètes mais à la fin de l'automne, quand l'humidité a été suffisante, l'extrémité de ses rameaux se couvre de fruits entourés d'une couronne d'ailes membraneuses brillantes et vivement colorées de rose ou de rouge

(Mohammedi, 2013) de 7 mm de diamètre (Quezel et Santa, 1963). Ce pâturage amer est méprisé par le bétail qui ne le broute que par nécessité (Mohammedi, 2013).



Arbuste



Tiges

Fleurs

Figure 15 : Morphologie de *Haloxylon articulatum* Boiss (Fasla, 2009).

3.1.6. Aire de répartition géographique :

Se développant dans les regs, les sols un peu salés ou gypseux, *H. articulatum* est très commun dans tout le Sahara septentrional jusqu'au Tadmait (Ozenda, 1958) ; et est distribué en Espagne du sud-est, l'Iran, la Turquie, l'Irak et la Syrie (Ben Salah et al., 2002).

3.1.7. Utilisation en médecine traditionnelle :

C'est une plante utilisée en médecine traditionnelle comme remède pour le traitement des désordres de l'oeil et de la vision, des maladies de la peau, du diabète sucré (Bellakhdar, 1997 ; Allali et al., 2008) et de l'hypertension (Eddouks et al., 2002), les problèmes de digestion, les piqures des scorpions (Mohammedi, 2013) mais aussi pour le traitement du cancer, des hépatites, des inflammations, et de l'obésité. on rapporte aussi que l'extrait aqueux de cette plante présente une activité anticancéreuse, et larvicide (Sathiyamoorthy et al., 1999).

3.1.8. Composition et propriétés biologiques :

Haloxylon articulatum renferme des polyphénols, des saponosides et plus particulièrement des alcaloïdes, ainsi des dihydroisocoumarines. *H.articulatum* de l'Algérie contient la cargénine, et la *N*-méthylisosalsole comme alcaloïdes majoritaires type tétrahydroisoquinoline et la isosalsole, salsolidine, isosalolidine, déhydrosalsolidine, tryptamine et la *N*-méthyltryptamine comme alcaloïdes minoritaires (**Benkrief et al., 1990 ; Mohammedi, 2013**).

Les feuilles contiennent des flavonols triglycosides , l'isorhamnétin 3-*O*-β-Dxylopyranosyl- α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside, l'isorhamnétin 3-*O*-β- D-apiofuranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside, l'isorhamnétin 3-*O*-α- L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-galactopyranoside (**Benkrief et al., 1990 ; Mohammedi, 2013**).

Les parties aériennes sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les désordres et les problèmes de l'oeil et la vision, les problèmes de digestion, les dermatoses, les piqûres des scorpions. Les extraits aqueux ont un pouvoir anticancéreux, anti-spasme et larvicide. *In vivo*, **Bourogaa et al. (2012)** ont démontré que les extraits aqueux des feuilles de *H. articulatum* exercent une activité hépatoprotectrice chez le rat.

En Algérie la tisane de la partie aérienne utilisée pour leur effet antidiabétique et, la poudre de *H. articulatum* pour les inflammations (**BOUKHALFA, 2014**).

3.1.9. Activité biologique

Haloxylon articulatum appartient à un groupe de plantes appelées les halophytes. Ces plantes ont la capacité de croître dans des conditions de stress abiotique comme la haute salinité et la haute température. Cette capacité remarquable résulte du développement de mécanismes de défense et la synthèse de molécules conçues pour résister aux conditions extrêmes de l'environnement. De ce fait ces plantes sont très riches en molécules bioactives, et sont considérées comme une potentielle source de nouveaux médicaments (**Ksouri et al., 2012**).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur différents extraits de *H. articulatum*, et différentes activités biologiques ont été prouvées. Des extraits aqueux et méthanolique, administrés à des rats traités par l'éthanol, ont diminué d'une façon importante, le stress oxydative et l'altération hépatique engendrés par la toxicité de l'éthanol (**Bourogaa et al., 2013 ; Bourogaa et al., 2014**). Ces activités hépato-protective et antioxydante, ont été reliées à la présence de composés phénoliques dans la plante (**Bourogaa et al., 2014**). De plus dans un autre travail, l'équipe de Bourogaa a aussi démontré que *H. articulatum* est efficace contre les cellules leucémiques, et les molécules

responsables sont les flavonols triglycosides (**Bourogaa et al., 2011**). D'autre part *H. articulatum* s'est révélée aussi puissante contre les mollusques, plusieurs extraits ont été testés, et leur activité molluscicide a été prouvée. Ces travaux ont aussi identifié la molécule ayant la plus importante activité, il s'agit d'un alcaloïde, le N- methylisosalsoline (**Mezghani-Jarraya et al., 2009**). Récemment un extrait éthanolique de *H. scoparia*, a montré une activité d'inhibition de la mélanogénèse *in vitro*, cette activité a été attribuée au catéchol et à des dérivés tétrahydroisoquinoliniques (**Chao et al., 2013**).

3.1.10. Phytochimie

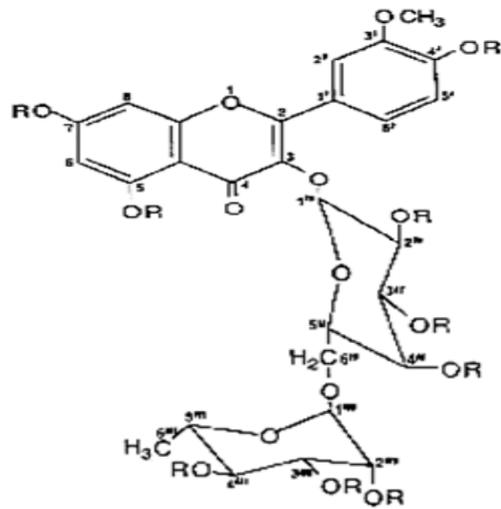
Peu de travaux ont été réalisés sur la phytochimie de *H. articulatum* (**Ben Salah et al., 2002**). Cette plante contient des polyphénols avec une part substantielle de flavonoïdes, des diterpènes qui peuvent expliquer ses différentes activités pharmacologiques. Les hirseines A et B, deux daphnane diterpénoïdes, se sont avérées inhiber la mélanogénèse dans les cellules de mélanome murin B16 (**Miyamae et al., 2009**). Cependant les alcaloïdes représentent 2 à 4.5% : anabasine, aphyllidine et lupinine (**IUCN,2005**).

Les principales molécules isolées et identifiées sont montrées dans **le tableau 11**.

Tableau 11: La composition chimique de *Haloxylon articulatum*.

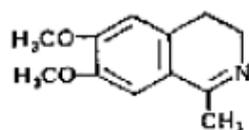
Métabolites secondaires	Classe	Nom chimique	Références
Alcaloïdes	Tétrahydroisoquinolines	- Carnéguine - N-methylisosalsoline	Benkrief et al., 1989. El-Shazly, 2003.
	Isoquinolines	-Isosalsoline -Salsolidine -Dehydrosalsolidine	
	Indole	-Tryptamine -N-méthyltryptamine	
	Isoquinolone	N-méthylcorydaldine	
	β-carboline	2-Méthyl-1,2,3,4- tétrahydro-β-carboline	
Composés phénoliques	Flavonol triglycosides	Isorhamnetin 3-O-β -D-xylopyranosyl-(1'''→3''')-α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6'')-β -D galactopyranoside	Ben Salah et al., 2002.
		Isorhamnetin 3-O-β-D-apiofuranosyl-(1'''→2'') [α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6'')]-β -D-galactopyranoside	
		Isorhamnetin 3-O-α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→2'') [α -L-rhamnopyranosyl-(1'''→6'')]-β -D-galactopyranoside	
	Flavone	Chrysoeriol	Chao et al., 2013.
	Phénol simple	Catéchol	
	Acides phénols	-Acide coumarique -Acide cinnamique -Acide cafféoylquinique	

Dans les **figures 16 et 17** nous reportons en exemple quelques composés isolés de cette espèce.

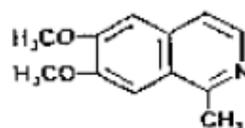


R=H: Isorhamnétol-3-O- β -D-robinobioside

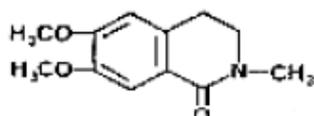
Figure16: Flavonoïde isolé de *Haloxylon articulatum* (BELHADJ-TAHAR, 2018).



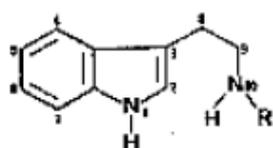
Déhydrosalsolidine



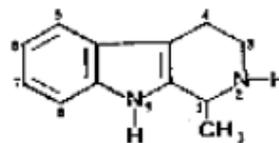
Isosalsoline



N-méthylcorydaline



R=H : Triptamine
 R=CH₃ : N- ω -méthyltriptamine



éléagnine

Figure 17 : Exemple d'alcaloïdes isolés de *Haloxylon articulatum* (BELHADJ-TAHAR, 2018).

3.1.11. Activités Antioxydante

Une étude faite par **Haida.S** et al., (2020) à confirmer la richesse d'*Haloxylon articulatum* en antioxydants naturels (ou polyphénols), ce qui peut expliquer la l'intérêt de son utilisation en médecine traditionnelle. L'activité antioxydante de ces composés est principalement due à leurs propriétés redox qui les font agir comme agents réducteurs, et peuvent également être des donneurs d'hydrogène (**Lobo et al., 2010**). De plus, la synergie entre l'antioxydant composés dans le mélange rend l'activité antioxydante non seulement dépendant de la concentration, mais aussi de la structure et de l'interaction entre les antioxydants (**Djeridane et al., 2006**).

3.1.12. Toxicité

Haloxylon articulatum peut induire une thrombocytopénie, plutôt produire des perturbations dans la cascade de coagulation. Ces perturbations sont fréquemment associées à une toxicité hépatique aiguë et à une maladie hépatique chronique (**Lisman T et al, 2010**).

Kharchoufa L et al en 2020 montrent que l'extrait de *H.articulatum* est considéré comme légèrement toxique. Les résultats de 30 jours de toxicité subaiguë par voie orale ont indiqué que l'extrait de *H.articulatum* présentait une toxicité pour le foie chez le rat déterminée par des analyses hématologiques, biochimiques sériques et/ou histologiques à des concentrations élevées (1000 mg/kg et 2000 mg/kg). Ces résultats fournissent des données préliminaires précieuses sur le profil toxique du SH. Par conséquent, d'autres évaluations (telles que des études de génotoxicité, de toxicité subchronique, de reproduction et de toxicité des composés) sont nécessaires pour procéder aux études cliniques de cette plante.

3.2. *Thymelaea hirsuta*

3.2.1. Généralité

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres, bien que certains auteurs n'en répertorient qu'une cinquantaine (**Ferrari, 2002**). Elle constitue l'une des principales familles parmi les neuf formant l'ordre des Malvales (**Judd et al., 2002**).

En étymologie, les thymélées doivent leur nom générique à une espèce dont les feuilles ressemblent à celles du thym et le fruit à une petite « olive », du grec « elaiá » (**Beniston, 1984**).

Les Thymelaeaceae sont représentées par une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Thymelaea* et *Daphne* (**Bruneton, 1999**). Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique (**Figure 18**), mais sont absents dans les régions aux climats les plus froids (**Borris et al., 1988 ; Herbada, 2006 ; Vernon et al., 2007**).



Figure 18 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae (**Heywood, 1996**).

3.2.2. Description botanique

Thymelaea hirsuta est une plante arbustive vivace à feuilles persistantes appartenant à la Famille Thymeleaceae, communément appelé «**Methnane**», pousse abondamment en Méditerranée, plaines côtières, La partie aérienne de cette espèce a traditionnellement été utilisé comme décoction dans le traitement du diabète et hypertension (**Le Floc'h, 1983**). *T.hirsuta* a été utilisé en médecine populaire pour son anti-mélanogénèse (**Kawano et al., 2007**), antioxydant (**Djeridane et al., 2006**; **Kadri et al., 2011**), hypoglycémique et antidiabétique (**El Amrani et al., 2009**) et anti-inflammatoire et antiarthritique (**Azza et Oudghiri, 2015**).

Selon **Batanoumy, (2005)**, *Thymelaea hirsuta* est une plante vivace ne mesurant pas plus d'un mètre de hauteur (**Figure 19**). Sa souche est ligneuse, forte et porte de nombreux rameaux tombants (**Pausas et al., 2006**) garnis de nombreuses petites feuilles de 6mm environ, ovales presque imbriquées, épaisses, luisantes au-dessus et cotonneuses en dessous (**Jeanmonod et Gamisans, 2007**).

Dans les conditions climatiques favorables, la floraison débute à partir du mois d'octobre et s'étale jusqu'en avril (**Jeanmonod et Gamisans, 2007**). La plante porte sur des pieds différents, soit des fleurs unisexuées, soit des fleurs hermaphrodites (**Jeanmonod et Gamisans, 2007** ; **Renner, 2001**).

Selon **Dommée et al., (1984)**, les pieds bisexués sont d'abord mâles, deviennent femelles ultérieurement. L'abondance de cette catégorie pourrait indiquer l'importance de la monœcie d'une espèce considérée jusqu'à présent comme essentiellement dioïque. Les fleurs de cette plante sont groupées entre 2 et 5 périanthes jaunâtres à l'intérieure, blanches, soyeuses et pubescentes à l'extérieur (**Beniston, 1984** ; **Somon, 1987**).

Les petites fleurs de 5mm polygames et sans bractées se trouvent sur les rameaux ou sur les ramifications naissantes, sub-sessiles et insérées les unes à côté des autres par l'intermédiaire d'un court pédicelle sur l'extrémité renflée de l'axe de l'inflorescence ; le pédicelle avec ses longs poils recouvrent la base de la fleur. Le calice pétaloïde, poilu à l'extérieur, glabre à l'intérieure, se divise à la partie supérieure en quatre sépales étalées et huit étamines soudées (**Cuvier, 1825** ; **Deramchia, 2018**). Le style filiforme et latéral (**Villars, 1807** ; **Deramchia, 2018**) est terminé par un stigmate légèrement velu (**Deramchia, 2018**).

Deux types de fleurs peuvent être distingués, mâles et femelles. Les fleurs mâles verdâtres ont un calice cylindrique (**Figure 19 B**), alors que celles femelles sont jaunâtres à calice renflé (**Figure 19 C**).

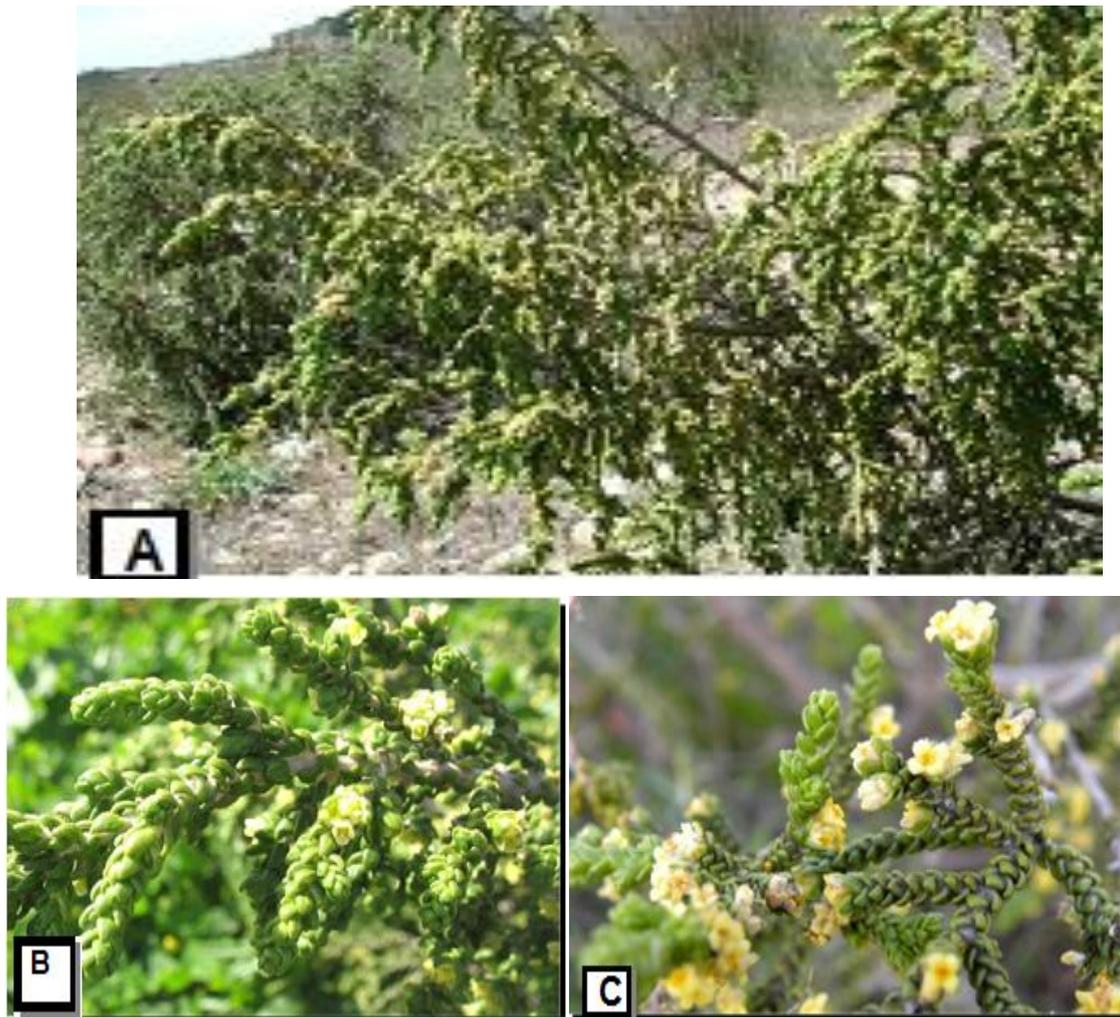


Figure 19 : *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher (Photos originales). **A-** feuilles cotonneuses.

B- fleurs mâles. **C-** fleurs femelles (**Deramchia, 2018**).

3.2.3. Biologie et Ecologie

Thymelaea hirsuta est un végétal autotrophe par photosynthèse chlorophyllienne et entomogame dont la dispersion du pollen est assurée par les insectes. C'est une espèce vicariante et chaméphyte frutescente. Elle vit dans les régions méditerranéennes et saharo-arabique, où se trouve un climat semi-désertique (les terres arides), dans les lieux rocaillieux et sablonneux ou les rochers siliceux maritimes (**Cornara et al., 2005**). Selon **Shenbrot (2004)**, *Thymelaea hirsuta* est présente dans la partie méridionale des montagnes centrales du Néguev où les précipitations annuelles sont de l'ordre de 180 à 300mm.

Les éléments nutritifs de *Thymelaea hirsuta* au printemps sont sensiblement plus élevés que ceux présents en été. Ce constat est lié à la différence des éléments nutritifs disponibles dans le sol, la salinité des sols et la quantité de roches exposées. Ces facteurs semblent être les plus importants,

influençant à la fois la phytomasse et la teneur minérale de la plante (Shaltout, 1992). Il semble que la salinité du sol, sa faible teneur en humidité et ses températures extrêmes favorisent les activités phénologiques de *Thymelaea hirsuta* (Shaltout, 1987).

La survie de *Thymelaea hirsuta* est assurée par la reproduction sexuelle qui s'est avérée être le seul moyen de régénérer naturellement les populations, par contre la reproduction végétative est difficile à mettre en œuvre (Minuto et al., 2004).

Les propriétés biologiques de la partie aérienne de *T. hirsuta* a été rapportée comme étant des inhibiteurs efficaces de la -glucosidase in vivo (Bnouham et al., 2012 ; Abid et al., 2014). Des extraits hypoglycémians et antidiabétiques de cette plante ont également été mis en évidence (El Amrani, 2009). Il a montré une inhibition significative de la croissance antitumorale des cellules HT-29 du cancer du côlon humain (Akrouf et al., 2011) et un effet antimélanogénèse sur les cellules de mélanome murin B16, en utilisant un extrait de feuilles. Des effets antibactériens et antifongiques des extraits de *T.hirsuta* ont également été rapportés (Trigui et al., 2013 ; Amari, 2015).

3.2.4. Classification

3.2.4.1 .Classification botanique

Règne :	Végétale
Sous règne :	Tracheobionta
Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous classe :	Rosidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Thymelaeaceae
Genre :	<i>Thymelaea</i>
Espèce :	<i>T. hirsuta</i> (L.) Endl., 1847

L'étude de la morphologie florale des Thymelaeaceae a mis en évidence la confusion régnant dans les relations taxonomiques au sein de cette famille (Heining, 1951). Il a été affirmé que les Thymelaeaceae peuvent être apparentées aux Tiliaceae ou aux Flacourtiaceae. Alors que les caractéristiques de morphologie pollinique ont amené à justifier que les Thymelaeaceae peuvent être très fortement apparentées aux membres crotonoïdes des Euphorbiaceae et aux Buxaceae, mais pas

aux familles des Celastraceae, Combretaceae, Dichapetalaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Penaeaceae, Proteaceae et Tiliaceae (**Erdtman, 1952**).

3.2.4.2. Classification phylogénétique

La dernière décennie a vu se développer la cladistique moderne, ou systématique moléculaire, basée sur l'analyse des séquences de gène ou d'ADN (**Van der bank et al., 2002 ; Herbada, 2006**) dont le principe fondamental est que la preuve d'une parenté phylogénétique entre différents taxons n'est fournie que s'ils partagent les mêmes caractères dérivés (synapomorphies). Ainsi, la délimitation de l'ordre des **Malvales** par **Alverson et al. (1998)**, reprise par l'**APG (1998)** (Angiosperm Phylogeny Group), où s'y trouve les Thymelaeaceae, qui étaient jusque-là souvent associées aux Myrtales.

La classification des Thymelaeaceae dans l'ordre des Malvales « étendu » est d'ailleurs confortée par d'autres caractères, comme par exemple la présence d'acides gras cyclopropaniques (**Vickery, 1980 ; 1981**), de cellules mucilagineuses et d'écorces fibreuses robustes dans cette famille (**Dahlgren et Thorne, 1984**).

Classification phylogénétique des Thymelaeaceae (**Anonyme, 2005**) :

Classe :	Rosopsida
S/Classe :	Rosidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Thymelaeaceae

3.2.5. Composition chimique et utilisation

Les thymelaeaceae ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques (**Borris et al., 1988 ; Baba et al., 1987 ; Yanz et al., 1987**). Les esters diterpéniques de type tiglane, daphnane sont la classe de composés les plus caractéristiques des thymelaeaceae. Ces métabolites peuvent se retrouver dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits et graines) (**Ferrari, 2002**). Ce sont des purgatifs violents qui déclenchent par contact avec la peau ou les muqueuses une réaction inflammatoire intense (**Brooks et al., 1990**) et des effets neurotrophiques (**He et al., 2002 ; Moosavi et al., 2005**) et anticancéreux (**Abou-karam et al., 1998**).

Selon **Brooks et al. (1990)** et **Miyamae et al. (2009)**, des diterpènes daphnanes ont été isolés à partir des feuilles et des rameaux de *Thymelaea hirsuta*.

En outre, les coumarines constituent une autre classe de métabolites secondaires des Thymelaeaceae, intéressante du point de vue taxonomique. Dans cette famille, ils se trouvent sous forme de coumarines simples, de di- et trimères de coumarines avec liaison C-C ou éther ou à structure dibenzofurannique, ou de coumarinolignanes (**Ferrari, 2002**). L'étude de *Thymelaea hirsuta* Endl., par **Rizk et al. (1975)** a permis de mettre en évidence des coumarines très répandues chez les végétaux supérieurs : l'esculétine, la scopolétine et l'ombelliférone (**Tab. 12**).

Leur présence dans la famille des Thymelaeaceae en a fait donc un marqueur chimiotaxonomique de valeur (**Ferrari, 2002**). **Tandon et Rastogi (1977)** ont été les premiers à isoler une tricoumarine chez les Thymelaeaceae, la wikstrosine tirée de *Wikstroemia viridiflora* Meissn., dont la structure n'a jamais été entièrement élucidée. Tandis que **Rizk et al., (1984)** signalent la présence de deux dérivés aromatiques isolés à partir des feuilles et des brindilles de *Thymelaea hirsuta* (**Tableau 12**).

La caractéristique frappante des Thymelaeaceae réside dans la diversité de leur métabolisme flavonoïdique, produit naturel antioxydant et anti-tumoraux (**Trigui et al., 2013 ; Akrouf et al., 2011**), ceci peut expliquer le fait qu'elle possède différentes propriétés pharmacologiques, surtout pour leurs parties aériennes (**Dohou et al., 2003**).

Les stérols sont courants chez les Thymelaeaceae, principalement représentés par le β sitostérol, qui est ubiquitaire dans le règne végétal (**Borris et al., 1988**).

Levin (1976) a observé la présence des alcaloïdes chez 36% des espèces de thymelaeacées, alors que **Touati (1985)** a signalé que *Thymelaea hirsuta* n'en contient pas. Quant aux tannins, ils semblent être peu courants dans la famille des thymelaeaceae. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (**Hegnauer, 1973**). Alors que les feuilles de *Thymelaea hirsuta* contiennent des tannins de type gallique (**El Beiheiry, 2000**). **Ferrari (2002)** affirme que les thymelaeaceae ne sont pas une famille à saponines.

Tableau 12 : Composition chimique de *Thymelaea hirsuta*.

Organes étudiés	Molécules extradites	Références
Feuilles	Thyméol ((C ₃ H ₂ O) _n) Stigmastérol, β-sitosterol, Alcool aliphatique C ₁₂ H ₂₂ O, Lactone C ₁₉ H ₁₈ O ₆ Daphnortine, β-sitosterol- β-D-Glucoside Alcanes en C27 à 31, alcanols à C22, 24, 26 et 28, Sitosterol et campe stérol Daphnorine, Daphnorétine, Daphnine, Daphnétine, Daphnétine-glucoside, ombelliférone, scopolétine et Esculétine (coumarines) 2- vicénine (C-flavone) Tiliroside (3-ρ-Coumarolyglucosylkaempférol)(flavanol) tanins Lupéol, β-sitosterol, phytol, β- Amyrine, bétuline, erythrodiol, Cholestérol et lanostérol	Saleh et al. , 1965 Gharbo et al. , 1970 Rizk et Rimpler, 1972 Rizk et al, 1974 Rizk et al, 1975 Nawwar et al. , 1977 Ismail, 1978 El-Beheiry, 2000 Garcia-Granados et Saenz De Buruaga, 1980a
Feuilles Brindilles	Lupéol, β-sitosterol, phytol, β- Amyrine, bétuline, erythrodiol, Cholestérol et lanostérol Et 5, 12- dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol protéine et gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12-O heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9, 13, 14 orthobenzoete (diterpènes daphnane)	Rizk et al, 1984 Brooks et al. , 1990
Racines	Daphnorétine (éther de Dicoumaryl)	Abou-Karam et al. , 1998

3.2.6. Activités Antioxydante

De plus, des études antérieures ont démontré que la partie aérienne de *T. hirsuta* présentait une ressource antioxydante potentielle, principalement en raison de leur énorme teneur en composés phénoliques et flavonoïdes (métabolites secondaires) qui sont considérés comme les composés phytochimiques les plus importants (Akrouf et al., 2011 ; Trigui et al., 2013 ; Amari, 2014). Ces composés bioactifs naturels jouent un rôle bénéfique dans la prévention des dommages cellulaires dus au stress oxydatif causé par les radicaux libres. Il est largement connu que les radicaux libres sont les agents causals de plusieurs maladies (Rahman et al., 2012 ; Carcho et al., 2013).

3.2.7. Propriétés et usages thérapeutiques

La plante *Thymelaea hirsuta* a été utilisée contre certaines infections microbiennes. D'autres espèces appartiennent à cette famille sont largement employées pour leurs propriétés diurétiques, hypotensives et anti- inflammatoires. (Djeridane et al., 2006).

Thymelaea hirsuta est utilisé comme purgatif pour les maladies de la peau ; une pate est faite à partir des cendres mélangées avec l'eau et appliquées localement aux secteurs affectés du derme. (Said et al., 2002). En plus de la peau, l'espèce est utilisée dans le traitement de la toux et des problèmes respiratoires (Azaizeh et al., 2006).

Des études scientifiques au Maroc ont montrées que *T. hirsuta* à une double activité : hypoglycémique et antidiabétique. Ces résultats ont été obtenues à partir de multiples administrations de l'extrait de la plante chez des sujets normoglycémique et des souris STZ diabétique (El Amrani et al., 2009).

3.2.8. Toxicité de la plante

La plante contient des diterpènes très toxiques. Un simple contact avec la peau ou les muqueuses peut provoquer une réaction inflammatoire intense (Brooks et Evans, 1990). Ce sont de plus des agents potentiellement carcinogènes. Berkiks et al (2014) montrent que l'extrait éthylique de *Thymelaea lythroides* possède une faible toxicité et des propriétés sédatives. Elle peut entraîner une diminution de l'activité exploratoire et de la locomotion. De tels effets sont généralement médiés par une activité dans le système nerveux.



Partie Pratique



Materiel et methode

1. Objectif :

L'étude expérimentale a été effectuée au niveau de Laboratoire de Biotoxicologie, pharmacognosie et la valorisation biologique des plantes, Département de biologie, Faculté des Sciences, Université Moulay-Tahar, Saïda, Algérie.

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet préventif des extraits de quelques plantes endémiques *Thymélaea hirsuta* et de *Haloxylon articulatum* Boiss chez les rats intoxiqués au Nickel selon plusieurs approches : neurocomportemental, biochimique et histologique.

2. Matériel végétale :

2.1. Source et conservation

Le choix des plantes comme sujet du présent travail a été guidé par les nombreuses utilisations traditionnelles, mais aussi par le fait qu'ils s'agissent de deux familles relativement un peu méconnues.

Les plantes ont été récoltées de deux différentes régions de l'Algérie. *Haloxylon articulatum* Boiss (رمث) (Figure 20 A) de la wilaya de Bechar et *Thymeleae hirsuta* (متنان) (Figure 20 B) de la wilaya d'Elbayadh. Les deux plantes ont été recueillies en moi de Septembre 2018.

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée par les botanistes Pr. Hasnaoui Okacha de notre laboratoire de Biotoxicologie, pharmacognosie et valorisation biologique des plantes de l'université de Saida – Algérie. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire.

Le matériel végétal est séché à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante. Le séchage est de 15 jours en moyenne pour les deux plantes, puis conservées dans des sacs en papier jusqu'à leur utilisation à des fins pratiques.

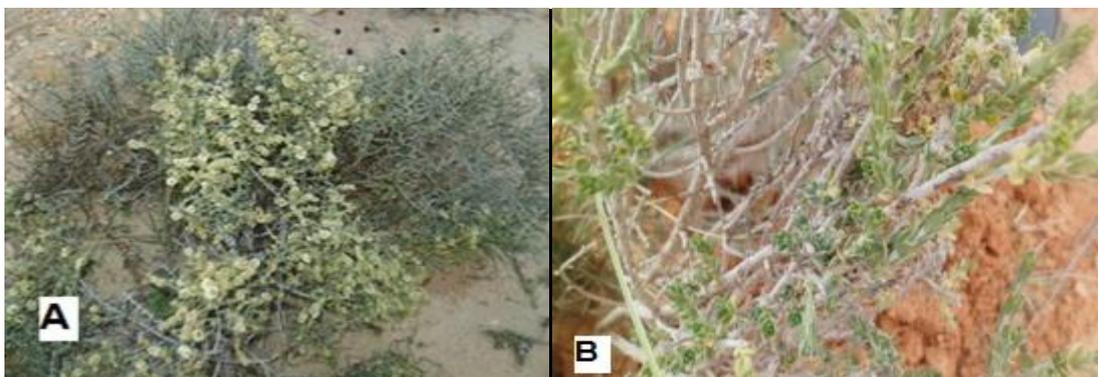


Figure20: A-*Haloxylon articulatum* Boiss (Remt) et B-*Thymeleae hirsuta* (Metnane)

Après séchage, les feuilles et les fleurs de ces deux plantes ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un mortier en porcelaine. Ce broyage a permis de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer en même temps les organites et les molécules contenues dans la cellule (**Lafont et Duval, 2001**).

Pour son utilisation ultérieure et afin d'empêcher sa photo-oxydation, la drogue a été conservée à l'obscurité dans des bocaux hermétiquement fermés. Les précautions prises visent à réduire les divers mécanismes de dégradation relatifs aux caractères organiques de ses matières premières (**Ferrari, 2002**), à savoir la dénaturation des métabolites secondaires tels que les huiles éthérées (évaporation au-delà de 40° C)..... (**Kümkele et Lobmeyer, 2007**).

2.2. Préparation des extraits :

2.2.1. Préparation de l'extrait aqueux (EA)

Les parties aériennes de ces deux plantes ont été préparées selon la méthode traditionnelle utilisée au Maroc (décoction) : 50 g de la plante entière en poudre mélangés à 500 ml d'eau distillée ont été bouillis pendant 15 min puis refroidis pendant 15 min. Ensuite, l'extrait aqueux a été filtré et concentré dans un évaporateur rotatif sous vide à une température inférieure à 40°C. Le matériau extrait séché a été stocké à -20°C jusqu'à utilisation. Pour l'administration orale (gavages), l'extrait séché a été dissous dans de l'eau distillée le jour des études expérimentales et administré par gavages à 500 mg/kg de poids corporel (**Azza et al. 2012**).

2.2.2. Préparation de l'extrait eau-méthanol (EM) :

10 g de la plante en poudre ont été introduits dans un mélange eau-méthanol (20-80 ; V/V). L'ensemble a été laissé macérer toute la nuit à la température ambiante, après filtration, le filtrat a été évaporé dans un rotavapor à 40°C, pour donner un extrait eau-méthanol (EM) (**Zerriouh, 2015**).

2.2.3. Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation :

La méthode d'hydrodistillation sera le même protocole pour chaque plante : *Haloxylon articulatum* Boiss et *Thymeleae hirsuta* .

Le protocole d'hydrodistillation consiste à Peser dans une capsule 30 g de broyat. Les placer dans le ballon de 1000 mL, à l'aide de l'entonnoir ajouter 700 mL d'eau distillée et 2 grains de pierre ponce puis positionner le ballon sur le montage d'hydrodistillation (**Figure 21**). Alimenter le

réfrigérant en eau et faire chauffer à ébullition douce pendant 04 heures. La vapeur émise sera condensée grâce à un système de refroidissement à eau, puis elle sera collectée dans un flacon opaque. A la fin de l'expérimentation le liquide collecté est mis dans une ampoule à décanté (**Figure 22**) à fin de séparé les deux phases (aqueuse et organique) pour obtenir l'huile essentielle (**Boubric et Boussad, 2007**).



Figure 21: Montage d'un hydrodistillateur (Photo Originale).



Figure 22: Ampoule à décanté (Photo Originale).

-A. Conservation de l'huile essentielle obtenue :

L'huile essentielle (HE) extraite est conservée à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre fermé et bien enveloppé par un papier aluminium pour la préserver de l'air et de la lumière (Nelly Grosjean, 2007).

-B. Calcul du rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé (Bssaibis et al., 2009).

$$R (\%) = M \times 100 / M_0$$

- **R (%)** : Rendement en h
- **M** : Quantité d'huile récupérée exprimée en g.
- **M₀** : Quantité de la matière sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

2.2.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par CPG/SM

L'analyse qualitative et quantitative de l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse type VARIAN CHROMPACK - CP 3900 par injection de 1 µl d'extrait. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium (He) d'un débit de 1,3 ml/min. La colonne utilisée est une colonne capillaire de type HP-1, de 60 m de longueur et de 0,32 mm de diamètre intérieur. L'épaisseur de la phase stationnaire est de 0,50 µm; la programmation de la température de la colonne initiale d'injection est de 60°C pendant 2 min, puis s'élève par palier de 15°C/min à 245°C pendant 20 min ; le détecteur utilisé pour cette analyse est de type spectrométrie de masse (Saturne 20200) avec une température de 250°C. L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés.

2.2.5. Etude phytochimique (Analyse qualitative):

Dans le cadre de la recherche des molécules ou d'activités biologiques d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les différents organes des plantes.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

A. Les tannins :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de Fe Cl₃ diluée (1%). L'apparition d'une coloration bleue-noire caractérise la présence des tannins galliques verte, ou bleueverte celle des tannins cathéchiques (**Aiyegoro et Okoh, 2010**).

B. Les flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence, si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Jaffer et al., 1983**).

C. Les anthocyanes :

Un volume de 2 ml d'infusé est additionné à 2 ml de HCl₂N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debray et al., 1971**).

D. Les coumarines :

Une masse de 1 g de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence des coumarines après examen sous ultra-violet (**Rizk, 1982**).

E. Les alcaloïdes :

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2 g de poudre végétale mélangés à 50 ml de H₂SO₄ dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50 ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1 ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n°1 cinq gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n°2 cinq gouttes de réactif de Wagner. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (**Aiyegoro et Okoh, 2010**).

F. Stéroïdes et triterpènes :

Deux essais ont été effectués :

- **Essai 1 :** Test pour les stéroïdes et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (**Aiyegoro et Okoh, 2010**).

➤ **Essai 2** : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydre acétique/chloroforme (5/5 : v/v) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Libermann-Burchardt). Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (**Aiyegoro et Okoh, 2010**).

G. Les saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul d'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 g de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes.

Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10^{ème} tube, alors l'indice de masse est calculé par la formule suivante : La présence de saponines dans la plante est confirmé avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans le 10^{ème} tube} \times 5 / 0,0X$$

Avec : X : Volume contenu dans le 10^{ème} tube

H. Les composés réducteurs :

Leur détection consiste à mettre 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis le chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

2.2.6. Evaluation de l'activité antioxydant

2.2.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical **2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH)**. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (**Figure 23**). L'effet de chaque extrait sur le **DPPH** est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al (1998)**.

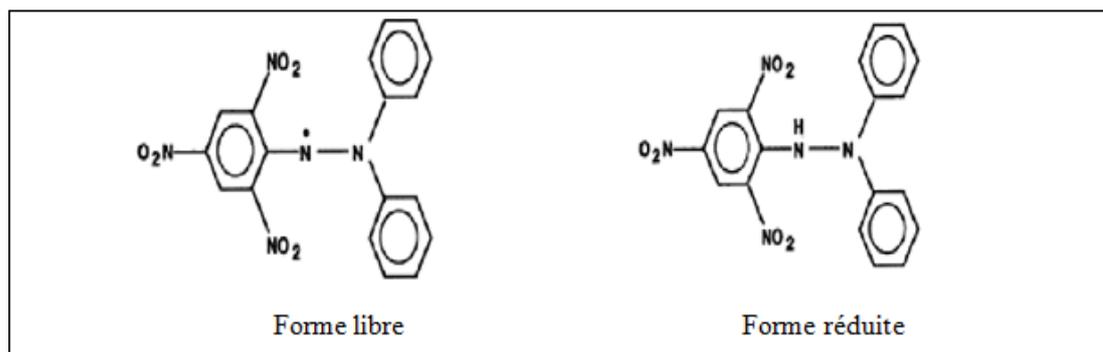


Figure 23:Forme libre et réduite du DPPH (MOHAMMEDI, 2006)

Un volume de **50 µl** de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en **g/l** est ajouté à **1,950 ml** de la solution méthanolique du **DPPH (0.025 g/l)** fraîchement préparée. les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de **1,950 ml** de la solution méthanolique au DPPH et de **50 µl** de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard l'acide ascorbique.

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stoechiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (**MARKOWICZ BASTOS et al., 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ AAR} = [1 - (\text{Abs Echantillon} / \text{Abs Control négatif})] \times 100$$

Où

%AAR : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

2.2.7. Préparation de solution injectable :

L'huile essentielle des deux plantes *Thymélaea hirsuta* (HeTh) et *Haloxylon articulatum* (HeHa) est diluée dans de l'eau bi distillée et quelques gouttes de Tween 80 pour la préparation d'une solution de dose 0.1 ml/kg de chaque plantes durant une période de 21 jours, (Halder et al., 2011).

3. Matériels chimiques :

Le produit chimique utilisé dans cette étude est « le Nickel » qui a été réalisé pour déterminer l'effet protecteur de l'huile essentielle de *Thymélaea hirsuta* (HeTh) et *Haloxylon articulatum* (HeHa) à raison de 0,2 % dans l'eau distillée par voie orale chez les rats Wistar (Kahloula et al., 2014).

4. Matériel biologique (Animaux d'expérimentation) :

4.1. Origine des animaux et conditions d'hébergement :

Les expériences sont réalisées sur des rats albinos de souche Wistar, provenant de l'animalerie locale de l'université, Dr. MOULAY TAHAR, Saïda, département de Biologie. Les animaux sont hébergés à l'animalerie, dans des cages professionnelles en plastique (43 x 28 x 15cm). La salle qu'ils occupent est maintenue à une température de (22 à 23 C°) et est soumise à un cycle de lumière constant (alternance de 12 heures d'obscurité et 12 heures d'éclairement). Les animaux ont accès Ad libitum aux biberons à eau et aux mangeoires.

4.2. Répartition des groupes :

Les expériences sont réalisées sur des rats Wistar, pesant de 200 à 400 g. Les rats sont groupés dans des cages à raison de 2 femelles et un male. Ils sont disposés dans une animalerie ventilée, à une température de 21 °C ± 1 °C avec un éclairage artificiel qui établit un cycle jour/nuit (jour entre 7 et 19 h). Les lots sont divisés en six (figure 24) :

- Lot T : constitué par les animaux qui reçoivent de l'eau distillée par voie orale (n = 7 rats).
- Lot Ni : constitué par les animaux qui reçoivent le sulfate de nickel à raison de 2g/l dans l'eau distillée par voie orale (n = 7 rats mâles) (Kahloula et al., 2014) ;
- Lot Ni- HETH : 24 heures après le sevrage les animaux sont traités par l'huile essentielle de la plante *Thymélaea hirsuta* HeTh (0,1 ml/kg) (Ni : n= 7) à raison d'une injection intra-péritonéale

par jour pendant 21 jours (**Adli et al., 2017**) et reçoivent le sulfate de nickel préparé à raison de 2g/l par voie orale.

-**Lot HETH**: les animaux sevrés reçoivent de l'eau distillée par voie orale et une injection intrapéritonéale (IP) d' **HETH** (0,1 ml/kg) par jour pendant 21 jours.

- **Lot Ni- HEHa** : 24 heures après le sevrage les animaux sont traités par par l'huile essentielle de la plante *Haloxylon articulatum* **HEHa** (0,1 ml/kg) (Ni : n= 7) à raison d'une injection intrapéritonéale par jour pendant 21 jours (**Adli et al., 2017**) et reçoivent le sulfate de nickel préparé à raison de 2g/l par voie orale.

-**Lot HEHa**: les animaux sevrés reçoivent de l'eau distillée par voie orale et une injection intrapéritonéale (IP) d' **HEHa** (0,1 ml/kg) par jour pendant 21 jours.

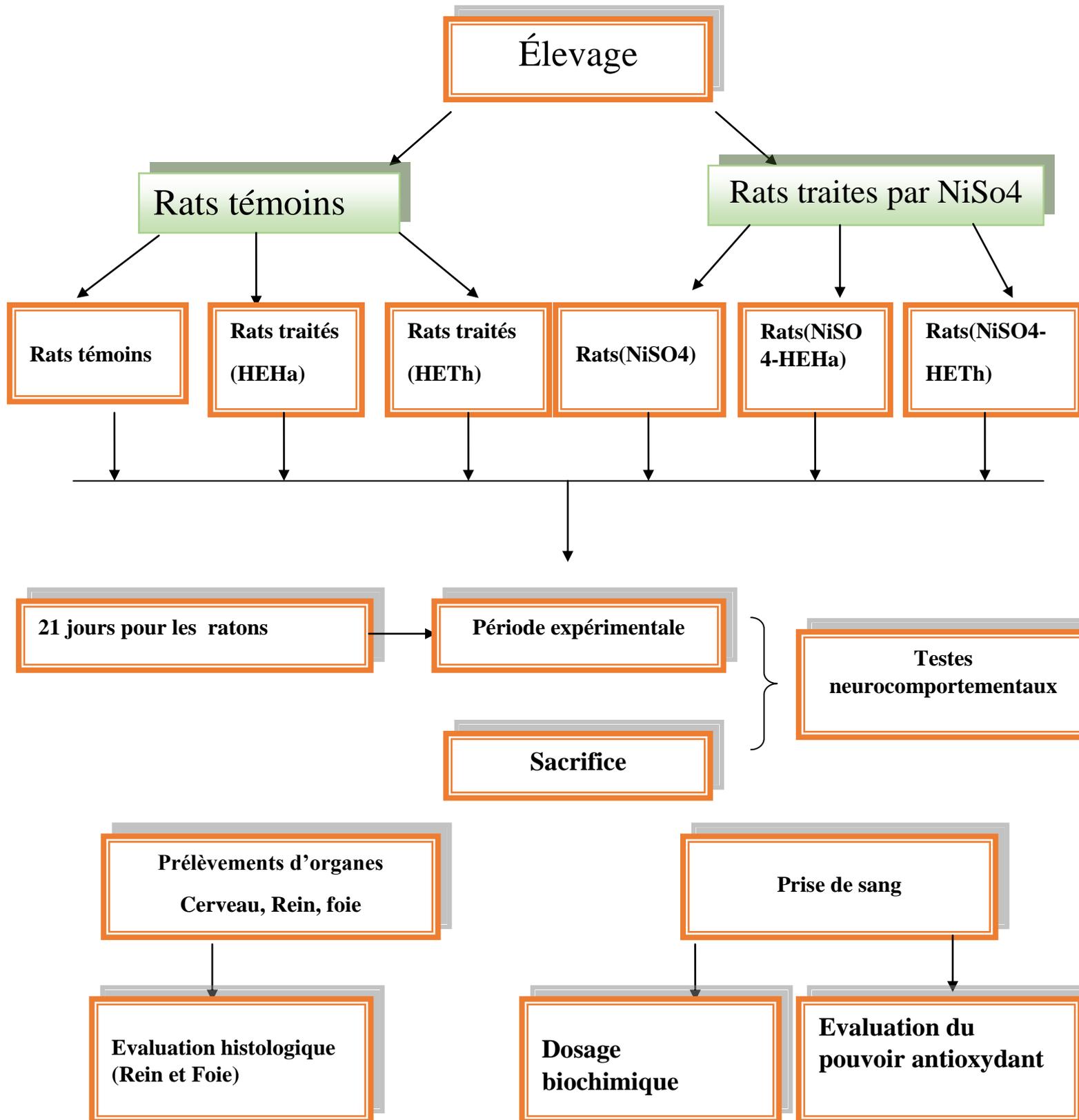


Figure 24 : Schéma représentant le protocole d'expérimentation.

4.3. Evaluation du poids corporel :

Le suivi des jeunes rats a nécessité une pesée quotidienne du poids corporel durant toute la période d'expérimentation depuis leurs sevrages jusqu'à la fin de l'expérimentation (21 jours) (n=07).

4.4. Évaluation comportementale :

Le jour du test comportemental, la cage d'hébergement des rats est placée dans la pièce d'expérimentation une heure avant le test, afin que les rats s'habituent à ce nouvel environnement. Les différents groupes effectuent les tests comportementaux suivants : La nage forcée, Open Field, la piscine de Morris, sombre/ clair.

4.4.1. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test) :

Le test de la nage forcée (**forced swim test = FST**) est aussi appelé test de **Porsolt**, du nom du scientifique qui l'a découvert, ce test est utilisé pour évaluer l'état dépressif des rats. Le principe de ce test réside dans sa relation supposée avec un comportement de résignation. C'est un test comportemental surtout utilisé pour prédire l'efficacité d'un traitement antidépresseur (**Porsolt et al, 1978**). Il consiste de déposer délicatement le rat dans un cylindre de 20.7 cm de diamètre et 39 cm de hauteur contenant 15 cm d'eau à 22°C et à les y laisser durant 6 minutes (**Fig. 25**). Au bout de quelques minutes, la proportion de temps passé à nager diminue au profit du comportement d'immobilité, c'est-à-dire que l'animal flotte passivement en n'effectuant que les mouvements nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité est un indicateur de l'état pseudo-dépressif. Après chaque session de nage, l'animal est séché rapidement avec une serviette, puis replacé dans sa cage d'hébergement. L'eau du cylindre est changée entre chaque animal (**Benabid et al, 2008**)



Figure 25: Epreuve de test de la nage forcée (FST).

4.4.2. Test de l'*open field*

Ce test est réalisé afin d'évaluer l'activité locomotrice ainsi que le comportement anxieux des rats. L'arène utilisée est une boîte carrée ouverte (70 cm × 70 cm × 34 cm) (**Figure 26**), à fond noir et des lignes blanches au sol délimitaient des carreaux (10×10 cm). Chaque rat est initialement placé dans un des quatre coins de l'*open field*, la tête orientée vers un coin. Son comportement est observé pendant 6 minutes, entre chaque essai on nettoie la cage avec l'éthanol 70%. Six paramètres sont mesurés par l'expérimentateur : le temps de latence (exprimé en secondes), le nombre total de carreaux traversés, le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre, le nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi), le nombre total de toilettages et le nombre total de défécations. Ce test analyse le comportement exploratoire du rat dans un espace clos. On l'utilise avant tout pour mesurer ses fonctions motrices, mais aussi, pour évaluer son degré d'anxiété. Un animal anxieux évite le centre du terrain qui est ouvert, et reste au périphérique (**Kahloula, 2014**).



Figure 26 : L'épreuve d'Open Field.

4.4.3. La Piscine de Morris

La piscine de Morris a été créée par Richard Morris neuroscientifique en 1981. Le but de ce test est l'évaluation des capacités des rats à mémoriser et à gérer l'information spatiale pour échapper à une situation aversive (l'eau d'un bassin) en atteignant un refuge le plus rapidement possible (**Morris, 1984**). Le dispositif expérimental est constitué d'un bassin circulaire en métal blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur (**Figure 27**), rempli d'eau à une hauteur de 30 cm. Ce bassin est rempli d'eau que l'on rend opaque par addition un colorant blanc non toxique à une température de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ confère à ce test un caractère aversif pour l'animal Le bassin est virtuellement divisé en quatre quadrants par quatre points cardinaux arbitraires (Nord, Sud, Est, Ouest). Une plate-forme (15 cm de diamètre) est disposée à l'intérieur de l'enceinte dans le quadrant Nord-Ouest., située en relief (1cm) de la surface de l'eau, recouverte d'une grille afin de faciliter l'agrippement des animaux elle est visible pour l'animal le premier jour du test. Dans la pièce, sont disposés plusieurs indices distaux susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'espace. Dans cette tâche, l'animal cherche à trouver refuge sur la plate-forme le plus rapidement possible.

- La phase d'acquisition dure 4 jours. Le protocole consiste à localiser la plate-forme

immergée rendue invisible dont la position reste inchangée au cours des 4 jours consécutifs. Chaque rat subit une séance quotidienne de 4 essais séparés par un délai de 15 min. A chaque essai, l'animal est déposé dans l'eau face à la paroi depuis un point de départ déterminé qui varie d'essai en essai. L'essai se termine lorsque le rat a atteint la plateforme, ou après l'écoulement de 60 secondes, le rat qui ne trouve pas la plate-forme est guidé vers cette dernière et y reste 20 secondes pour mémorisation.

- **5ème jour (Le probe test) :** le rat placé au Sud et subit un test de rétention dans le bassin de 60s, le protocole consiste à retirer la plate-forme du bassin et mesurer principalement le temps passé dans le quadrant qui contenait la plate-forme au cours des essais précédents (Nord-Ouest).
- **La phase de la plateforme visible :** Après 2 heures du probe test, la plateforme est placée au milieu du quadrant NO et rendue visible en plaçant un drapeau coloré.

Quatre essais de 60 secondes pour chacun sont réalisés dans les 4 points cardinaux. Le temps mis pour atteindre la plateforme est mesuré.

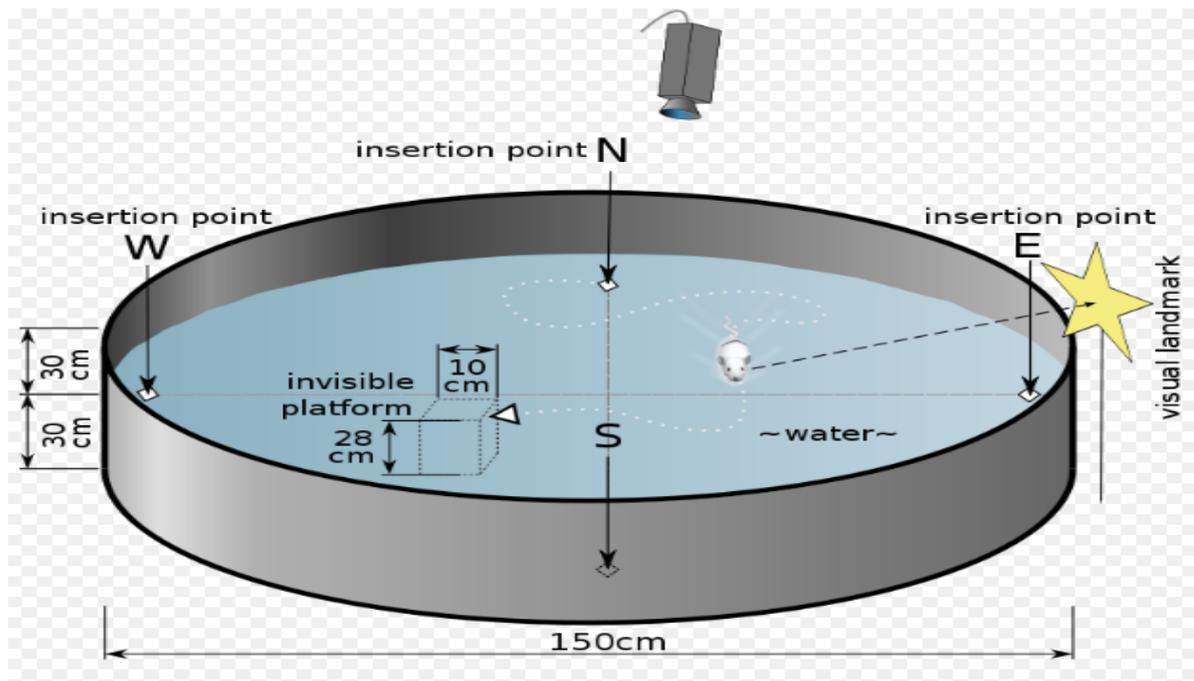


Figure 27: Dispositif de la piscine de Morris

4.4.4. Le test du compartiment sombre/ clair :

Le test de boîte en noir et blanc (ou boîte de lumière-obscureté) (**Figure 28**) est une procédure expérimentale qui a été développée pour tester l'anxiété chez les rongeurs de laboratoire, décrite à

l'origine par **Crawley (1980)**. De nombreux modèles ont été utilisés par les auteurs avec plusieurs modifications structurelles (**Bourin et Hascoët, 2003**).

Dans cette épreuve du double compartiment noir/blanc, le degré d'anxiété d'un animal est déterminé à partir de son aversion pour la lumière. Le dispositif est constituée d'une boîte en bois (L = 44 cm ; l = 16 cm ; H = 23 cm), cloisonnée en deux compartiments égaux (L = 22 cm ; l = 16 cm ; H = 23 cm) qui communiquent par un orifice de 6 cm de haut et de 5 cm de large situe a la base et au milieu de la cloison centrale. L'un des compartiments est noir, fermé par un couvercle n'empêchant pas la perception de l'animal par l'analyseur d'image et l'autre est blanc, fortement éclairée (100 lux). L'animal est place dans le compartiment noir dans le coin de la paroi opposée à la porte. Le paramètre mesuré est le temps de séjour dans chaque compartiment après 3 minutes d'exploration du milieu par le rat. L'expérimentation dure environ 5 minutes. La durée passée dans le compartiment blanc pendant les 5 minutes de l'expérience est comptabilisée (**Kahloula et al., 2017**).

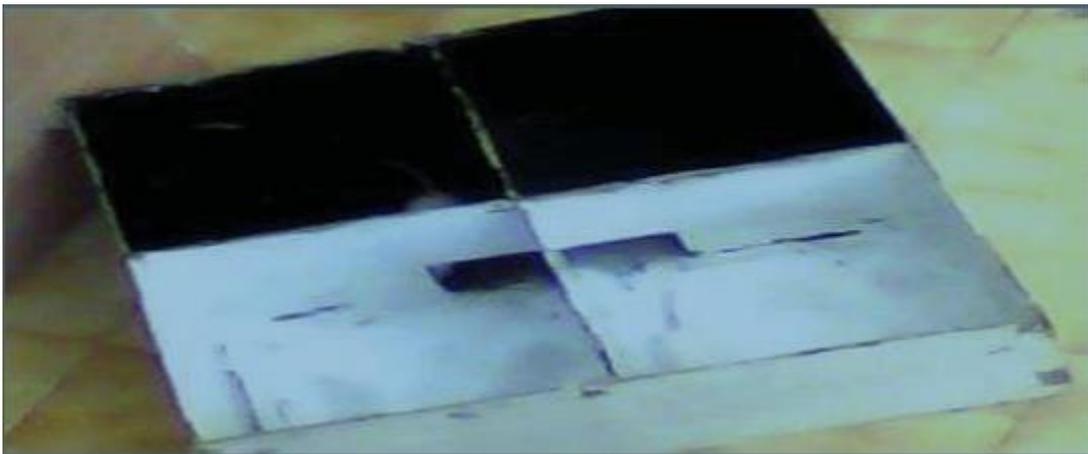


Figure 28 : Dispositif du double compartiment sombre/clair

4.5. Sacrifice des rats et préparation des échantillons sanguins et tissulaires :

Les animaux sont sacrifiés le matin après un jeûne de 12 heures par décapitation et cela après une injection intra péritonéale d'une solution chloral ($C_2H_3Cl_3O_2$), à 10% (4mg/Kg de poids corporel). Le sang récupéré dans des tubes EDTA pour les analyse hématologique et héparines pour les analyses biochimiques. Le sang centrifugé à 3000 tours/10min. Le plasma est stocké à 4°C, il servira pour les dosages biochimiques (**Ait hamadouche, 2009**). Les organes (cerveau, foie, et reins) ont été soigneusement prélevés, rincés et séchés puis pesés. Ces organes sonpar la suite conservés totalement dans une solution préparée de Formol (10%) pour une étude histologique.

4.6. Préparation des érythrocytes:

Suite à la récupération des échantillons du sang, une prise aliquote a été prélevée pour le dosage de l'hémoglobine. Ensuite, le reste des échantillons ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min. Le sérum a été soigneusement prélevé et le culot restant contenant les érythrocytes a été lavé trois fois par une solution saline à 0.9 g/l, puis une lyse des cellules a été effectuée par addition de l'eau distillée glacée et incubée pendant 15min dans la glace. Le lysat est récupéré ensuite pour le dosage des enzymes antioxydants érythrocytaires marqueurs du statut oxydant après centrifugation à 5000tr/min pendant 5min (Hocine, 2011).

4.6.1. Description des méthodes utilisées pour la mesure des marqueurs du stress oxydant:

4.6.1.1. Le superoxyde dismutase SOD :

Le Superoxyde dismutase (SOD) au niveau des érythrocytes, au niveau tissulaire a été déterminé par la méthode décrite par Winterbourn et al, (1975). Le mélange réactionnel contient essentiellement 0.2 ml Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) à 0.1 M, 0.1 ml Nitroblue tetrazolium (NBT) 0 1.5 Mm, 1.2 ml de Tampon Potassium phosphate à 0.067 M, 0.5 de l'extrait enzymatique. Le mélange à été incubé 5-8 minutes. La lecture a été faite ensuite à 560 nm.

4.6.1.2. Catalase (CAT) :

CAT a été analyse par méthode de Sinha (1972). Le mélange de la réaction (1.5 ml, vol.) contenant 1.0 ml de tampon phosphate à 0.01 M pH 7.0, 0.1 ml de l'échantillon et 0.4 ml d' H_2O_2 à 2 M. La réaction a été arrêtée par l'addition de 2.0 ml d'acide dichromate acétique (5% de dichromate de potassium et l'acide acétique glacial ont été mélangés avec un rapport de 1:3 (V/V)) ; l'absorbance est déterminé à 620nm.

4.6.1.3. Glutathion peroxydase (GSH-Px) :

L'activité de GSH-Px a été mesurée par la méthode décrite par Rotruck et al., (1973). Brièvement, le mélange de la réaction contient 0.2 ml de tampon tris-HCl à 0.4 M, à pH 7.0, 0.1 ml d'azide de sodium à 10 mM, 0.2 ml de tissu (homogénèse dans du tampon Tris-HCl, pH 7.0), 0.2 ml de glutathion, et 0.1 ml de peroxyde d'hydrogène à 0.2 mM. Le tout est incubé à 37°C durant 10 min. la réaction est arête par addition de 0.4 ml de TCA à 10%, et centrifugé. Le surnageant est utilise pour déterminer le taux de glutathion par le réactif d'Ellman (19.8 mg d'acide 5, 5'-dithiobisnitro benzoïque (DTNB) dans 100 ml de solution de nitrate de sodium à 0.1%).

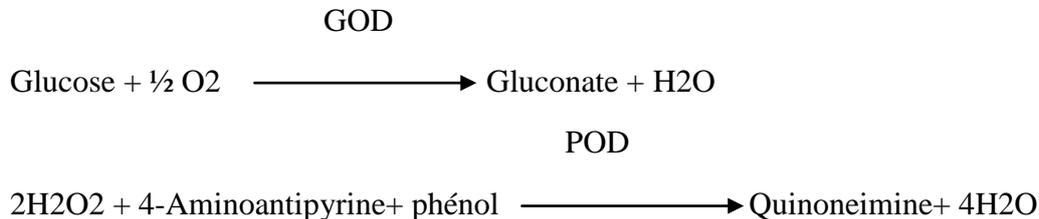
4.7. Dosages biochimiques :

4.7.1. Détermination de taux sanguin de nickel :

Le dosage de Ni dans le sang été réalisé au sein du laboratoire de contrôle de qualité et analyse(QAC).

4.7.2. Dosage du glucose :

Le dosage du glucose est effectué sur le sérum après séparation du sang. Le glucose sanguin est estimé en utilisant le kit Bio Systems selon les réactions couplées suivantes :



Un complexe coloré est estimé par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 500$.

4.7.3. Evaluation des marqueurs du fonctionnement rénal :**4.7.3.1. Dosage de l'urée :**

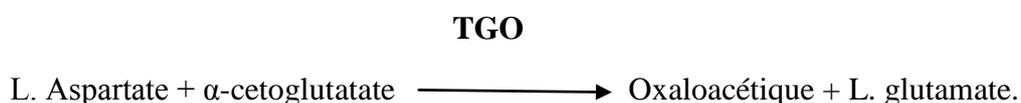
L'urée dans le sérum a été déterminée en utilisant le diacétylmonoxime ; l'urée est catabolisée par l'uréase en libérant de 2NH_3 , le glutamate déshydrogène catalyse l'animation réductrice de l' α -cétoglutarate en présence de NH_3 et de NADH , H^+ , pour former le glutamate et le NAD^+ ; la diminution de la concentration de NADH , H^+ , directement proportionnelle à la concentration d'ammoniaque, est évaluée à 340 nm (Kits Biomatériels).

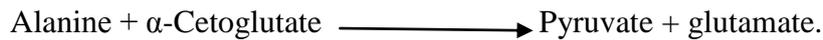
4.7.3.2. Dosage de créatinine :

La créatinine a été déterminée dans le sérum par la réaction de Jaffé, selon la description de **Cook (1975)**. La méthode utilisée pour le dosage de la créatinine est une méthode colorimétrique. Créatinine + acide picrique (pH alcalin) \rightarrow complexe jaune orange La réaction s'effectue dans un milieu alcalin, et la créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate formant ainsi un complexe créatinine picrate. Le taux d'augmentation de l'absorbance à 500 nm dû à la concentration de la créatinine dans l'échantillon.

4.7.4. Evaluation des marqueurs du fonctionnement hépatique :**4.7.4.1. Dosage des transaminases (TGO-TGP) :**

L'aspartate aminotransférase ASAT (TGP) et l'alanine aminotransférase ALAT (TGO), font partie d'un groupe d'enzymes, les aminotransférases ou transaminases, qui catalysent la transformation réversible des acides α -cétoniques en acides aminés par transfert de groupes amines.



TGP

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de ces enzymes dans le sang, calculée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505nm à l'aide d'un Kit Chronolab.

4.7.4.2. Dosage de la bilirubine :

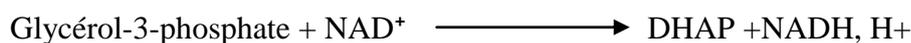
Dans le dosage de la bilirubine totale, bilirubine est couplée avec l'acide sulfanilique diazoté en présence de caféine pour donner un colorant azoïque. L'intensité de la coloration est mesurée à 578 nm, elle est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon (**Kit Chronolab**).

4.7.5. Evaluation des paramètres lipidiques:**4.7.5.1. Dosage des triglycérides:**

Nous avons utilisé la méthode **Fossati (1974)** pour le dosage des triglycérides dans le sérum respectivement. Elles reposent sur le dosage enzymatique du glycérol libéré après hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines par la lipase.



Gk



Elle est effectuée à pH = 9,4 en présence de magnésium et d'hydrazine. On lit l'absorbance à 340nm.

4.7.5.2. Dosage de Cholestérol:

Nous avons utilisé la méthode de Thomas (1992) : Une première réaction fait en sorte que les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre par une cholestérol estérase. Le cholestérol qui est entièrement libre réagit avec l'oxygène en présence de cholestérol oxydase pour donner de la cholestenone (l'hydroxyle en position, devient cétone) et du H₂O₂. Le peroxyde formé est réduit en H₂O par un indicateur en présence de peroxydase (on mesure la quinone-imine produite à 500 nm).



Peroxydase:

$2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Chromogène Incolore} \rightarrow 4 \text{H}_2\text{O} + \text{Chromogène coloré}$.

4.8. Etude histologique des organes

4.8.1. Prélèvement

Le prélèvement doit se faire délicatement que possible afin de ne pas dégrader l'organisation tissulaire. Une fois obtenu, les tissus à savoir les reins, le foie et le cerveau doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.

4.8.2. Fixation

La fixation a pour but la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotique et enzymatique. Ainsi que le durcissement de la pièce anatomique. Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange d'eau 5%, acide acétique 10%, formol 25% et d'acide picrique 75%). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements (SHE, 2020).

4.8.3. Prélèvements des sections tissulaires

C'est une étape fondamentale dans l'analyse histologique, puisque la lecture et l'interprétation microscopique des préparations en dépendent. Après la fixation, le pathologiste effectue des prélèvements repérés et orientés par la macroscopie. Ces données sont consignées sur une fiche de macroscopie et chaque prélèvement est de ce fait individualisé. Les fragments sélectionnés doivent être placés dans les cassettes identifiées. L'ensemble des cassettes est regroupé dans le fixateur en attendant l'étape suivant (SHE, 2020).

4.8.4. Déshydratation

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale) Ceci par passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool à dilué 50° jusqu'à l'alcool absolu à 100°). Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe.

4.8.5. Imprégnation :

Par le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire afin d'en éliminer les traces d'alcool absolu (Figure 29). On utilise dans cette étape d'imprégnation le xylène ou le toluène, solvant

intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre l'alcool↔toluène d'une part et toluène↔paraffine d'autre part.

4.8.6. Inclusion :

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 μm) et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque). Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C pendant 4h dans une étuve) et qui infiltre alors toutes les cellules.

Remarque : L'inclusion peut être réalisée au niveau d'un automate de paraffine fondue d'usage dans les laboratoires de routine



Figure 29 : Déshydratation, éclaircissement et l'imprégnation en paraffine (SHE, 2020).

4.8.7. Mise en bloc :

Après 4 heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal « Barres de Leuckart ». Après refroidissement (dans un congélateur pendant toute une nuit), on se trouve alors en présence d'un bloc de paraffine dur (**Figure 30**), à l'intérieur duquel la pièce prélevée est rigide en présence de paraffine solide dans l'espace intracellulaire de chaque cellule composant le tissu.



Figure 30 : un bloc de paraffine

4.8.8. Confection des coupes histologiques :

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome (**Figure 31**) permet de réaliser des sections de 2 à 5 μm disposées en séries régulières sous forme d'un ruban



Figure 31 : Microtome à paraffine (SHE, 2020).

La confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

- L'étalement : de segments de ruban de paraffine sur une lame de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'eau albumineuse.
- Le collage : les lames de verre sont placées sur une plaque chauffante, réglée à une température de 40°C, pendant 15 min.
- Le séchage de la préparation : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard absorbant.

4.8.9. Déparaffinage :

Le déparaffinage consiste, comme son nom l'indique, à éliminer la paraffine, c'est-à-dire le milieu d'inclusion. Les lames sont placées sur une plaque chauffante (de 45 à 60°C) pendant 15 min. afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine périphérique.

4.8.10. Réhydratation :

La réhydratation permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°), puis dans de l'eau distillée.

4.8.11. La coloration :

La coloration standard a été appliquée pour nos lames à savoir l'hématoxyline-Eosine, qu'elle permet de colorer le noyau en bleu et le cytoplasme en rose, selon les étapes suivantes (**tableau 13**)

Tableau 13 : Batterie de coloration Hématoxyline-éosine (SHE, 2020).

Coloration	Hématoxyline Harris	2 min
	Alcool acide	2 min
	Bicarbonate de lithium	2 min
	Alcool 95%	2 min
	Eosine alcoolique	20 seconds
	Eau robinet	quelque second

4.8.12. Montage et observation microscopique :

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique ‘Baume de Canada’ dont l’indice de réfraction est proche de celui du verre. On obtient, ainsi, une préparation histologique (ou par abus de langage : une lame histologique) prête à être observée au microscope optique.

5. Expression et analyse statistique des résultats

Les résultats ont été exprimés par la moyenne (M) des valeurs individuelles, affectées de l’erreur standard à la moyenne (S.E.M). La comparaison de plusieurs moyennes a été effectuée par une analyse de variance (ANOVA) avec le facteur intoxication (Ni, T) et/ou le facteur traitement (HEHa, HETH, Ni) suivie éventuellement du test Post-Hoc Student-Newman-Keuls : Une probabilité * $p \leq 0.05$ indique une différence significative ** $p < 0.01$; indique une différence très significative; *** $p < 0.001$ indique une différence hautement significative comparés aux témoins. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Résultats et interprétation

1. Détermination du rendement et composition chimique

1.1. En extrait aqueux et eau-méthanol

La comparaison entre les extraits aqueux (EA) et l'extrait eau-méthanol (EM) de deux plantes étudiées illustrée dans le **tableau 14** montre bien le rôle de l'eau et de la chaleur dans l'augmentation du rendement de l'extraction. L'EA des deux plantes *Haloxylon articulatum* Boiss et *Thymélaea hirsuta* préparées à ébullition montre un rendement de 27.9 % et 14.34% respectivement, presque deux fois plus important que celui de l'EM de Ha et Th de rendement de 20.4% et 9,82% respectivement qui sont préparés à la température ambiante.

Tableau 14: Résultat de l'extrait aqueux (EA) et l'extrait eau-méthanol (EM).

Plantes étudiées		Extraits	
		Aqueux (EA)	Eau-méthanol (EM)
<i>Haloxylon articulatum</i> Boiss	Rendement (%)	27,9	20,4
	Aspect physique	Pate marron visqueuse	Pate doré visqueuse
<i>Thymélaea hirsuta</i>	Rendement (%)	14,34	9,82
	Aspect physique	Pate marron foncée	Pate marron foncée

1.2. Le rendement en l'huile essentielle

L'huile essentielle HE de chacun de deux plantes a été extraite par hydrodistillation (**Tableau 15**) à partir de la matière sèche broyée. Le rendement obtenu est de l'ordre de 0,11% pour *Haloxylon articulatum* Boiss et 0,31% pour *Thymélaea hirsuta*.

Tableau 15 : Résultats d'extraction de l'huile essentielle de Ha et Th.

L'huile essentielle	Rendement	La couleur	L'aspect	Odeur
<i>Haloxylon articulatum</i> <i>Boiss</i>	0,11%	Marron 	Liquide	Aromatique
<i>Thymélaea hirsuta</i>	0,31%	Verdâtre 	Liquide	Aromatique

1.3. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (*Haloxylon articulatum*) par CPG/SM

L'analyse de l'extrait de la plante par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 69 composés majeurs cités dans le **Tableau 16** par ordre d'éluion. Soixante neuf composants représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés (82,20%). Les composants majeurs de cette l'huile essentielle sont : Thymol (14,19%), Alphaterpinène (11,02), β -E-Ocimène (9,64), 1,8-Cineole (8,69), Oleuropine (5,17%), Linalol (5,12%), Delta -3- Carène (4,12) (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Concentration en % et temps de rétion des différents composés obtenus par analyse CPG-SM de l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum*.

N°	Compounds	Tr (min)	Concentration (%)
1	Tricyclène	10,051	
2	α - Thujène	10,310	0,625
3	α - pinene	10,901	0,438
4	Hexanoic acid ^{e.f}	11,211	0,300
5	Camphène	11,894	0,082
6	Verbnène	12,049	0,045
7	β -pinène	12,152	0,243
8	Sabinène	12,225	0,621
9	Octen-3-oL	12,333	0,560
10	Octanone - 3	12,907	0,133
11	Myrcène	12,978	0,142
12	Octanol	13,278	0,175

13	α -2- Carène	13,587	0,050
14	α -Phellandrène	13,705	0,066
15	Delta -3- Carène	13,755	4,102
16	p-Cymene	13,985	0,320
17	Alphaterpinène	14,675	11,023
18	Para-cymène	15,110	1,325
19	Limonène	15,458	0,544
20	1,8-Cineole	15,728	8,690
21	β -Z-Ocimène	16,080	0,153
22	β -E-Ocimène	18,316	9,640
23	Camphenilone	18,427	0,110
24	Gamma Terpinène	18,564	0,085
25	cis hydrate de sabinène	18,776	0,145
26	Metacimenène	19,032	0,062
27	Hotrienol	19,099	0,070
28	FeneHole	19,121	0,060
29	Linalol	19,939	5,012
30	Camphénol	20,595	1,324
31	α - Camphénol	21,802	0,021
32	Trans-pinoarvéol	21,872	0,041
33	Camphre	21,953	0,387
34	p-Methylacetyophenone ^{e.f}	22,352	0,293
35	ISO Bornèol	23,964	0,128
36	Bornèol	24,183	1,330
37	Terpin-4-oL	25,108	0,468
38	α Terminèol	25,348	0,130
39	Paracymène-8-oL	25,541	0,081
40	VerbénoL	25,994	0,760
41	Thymol-methyl ether	26,442	1,497
42	Perillaldehyde ^{e . f}	26,278	0,280
43	α - Terpène -7- AL	26,614	0,099
44	Thymol	26,873	14,195
45	Carvacrol	27,008	1,319
46	Alpha Copaène	27,215	0,128
47	Beta Bourbonnène	27,371	0,067
48	Beta Cubebène	27,475	0,099
49	Z- Caryophylène	27,562	1,154
50	E- Caryophylène	27,973	0,053
51	AL l o medandrène	28,237	0,036
52	Germacrène	29,025	0,317
53	β -Selinèn	29,764	0,120
54	lidene ^f	29,834	0,360
55	Valencène	30,643	0,145
56	β -Bisabolène	31,007	0,484
57	g- Cadinène	31,312	0,370
58	Δ -Cadinène	33,261	0,117
59	Calamenène cis	33,568	0,451
60	E-a Bisabolène	33,864	0,112

61	Thymohydroquinone	34,031	0,008
62	Cadalène	34,318	0,038
63	Isoeugénol	34,534	0,015
64	Oleuropine	34,578	5,170
65	Verbacoside	34,708	0,980
66	Luteoline 7 - glucoside	34,754	0,087
67	β pegenine- glucoside	34,973	0,189
68	Rutine	35,105	0,091
69	Olerpeoside	35,269	0,408
Total Identifiés :		82,20 %	

1.4. Etude phytochimique (Analyse qualitative)

Les essais phytochimiques effectués sur les extraits reconstitués de chaque échantillon végétal, consistent à détecter les différentes familles de composés existants. Ces réactions qualitatives de caractérisation sont basées sur les phénomènes de précipitation ou de coloration via des réactifs chimiques spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats de ce criblage phytochimique sont résumés dans le **Tableau 17**. Ils révèlent la présence de neuf groupes de composés bioactifs : Tannins, Flavonoïdes, les anthocyanes, les coumarines, les alcaloïdes, stérols et triterpènes, les saponosides, les composés réducteurs, l'amidon.

Tableau 17 : Résultats du test phytochimique de *Haloxylon articulatum* Boiss et *Thymélaea hirsuta*.

Extraits Métabolites	<i>Haloxylon articulatum</i> Boiss	<i>Thymélaea hirsuta</i>
Tannins	+	Trace
Flavonoïdes	Trace	++
Les anthocyanes	+	+
Les coumarines	++	+
Les alcaloïdes	++	++
Stérols et triterpènes	+	+
Les saponosides	++	Trace
Les composés réducteurs	+	+

(+) : Présence, (++) : Forte Présence

1.5. Evaluation de l'activité antioxydant

1.5.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

Ce test est déterminé par la diminution de l'absorbance de la solution alcoolique du DPPH à 517nm, réduit par les extraits de plantes à différentes concentration ainsi que l'antioxydant de référence (l'acide ascorbique). Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC₅₀ de chacun des deux extraits et de l'antioxydant de référence ont été déterminées et représentés dans **la figure 32**.

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Une faible valeur d'IC₅₀ signifie une forte activité antioxydante. La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés. D'après les résultats obtenus, on constate que l'acide ascorbique possède une activité antioxydant différente et élevée par rapport à celle des deux extraits testés de l'ordre de (2.60±0.78) µg/ml.

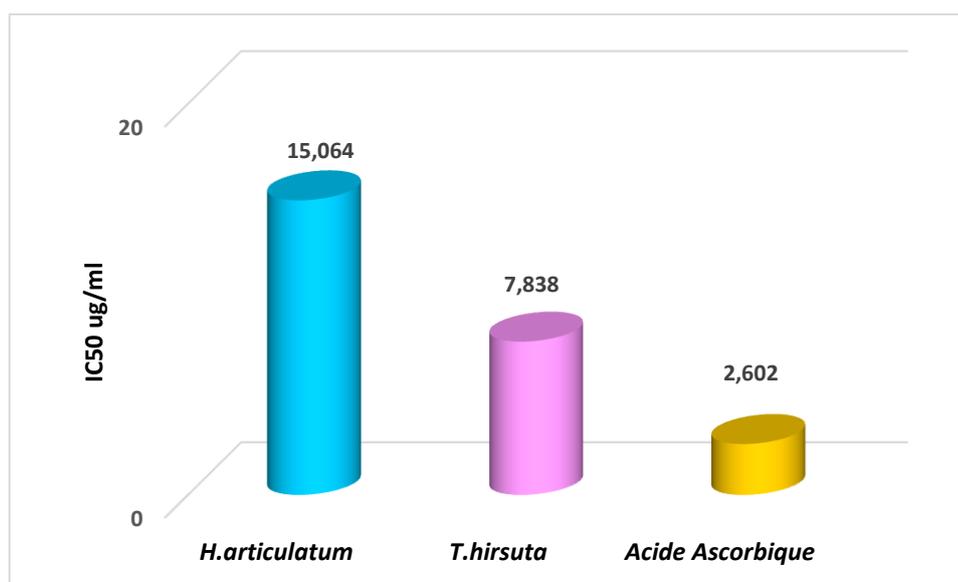


Figure 32 : valeurs des IC₅₀ exprimées en µg/ml des extraits des plantes testées et de l'acide ascorbique (contrôle positif).

2. Effet du Nickel sur le poids corporel et le poids des organes

Les résultats du poids pondéral montrent que les animaux exposés à NiSO₄ présentent une diminution significative (p<0,05) du poids pondéral et le poids du rein, foie, cerveau) à celle des animaux témoins durant la période d'expérimentation. Les animaux qui sont exposés à NiSO₄ et traités par HEHa; et traités par HE Th présentent une augmentation significative (p<0,05) du

poids pondéral et le poids des organes testés par rapport aux rats intoxiqués non traités (**Tableau 18, Tableau 19**).

Tableau 18 : Evaluation des paramètres pondéraux des rats témoins, NiSO₄ et traité par HEHa.

Poids	Ni	HEHa	Ni- HEHa	T
Poids corporel (g)	61,22±3,92*	108,23±0,51	96,07±0,33*	113,6±0,24
Reins (g)	0,54±0,05*	0,84±0,01	0,67±0,02***	0,86±0,05
Foie (g)	3,44±0,005*	6,14±0,01	4,87±0,09*	6,47±0,013
Cerveau (g)	1,49±0,05*	1,58±0,07	1,51±0,013*	1,60±0,04

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (*: p<0.05).

Tableau 19: Evaluation des paramètres pondéraux des rats témoins, NiSO₄ et traité par HETH.

Poids	Ni	HETH	Ni- HETH	T
Poids corporel (g)	61,22±3,92*	110,17±0,01	97,12±0,14*	113,6±0,24
Reins (g)	0,54±0,05*	0,83±0,05	0,70±0,13***	0,86±0,05
Foie (g)	3,44±0,005*	6,19±0,03	4,94±0,02*	6,47±0,013
Cerveau (g)	1,49±0,05*	1,59±0,02	1,53±0,03*	1,60±0,04

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (***P < 0.001), (*: p<0.05).

3. Evaluation comportementale

3.1. L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)

Le test a permis de mesurer le temps d'immobilité des rats durant les 6 min du test. Les résultats relatifs à ce test ont montré que les animaux intoxiqués par Ni ont un temps d'immobilité significativement élevé a celui des animaux témoins (p<0,001), ce qui reflète un état de désespoir. Cependant, les rats de deux lots qui ont été exposé au Ni et déjà traités par HEHa et HETH ont un temps d'immobilité significativement inférieur a celui des rats exposés au Ni (p<0,001). Par ailleurs, il existe une différence non significative entre les deux groupes Ni-HEHa , Ni-HETH et les deux groupes T.HEHa, T.HETH (p>0,05) respectivement (**figure 33,34**).

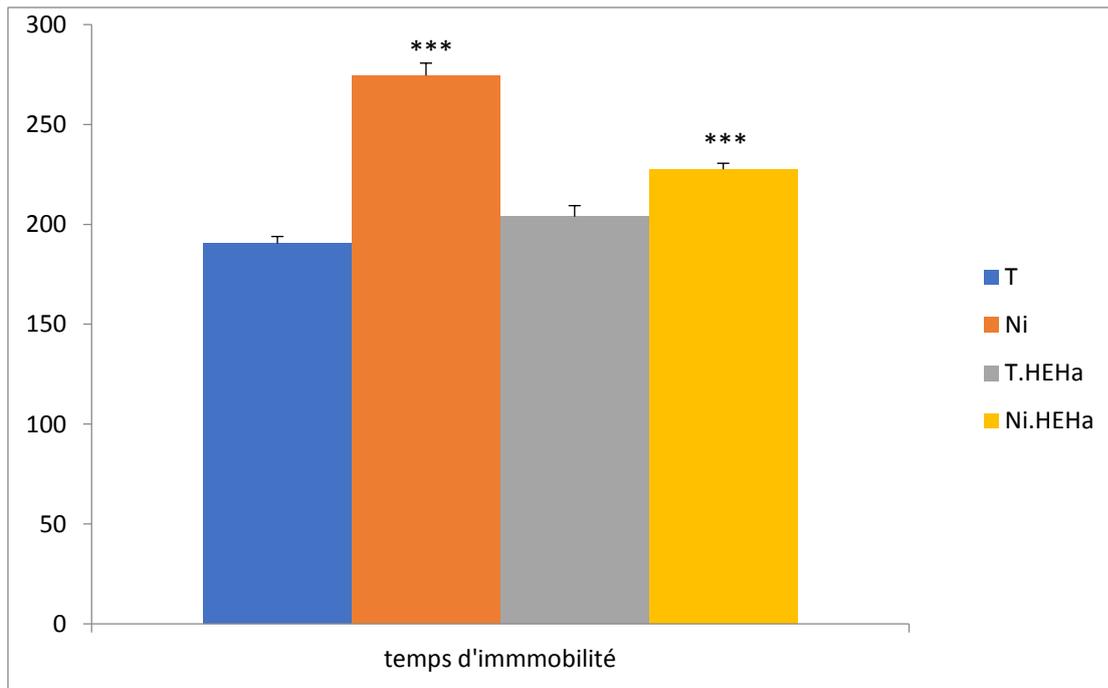


Figure 33: Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HEHa, Ni-HEHa. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : ***P < 0.001(T vs Ni), ***P < 0.001 (Ni vs Ni-HEHa).

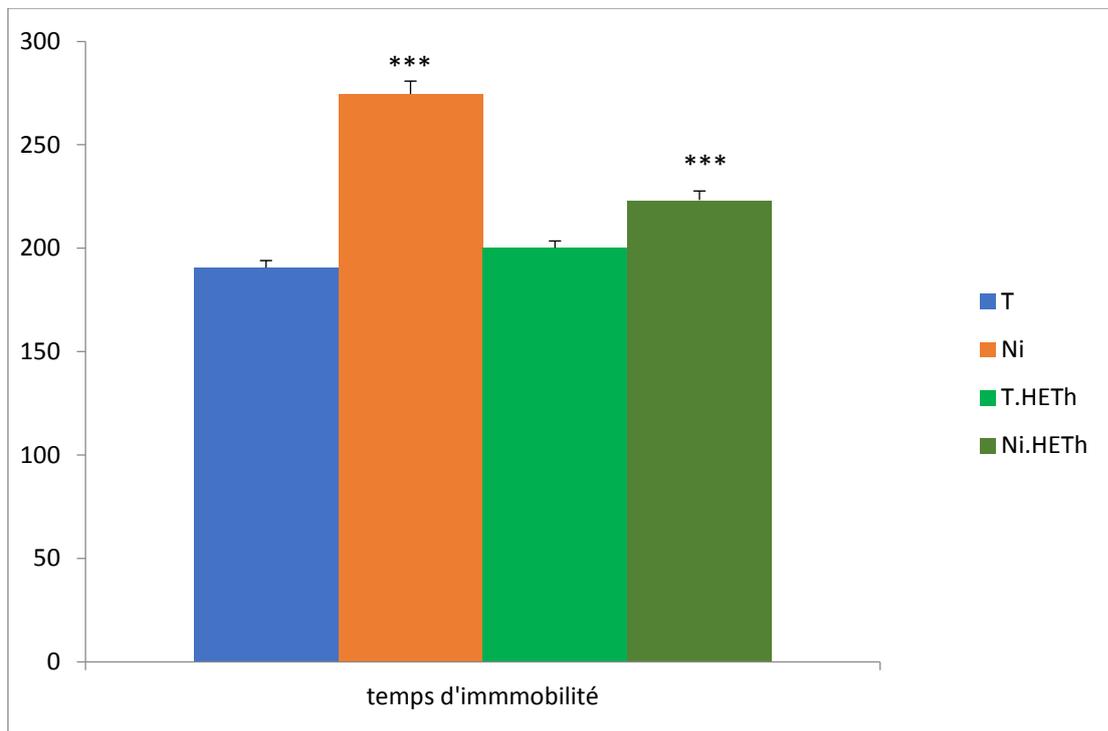


Figure 34: Comparaison du temps d'immobilité durant le test de la nage forcée entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : ***P < 0.001(T vs Ni), ***P < 0.001 (Ni vs Ni-HETH).

3.2. Test de l'open field

Les deux figures (35, 36) illustrent les effets du Ni sur le comportement des rats dans le test de L'Open Field (OFT). En effet, six paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans les figures ci-dessous.

L'analyse statistique montre une diminution significative ($p < 0.05$) du temps de latence chez les rats exposés au Ni comparé aux rats témoins. En revanche, ce temps chez les lots : (Ni-HEHa , T.HEHa) et (Ni-HETH , T.HETH) sont significativement augmentés en comparaison avec le lot intoxiqué respectivement ($p < 0,001$).

L'analyse statistique montre une hyperactivité locomotrice qui est représentée par le nombre de carreaux traversés chez les rats exposés au Ni comparé aux rats témoins. En outre, l'injection de 0.1mg/kg de HEHa et HETH montre une amélioration significative ($p < 0.05$) de l'activité locomotrice chez les rats traités et intoxiqués par rapport aux rats intoxiqués par le Ni. L'analyse statistique montre aussi une augmentation significative de nombre de visites au centre chez les rats intoxiqués par le Ni par rapport aux rats témoins ($p < 0.05$). Tandis que, nous avons remarqué une augmentation non significative de nombre de visites au centre pour les deux lots des rats traités par l'huile essentielle de *H.articulatum* et *T.hirsuta* et intoxiqués par rapport aux rats traités par ces deux huiles essentielles. Concernant le nombre de redressement, on a remarqué une réduction significative de celui-ci chez les rats de deux lots : Ni-HEHa et Ni-HETH à celui des rats intoxiqués au Ni ($p < 0,05$), et une élévation significative de ce nombre chez les intoxiqués par le Ni en comparaison avec témoin ($p < 0,05$).

Parmi toutes les variables mesurées dans ce test, L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative de nombre de toilettages et de défécations entre les 6 groupes des rats.

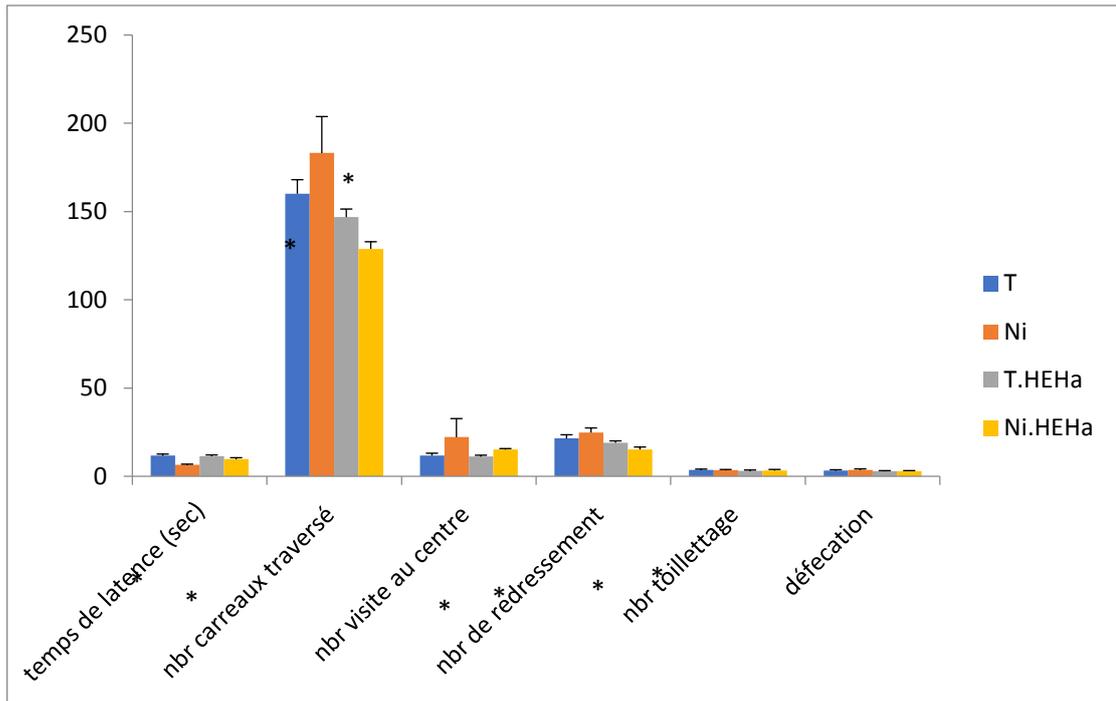


Figure 35 : La comparaison des différents paramétrés du test d’Open-field entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM: * $p < 0.05$ (T vs Ni) ; * $p < 0.05$ (Ni vs T.HEHa).

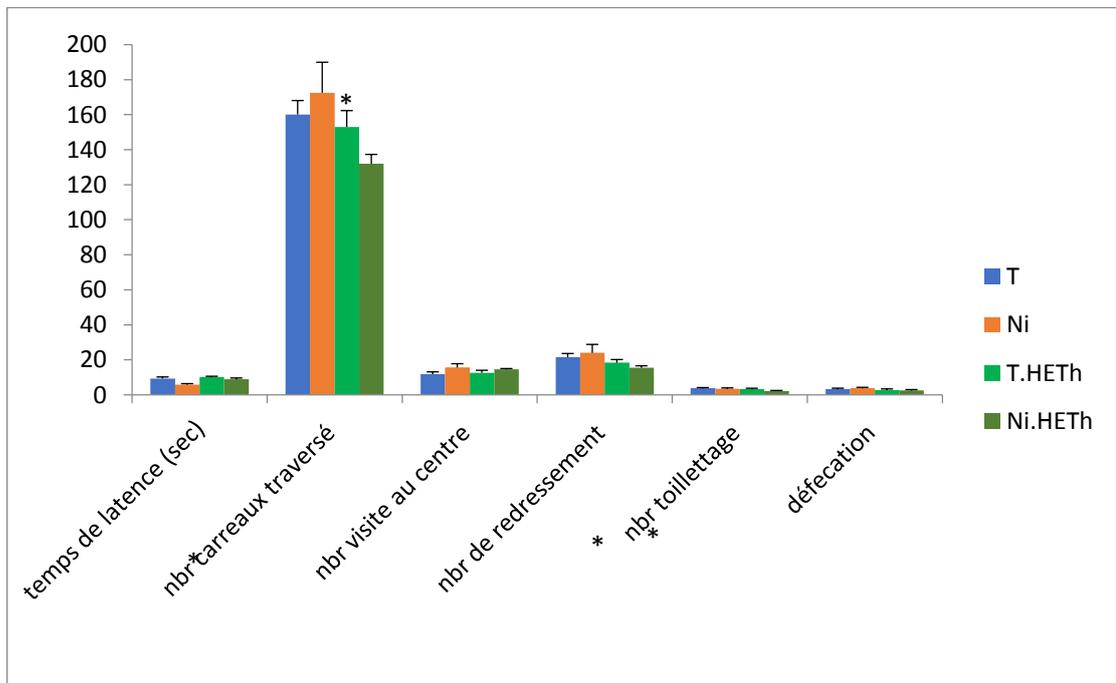


Figure 36 : La comparaison des différents paramétrés du test d’Open-field entre les rats ; témoins(T), intoxiqués(Ni), T-HETH, Ni-HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM: * $p < 0.05$ (Ni vs T.HETH).

3.3. La Piscine de Morris

Le labyrinthe aquatique permet d'évaluer les capacités exploratoires et l'apprentissage spatial chez les rats. Durant le deuxième jour d'apprentissage il existe une élévation significative du temps de latence du lot intoxiqué en comparaison avec le lot témoin ($p < 0,01$) (**figure 37, 38**). Le temps de latence des deux lots qui regroupe des rats l'un traité par l'huile essentielle de *H.articulatum* et l'autre par l'huile essentielle de *T.hirsuta* et intoxiqués par le Ni est inférieur d'une manière significative par rapport à celui des rats intoxiqués ($p < 0,01$). Pendant le troisième et le quatrième jour d'acquisition, on a remarqué que le temps de latence des rats intoxiqués est significativement supérieur à celui des rats témoins ($p < 0,001$). De plus, le temps de latence du lot Ni.HEHa et Ni.HETH est inférieur d'une manière significative à celui du lot intoxiqué ($p < 0,001$).

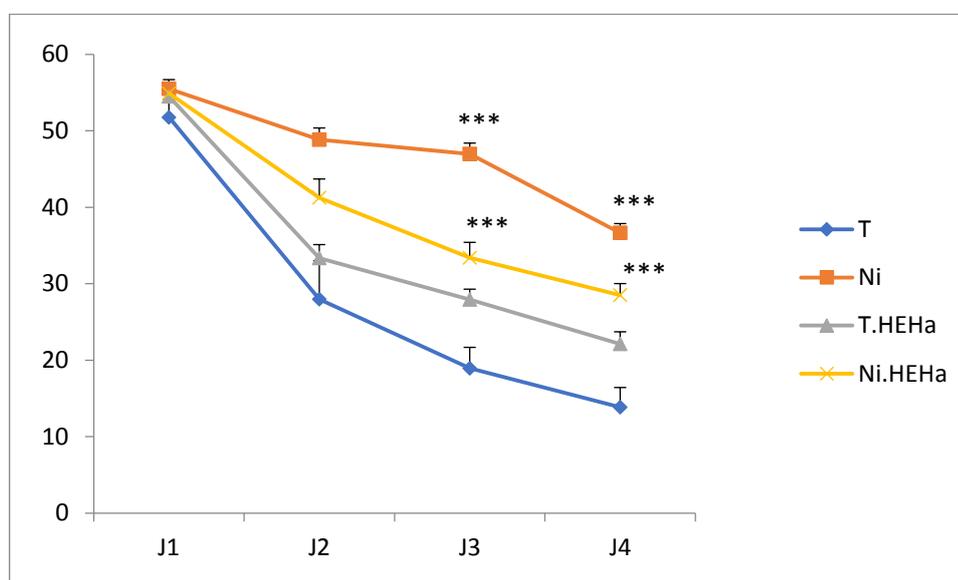


Figure 37 : L'évaluation de l'effet préventif de l'huile essentielle de *H.articulatum* sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : Jr2 : **P < 0.01 (Témoin vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs.Ni.HEHa). Jr3 : ***P < 0.001 (Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HEHa). Jr4 : ***P < 0.001 (Témoin vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HEHa).

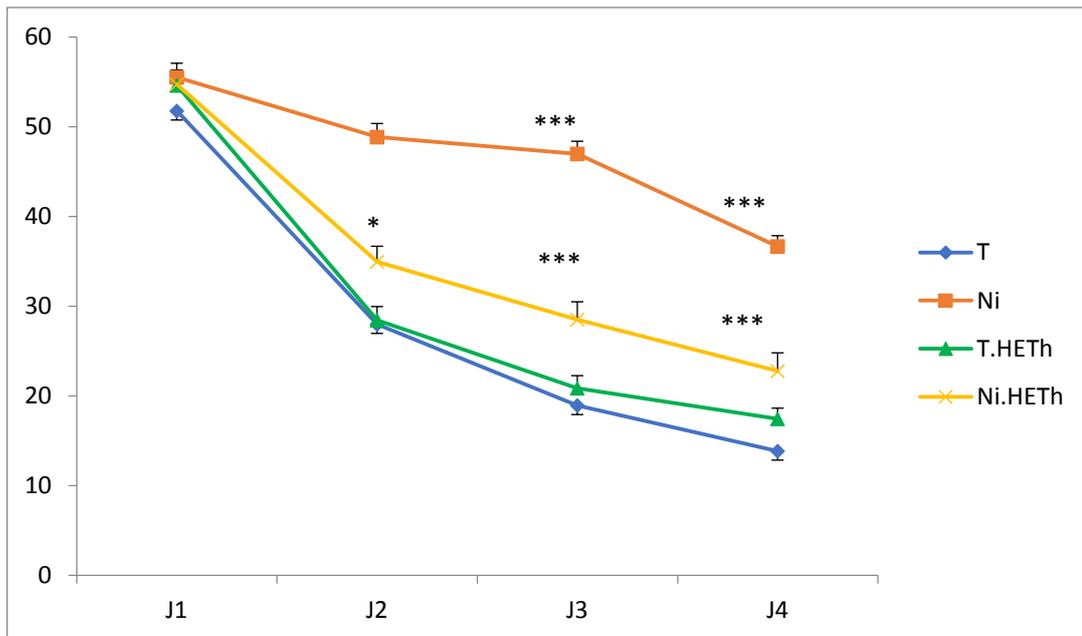


Figure 38: L'évaluation de l'effet préventif de l'huile essentielle de *T.hirsuta* sur l'apprentissage spatial chez des rats intoxiqués par le Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : Jr2 : **P < 0.01 (Témoïn vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs.Ni.HETH). Jr3 : ***P < 0.001 (Témoïn vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HETH). Jr4 : ***P < 0.001(Témoïn vs.Ni) ; ***P < 0.001 (Ni vs. Ni.HETH).

3.3.1. Le probe test

Le probe test a révélé une différence significative de temps de latence dans le quadrant NO (c'est le quadrant cible qui contient la plateforme) entre les rats témoins et les rats Ni (**figure 39, 40**). Ces derniers, ont un temps de latence significativement inférieur par rapport à celui des témoins (P<0,01). De plus, le temps de latence du groupe Ni-HEHa et Ni-HETH est significativement élevé comparé à celui du groupe Ni (p<0,01).

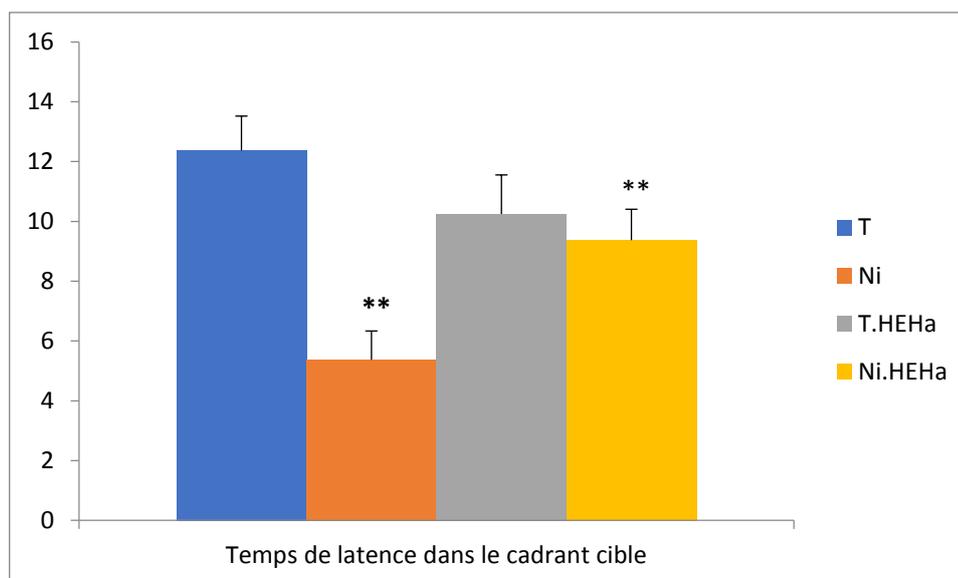


Figure 39: Le temps passé dans le cadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : $**P < 0.01$ (Témoin vs Ni) ; $**P < 0.01$ (Ni vs. Ni-HEHa).

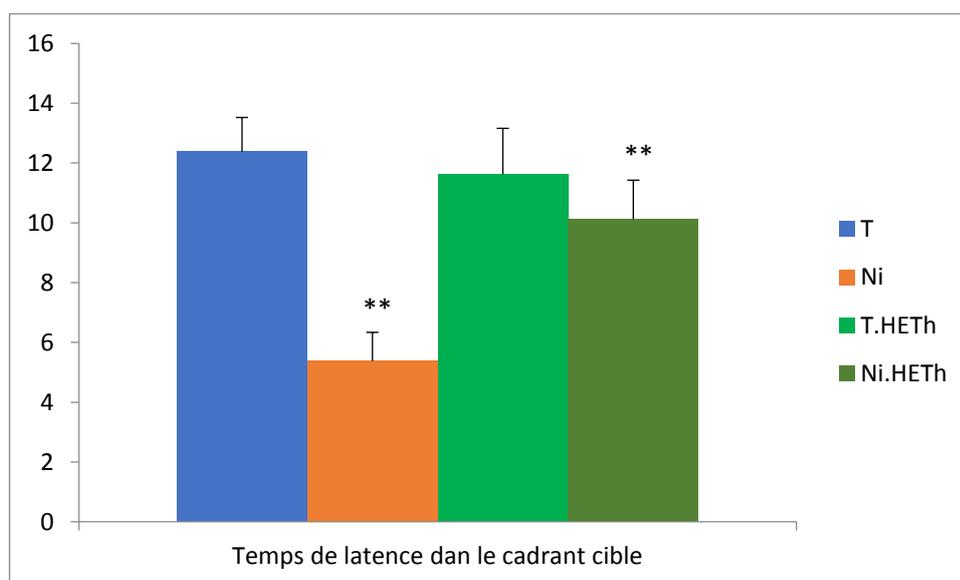


Figure 40: Le temps passé dans le cadrant (NO) durant le probe test par les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : $**P < 0.01$ (Témoin vs Ni) ; $**P < 0.01$ (Ni vs. Ni-HETH).

3.3.2. Test visible :

Durant le test de la plateforme visuelle, les rats exposés au Ni prennent un temps significativement plus élevé (**figure 41, 42**) afin d'arriver à la plateforme en comparaison avec les rats témoins ($p < 0,05$). Cependant, les lots :Ni.HEHa et Ni.HETH, ont mis un temps de latence significativement inférieur pour arriver à la plateforme en comparaison avec les rats intoxiqués ($p < 0,01$).

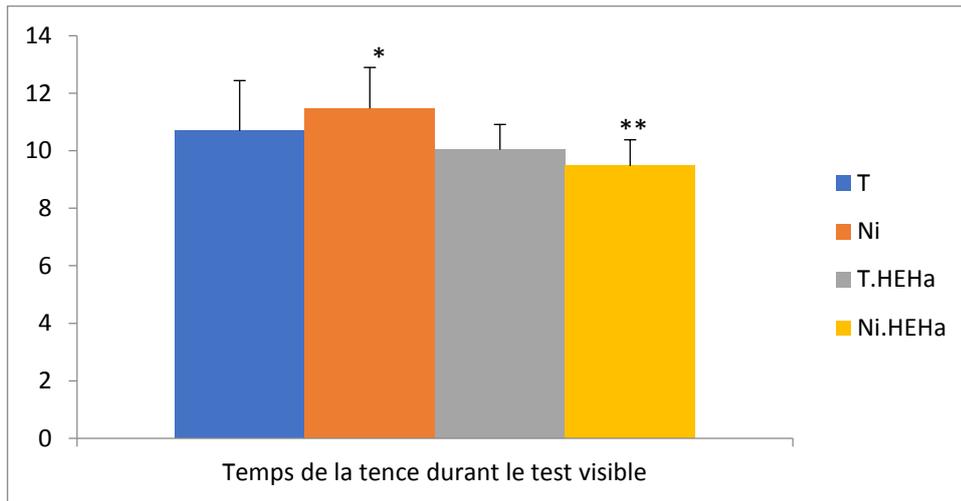


Figure 41 : Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoins vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HEHa).

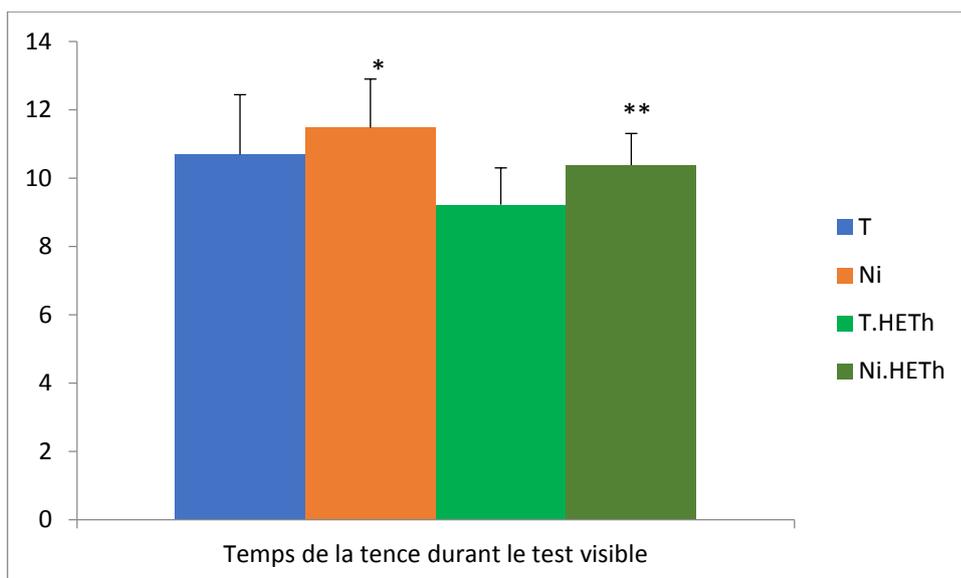


Figure 42: Le temps de latence durant la plateforme visible chez les rats témoins, intoxiqués et intoxiqués traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *P < 0.05 (Témoins vs.Ni) ; **P < 0.01 (Ni vs. Ni-HETH).

3.4. Le test du compartiment sombre/ clair

Le test du double compartiment permet d'évaluer l'état d'anxiété chez les animaux d'expérimentation (figure 43, 44). Les résultats obtenues ont révélé que les rats intoxiqués par le Ni ont passé plus de temps dans le compartiment sombre durant les 5 min du test par rapport au lot témoin ($p < 0,001$), au contraire dans le compartiment claire ce qui reflète un état d'anxiété due a cet élément chimique. De plus, les deux groupes : Ni.HEHa et Ni.HETH passent un temps significativement inférieur à celui du groupe intoxiqué ($p < 0,001$) dans le compartiment sombre. Les lots Ni-HEHa et Ni.HETH ont tendance de passer plus de temps dans le compartiment clair que les lots exposés au Ni ($p < 0,001$).

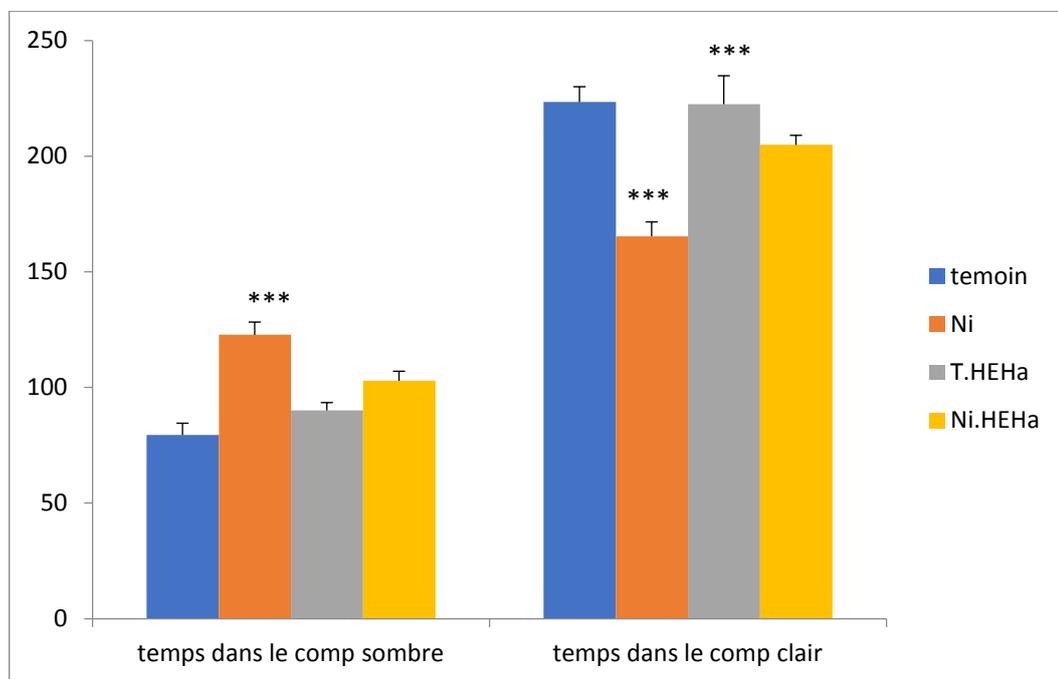


Figure 43: Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : *** $P < 0.001$ (T vs. Ni), *** $P < 0.001$ (Ni vs T.HEHa).

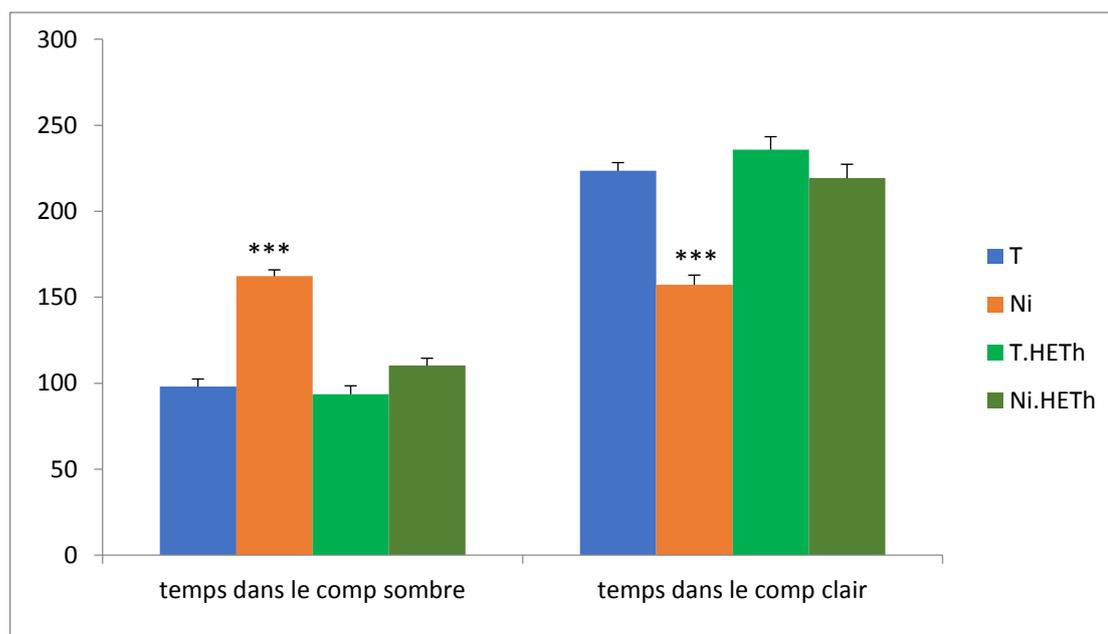


Figure 44: Comparaison de l'effet de l'HE sur l'anxiété chez les rats exposés au Ni. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM : ***P < 0.001(T vs. Ni), ***P < 0.001(Ni vs T.HETH).

4. Evaluation du pouvoir antioxydant de HEHa et HETH in vivo

Afin d'évaluer l'effet antioxydant de l'HE de «*H.articulatum*» et «*T.hirsuta*» suite à un stress oxydant induit chimiquement par le Ni au niveau érythrocytaire, nous avons mesuré l'activité de la CAT, GPx et SOD qui sont des molécules dotées d'un pouvoir antioxydant important.

4.1. L'activité de la SOD

Les superoxydes dismutases (SOD) sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Les résultats associés (**Figure 45, 46**) montrent une surexpression significative ($p < 0.05$) de la SOD chez les rats exposés au Ni par rapport aux rats témoins. Tandis qu'une réduction significative est observée ($p < 0.05$) sous l'action de (HEHa, HETH) chez le lot traité suite à une intoxication. Cependant, une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de cette enzyme est remarquée chez les animaux témoins traités aux (HEHa, HETH).

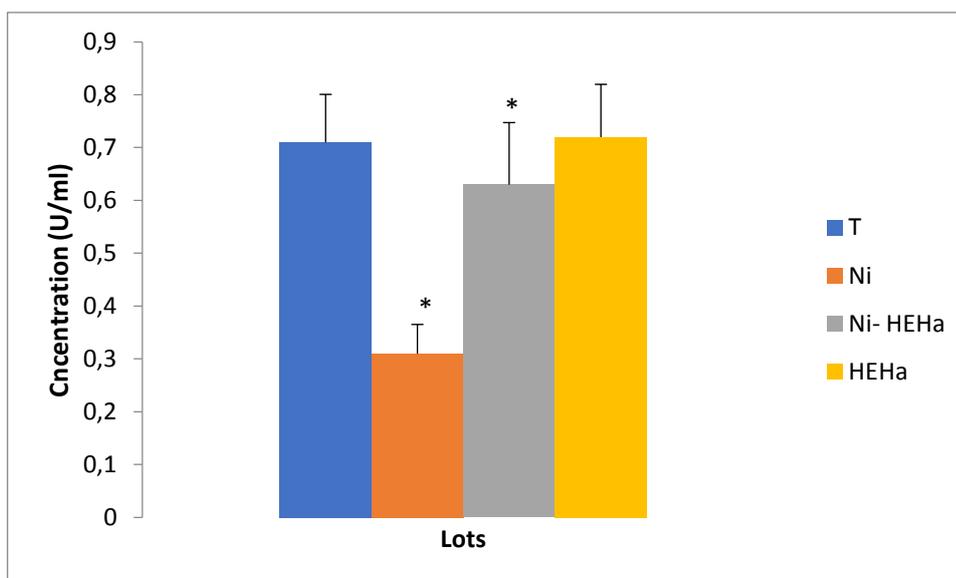


Figure 45: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*:p<0.01).

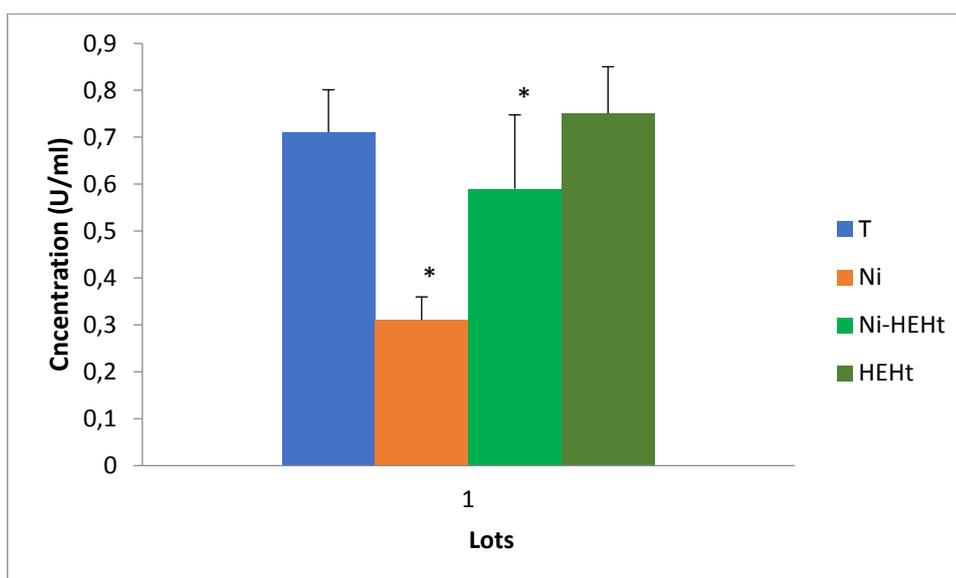


Figure 46: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*:p<0.01).

4.2. L'activité de la CAT

Les résultats de la figure 47 et 48 relatifs à l'activité de la catalase érythrocytaire montrent que cette enzyme est surexprimée chez les rats intoxiqués au (Ni) par rapport aux rats témoins. Toutefois, l'administration de HEHa et/ HETH chez les rats intoxiqués a réduit significativement (p<0.05) l'activité enzymatique de la CAT par rapport aux rats intoxiqués non traités au HEHa /

HETh. De même, cette diminution significative de ($p < 0.05$) de cette activité a été observée chez les rats témoins traités aux huiles essentielles comparés aux rats témoins non traités (**figure 47,48**).

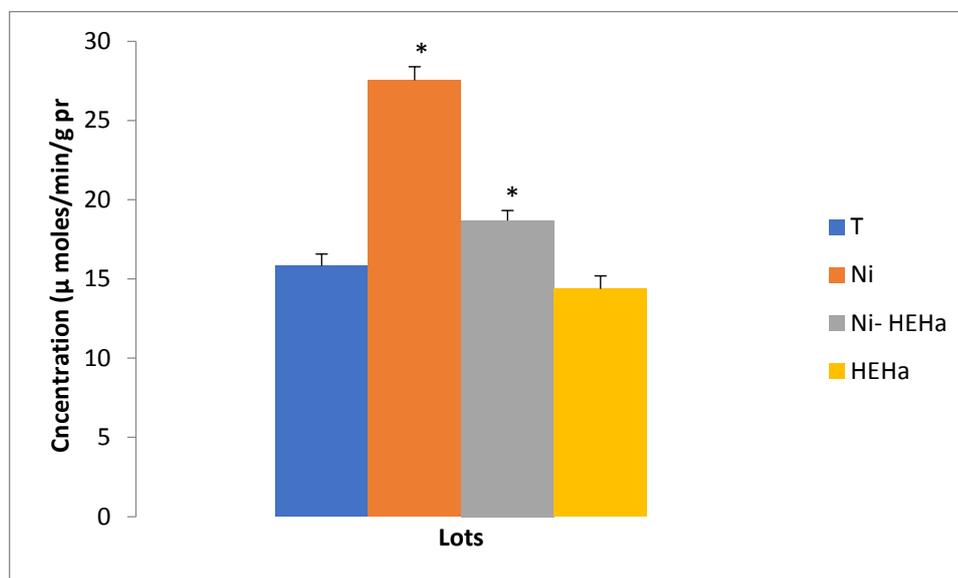


Figure 47: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*: $p < 0.05$)

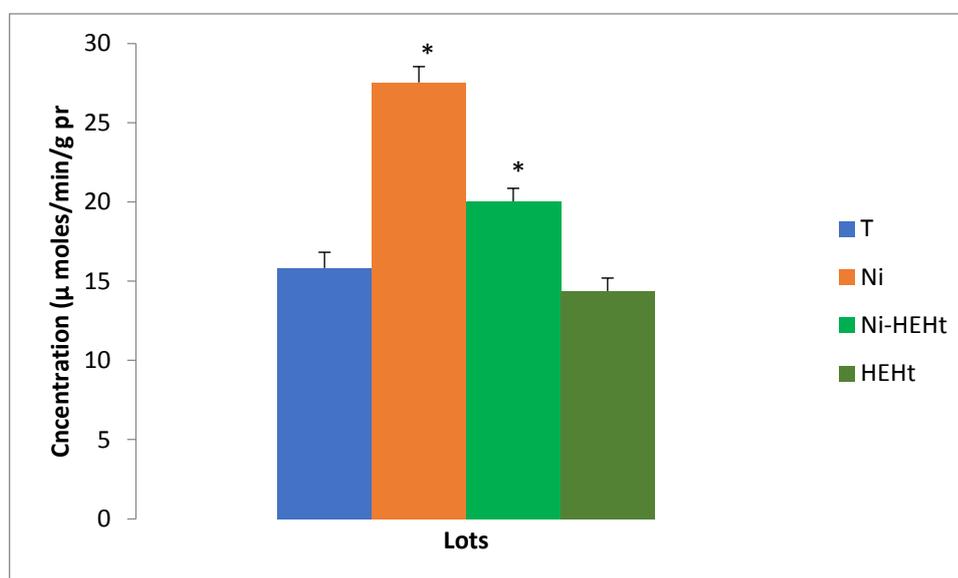


Figure 48: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*: $p < 0.05$)

4.3. L'activité du GPx

Le Glutathion peroxydase constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection qui assurent la détoxification du peroxyde d'hydrogène dans les conditions physiologiques normales. Les résultats obtenus relatifs à son action indiquent une baisse significative ($p < 0.05$) ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique du GPx chez les animaux exposés au Ni comparés aux animaux témoins. Cependant, les tests statistiques présentent une élévation significative ($p < 0.05$) ($p < 0.01$) de l'activité enzymatique du GPx chez les rats intoxiqués et traités au HEHa / HETH comparés aux rats non traités au HEHa / HETH (**Figure 49,50**).

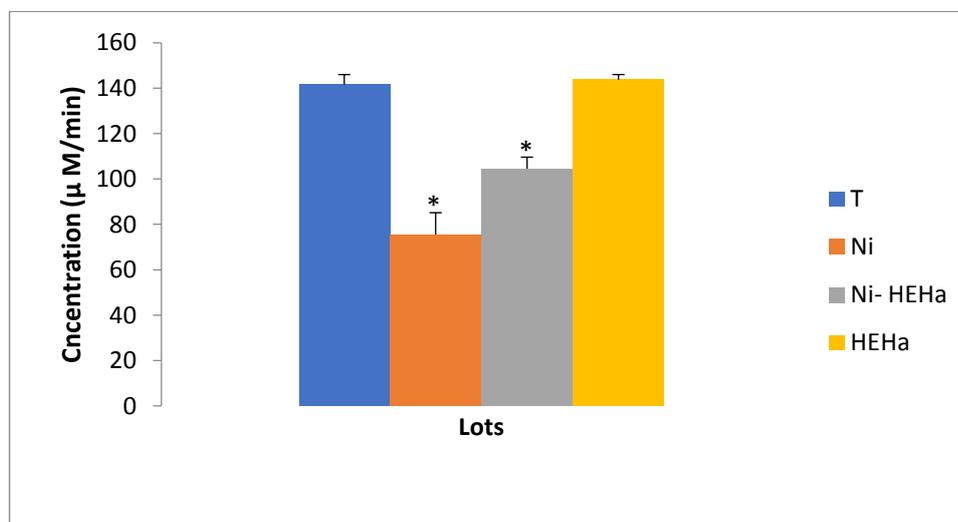


Figure 49: L'effet de HEHa sur l'activité enzymatique de la GPx érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (*: $p < 0.05$).

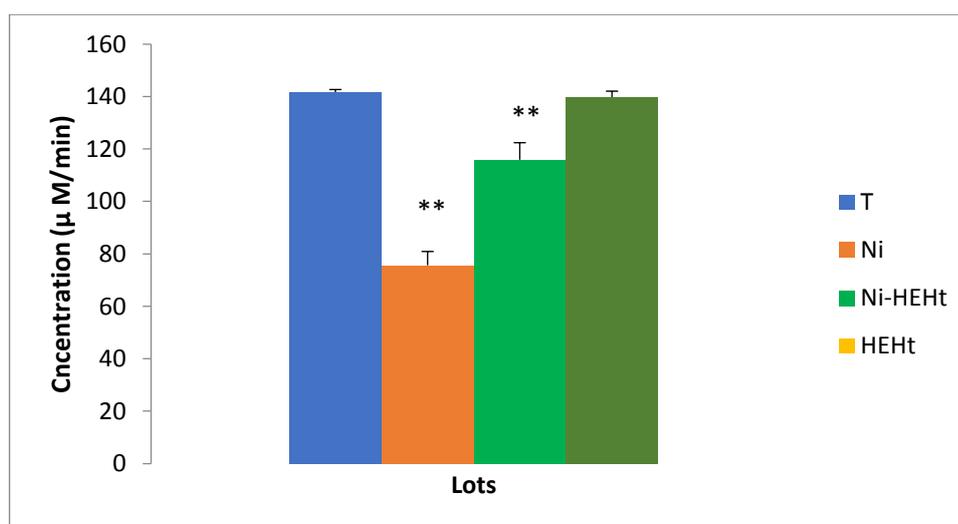


Figure 50: L'effet de HEHt sur l'activité enzymatique de la GPx érythrocytaire chez rats témoins et intoxiqués au Ni (**: $p < 0.01$).

5. Dosage biochimique :

5.1. Détermination du taux de Nickel sanguin :

Les résultats obtenus de dosages du nickel sanguin par l'utilisation de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), sont de l'ordre de $50,21 \pm 0,05$ $\mu\text{g/dl}$ pour les rats intoxiqués par le NiSO_4 (**Tableau 20, 21**). Ces taux sont diminués significativement ($p < 0.001$) à la suite de l'administration de l'extrait des deux plantes respectivement (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) ($28,17 \pm 0,11$), ($31,09 \pm 0,03^*$) ce qui suggère qu'elles sont douées d'un pouvoir de détoxification chez le lot de rats (Ni-HEHA, Ni-HETh).

Tableau 20: La comparaison du taux de nickel sanguin chez les rats témoins, intoxiqués au Ni, intoxiqués et traités à HEHa.

	Ni	HEHa	Ni- HEHa	T
Ni ($\mu\text{g/g}$)	$50,21 \pm 0,05^*$	$0,19 \pm 0,08$	$28,17 \pm 0,11^*$	$0,21 \pm 0,05$

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$).

Tableau 21: La comparaison du taux de nickel sanguin chez les rats témoins, intoxiqués au Ni, intoxiqués et traités à HETH.

	Ni	HETh	Ni- HETH	T
Ni ($\mu\text{g/g}$)	$50,21 \pm 0,05^*$	$0,25 \pm 0,07$	$31,09 \pm 0,03^*$	$0,21 \pm 0,05$

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (*: $p < 0.05$).

5.2. Dosage de glycémie

Les résultats montrent une augmentation significative du taux de la glycémie chez les rats intoxiqués au NiSO_4 ($p < 0.001$), respectivement par rapport aux rats témoins cependant l'administration de HEHa/ HETH ont permis d'enregistrer une baisse dans le taux de glucose (**Figure 51 et 52**).

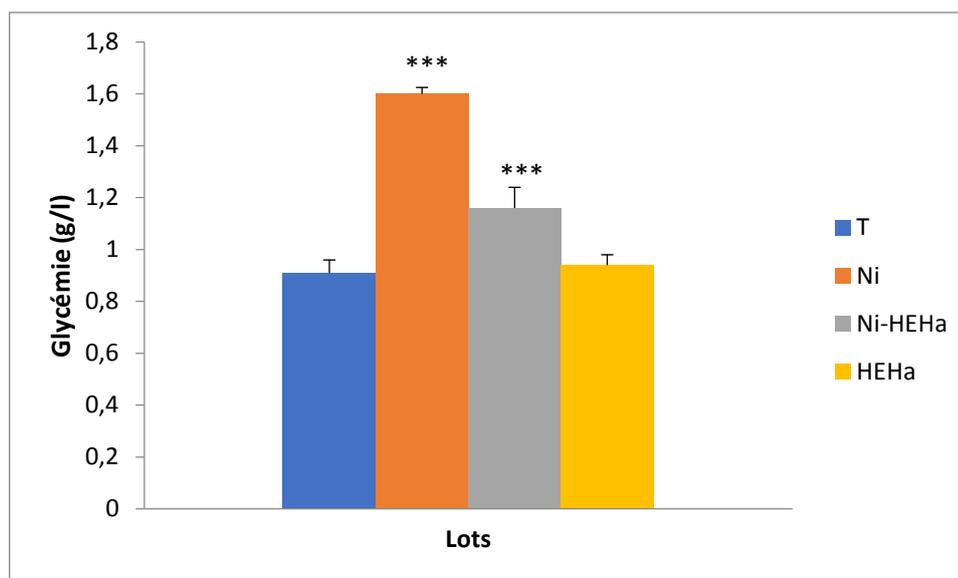


Figure 51 : Le dosage de la glycémie chez les jeunes rats témoins, intoxiqués au NiSO₄, intoxiqués et traités à HEHa. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; (***) : $p < 0.001$.

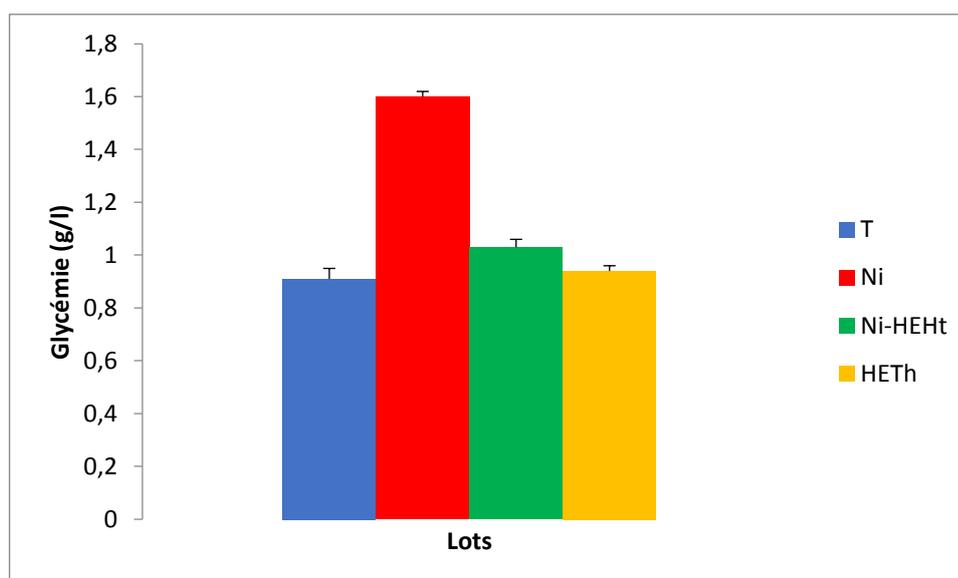


Figure 52 : Le dosage de la glycémie chez les jeunes rats témoins, intoxiqués au NiSO₄, intoxiqués et traités à HETH. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; (***) : $p < 0.001$.

5.3. Dosage des biomarqueurs de la fonction rénale

L'analyse biochimique des biomarqueurs rénaux à la fin de l'expérimentation a montré une élévation significative de la créatinine et de l'urée chez les rats exposés par le Ni comparés aux rats témoins. (**Tableaux 22 et 23**). Après le traitement par HEHA ou HETH, on a observé une nette correction des teneurs plasmatiques de l'acide urique, la créatinine et l'urée chez les rats préalablement intoxiqués.

Tableau 22: Effet de **HEHa** sur le taux d'urée sanguin, d'acide urique et de créatinine chez des rats intoxiqués par NiSO₄ comparés aux rats témoins.

	Ni	HEHa	Ni- HEHa	T
Urée (mg/dl)	7,21±0,037*	3,13 ±0,42	4,55 ±0,11*	3,02 ±0,09
Acide urique (mg/dl)	6,41 ±0,5*	3,17±0,55	4,84±3,10*	3,05 ±0,34
Créatinine (mg/dl)	22,30 ±0,01*	6,78±0,06	11,91±0,03*	7,10 ±0,05

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (*: p<0.05).

Tableau 23: Effet de **HETH** sur le taux d'urée sanguin, d'acide urique et de créatinine chez des rats intoxiqués par NiSO₄ comparés aux rats témoins.

	Ni	HETH	Ni- HETH	T
Urée (mg/dl)	7,21±0,037*	3,10 ±0,50	5,05 ±0,04*	3,02 ±0,09
Acide urique (mg/dl)	6,41 ±0,5*	3,51±0,11	5,14±4,01*	3,05 ±0,34
Créatinine (mg/dl)	22,30 ±0,01**	7,08±0,03	13,65±0,08**	7,10 ±0,05

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (*: p<0.05).

5.4. Exploration de la fonction hépatique

L'analyse des marqueurs de la fonction hépatique, indique qu'au niveau sérique l'activité de l'ALT et AST sont significativement plus élevées chez les rats intoxiqués (Ni) vis à vis aux rats témoins (p<0.05). Le traitement par les huiles essentielles des la plantes (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) on permis d'observer une diminution significative dans les activités transaminases (ALT et AST) comparée aux rats intoxiqués au (Ni) (**Tableau 24 et 25**). L'exposition au Nickel augmente la teneur en bilirubine totale chez les animaux intoxiqués (Ni) comparées aux animaux témoins. L'administration des huiles essentielles des plantes réduit significativement les teneurs de la bilirubine totale chez aux rats intoxiqués au Nickel traités par les huiles essentielles de (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) comparé aux rats intoxiqués (p<0.01) (**Tableau 24 et 25**).

Tableau 24: Effet de l'huile essentielle de la plante *H.articulatum* sur l'activité des enzymes hépatiques et la teneur en bilirubine chez des rats intoxiqués par le plomb comparés aux rats témoins.

	Ni	HEHa	Ni- HEHa	T
ALAT (UI/l)	64,75±1,51*	12,83 ±0,24	24,51±2,11*	10,08 ±4,39
ASAT (UI/l)	65,79 ±1,63*	13,5 ±0,87	26,69±2,35*	14,57 ±0,42
Bilurbine totale (mg/dl)	13,11 ±0,01**	4,87±0,05	7,85±0,02**	4,85 ±0,14

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

Tableau 25: Effet de l'huile essentielle de la plante *T.hirsuta* sur l'activité des enzymes hépatiques et la teneur en bilirubine chez des rats intoxiqués par le manganèse comparés aux rats témoins.

	Ni	HETH	Ni- HETH	T
ALAT (UI/l)	64,75±1,51*	11,95 ±0,2	25,75 ±0,21*	10,08 ±4,39
ASAT (UI/l)	65,79 ±1,63*	11,53 ±0,8	27,31 ±0,4*	14,57 ±0,42
Bilurbine totale(mg/dl)	13,11 ±0,01**	4,67±0,03	7,81 ±0,01**	4,85 ±0,14

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

5.5. Evaluation des paramètres lipidiques

Cependant, les résultats des autres paramètres lipidiques (triglycérides et le cholestérol total) sont illustrés par les tableaux 26 et 27.

L'analyse statistique révèle que la teneur en lipides plasmatiques essentiellement les triglycérides et le cholestérol total sont significativement supérieurs (p<0,01) chez les rats intoxiqués (Ni) comparé aux rats témoins.

Par ailleurs, l'administration par la voie intrapéritonéale de HEHa et HETH chez les rats préalablement exposés au Nickel ont montré une réduction significative (p<0,01) des triglycérides et le cholestérol total comparé au rats intoxiqués.

Tableau 26: Effet de l'huile essentielle de la plante *H.articulatum* sur les différents paramètres biochimiques chez des rats intoxiqués par le Nickel comparés aux rats témoins.

	Ni	HEHa	Ni- HEHa	T
Cholestérol total (mg/)	2,45 ± 0,04**	1,74 ±0,06	1,88 ± 0,09**	1,78 ±0,07
Triglycérides	2,05±0,05**	1,09±0,02	1,28 ±0,03**	1,13 ±0,006

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

Tableau 27: Effet de l'huile essentielle de la plante *T.hirsuta* sur les différents paramètres biochimiques chez des rats intoxiqués par le nickel comparés aux rats témoins.

	Ni	HETH	Ni- HETH	T
Cholestérol total (mg/)	2,45 ± 0,04**	1,83 ±0,01	1,92 ± 0,11**	1,78 ±0,07
Triglycérides	2,05±0,05**	1,08±0,04	1,24 ±0,05**	1,13 ±0,006

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

6. Effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale des organes

6.1. Effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale du rein

L'histologie du cortex rénal des rats du lot témoin a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie (**Figure 53A**).

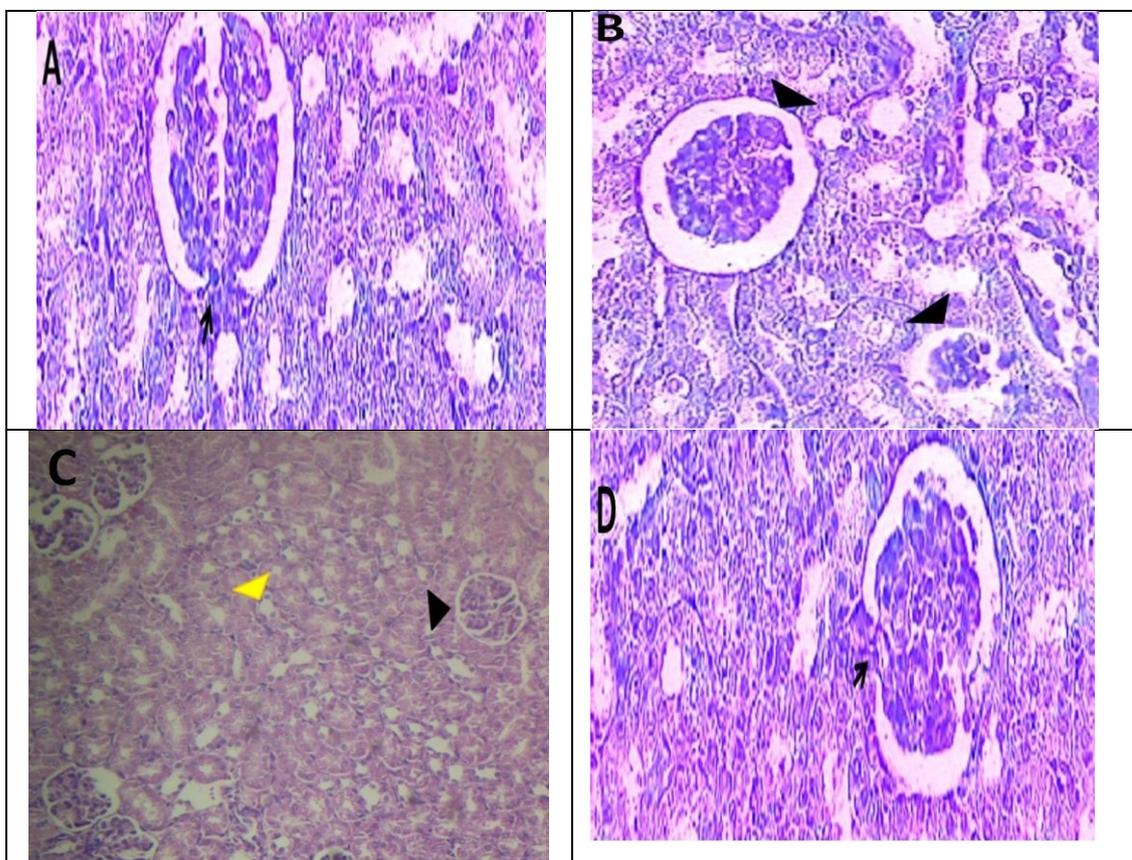
Chez les lots traités par HEHa, l'histologie du cortex rénale montre une structure normale et comparable à celle observé chez les rats témoins (**Figure 53 D**).

L'architecture du cortex rénal chez les rats du lot intoxiqué au nickel était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés, avec dégénérescence de la capsule de Bowman (**Figure 53B**).

Pour les lots intoxiqués au nickel et traités par HEHa, les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés); une régénération de la capsule de Bowman et des cellules interstitielles, avec des tubes contournés (**Figure 53C**).

Dans le même contexte, les animaux qui sont exposés au Ni et traités par HETH montrent une régénérescence tissulaire avec un parenchyme rénal marqué par une discrète réaction inflammatoire faite d'un infiltrat inflammatoire discret de type lymphocytaire (**Figure 53. E**).

L'observation au microscope optique des tissus rénaux des rats traités avec HETH a montré la structure normale des tubules rénaux et les glomérules (**Figure 53. F**).



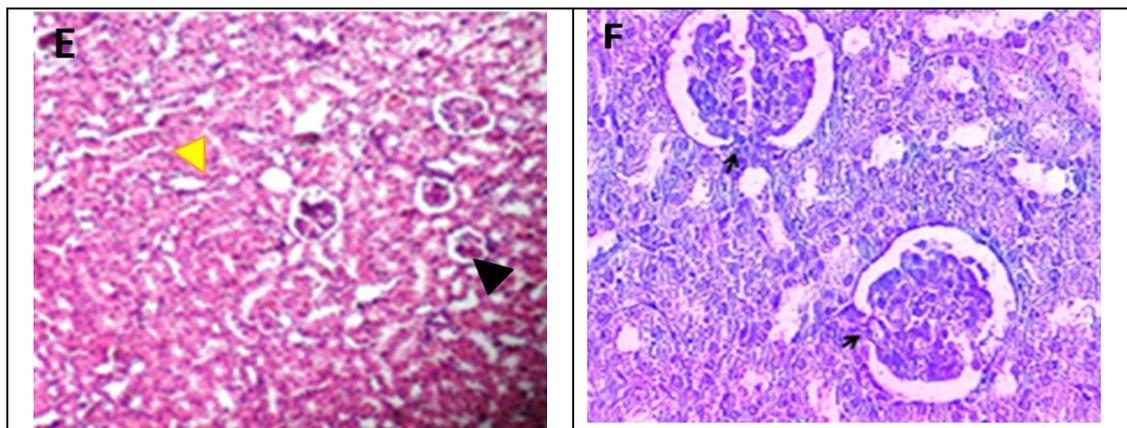


Figure 53: La microscopie optique de tissu rénal coloré à l'hématoxyline et à l'éosine.

(A) G : (x100) dans des sections de rein des rats témoins sont apparus avec l'architecture normale.(B) G : (x100) Sections des rats exposés au Nickel on montré une nécrose et dégénérescence de la capsule de Bowman (flèche noir).(C) G : (x20) Sections des rats exposés au Nickel et traités avec l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum* illustre une régénération de la capsule de Bowman (flèche noir) et des cellules interstitielles, avec des tubes contournés (flèche jaune) et (D) G : (x100) sections de rein normal des rats traités avec l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum* .(E) G : (x20) Sections des rats exposés au Nickel et traités avec l'huile essentielle de *Thymélaea hirsuta* illustre une régénération de la capsule de Bowman (flèche noir) et des cellules interstitielles, avec des tubes contournés (flèche jaune) et (F) G : (x100) sections de rein normal des rats traités avec l'huile essentielle de *Thymélaea hirsuta* .

6.2. L'effet du Nickel et HEHa et HETH sur l'architecture structurale du foie

Les coupes histologiques du foie des rats intoxiqués par NiSO₄ montrent un début d'un processus inflammatoire autour des espaces portes réalisant des signes d'hépatite avec foyer de nécrose. (Figure 54. (B)).

Le traitement des rats exposés au NiSO₄ avec huile essentielle de *Haloxylon articulatum* a montré la présence modérée de quelques foyers d'inflammation. De même, aucune nécrose ni de lésions épithéliale n'est observé (Figure 54. (C)).

De même, Le traitement des rats exposés au NiSO₄ avec l'HE de *Thymélaea hirsuta* a révélé des hépatocytes subissent des signes derégénération : hépatocytes de grande taille binucléés au cytoplasme granuleux (Figure 54. (E)).

Par ailleurs, l'observation au microscope optique des tissus hépatiques des rats témoins et les rats traités avec HEHa, HEHt ont montré un aspect subnormal, un parenchyme hépatique sans particularités histopathologiques (Figure 54. (A) ; (E) ; (F)).

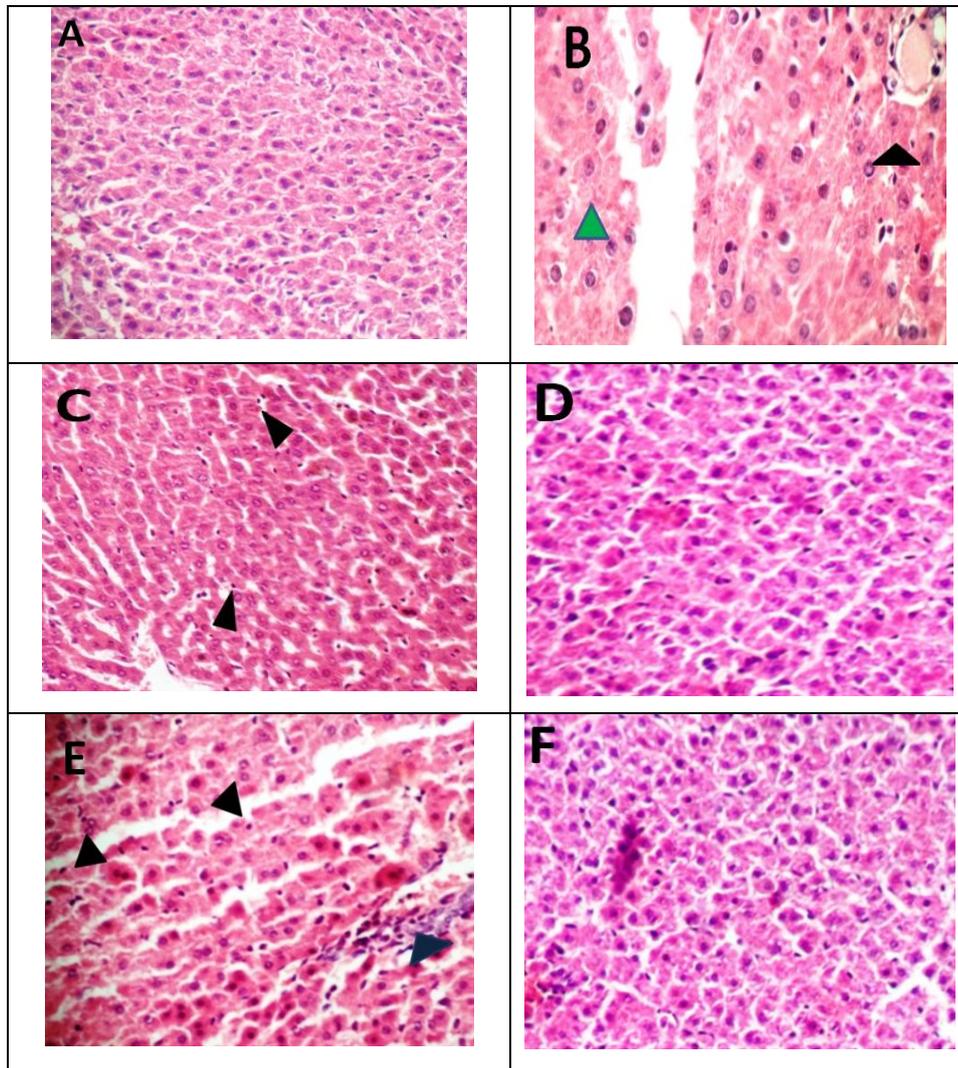


Figure 54: La microscopie optique de tissu hépatique coloré à l'hématoxyline et à l'éosine G:(x 40). **(A)** G:(x 40) dans des sections du foie de rats témoins sont apparus avec l'architecture normale. **(B)** Les rats exposés au Ni a montré une nécrose hépatique (flèche noir), nécrose (flèche verte). **(C)** des rats intoxiqués au Ni et traités avec l'HE *Haloxylon articulatum* illustre une inflammation modérée (flèche noire) **(D)** sections de foie normal des rats traités avec l'HE de *Haloxylon articulatum*. **(E)** Les rats exposés au Ni et traités avec l'HE de *Thymélaea hirsuta* a montré des hépatocytes en régénération (flèche noir), inflammation portale (flèche bleu) et **(F)** sections de foie normal des rats traités avec l'HE de *Thymélaea hirsuta* .

Discussion

1. Rendement et composition chimique

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix du solvant), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid) affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al, 2003). D'autres auteurs ont montrés que le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante. (Sun et al., 2007).

L'EA des deux plantes *Haloxylon articulatum* Boiss et *Thymélaea hirsuta* préparées à ébullition montre un rendement de 27.9 % et 14.34% respectivement, presque deux fois plus important que celui de l'EM de Ha et Th de rendement de 20.4% et 9,82% respectivement qui sont préparés à la température ambiante.

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives. (Mohammedi, 2013).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'extrait d'huile essentielle de *T. hirsuta* enregistre un rendement de l'ordre de 0.31% plus élevé que celui enregistré par *H. articulatum* 0.11%. Ces rendements peuvent être considérés comme le plus faible comparativement aux espèces de même genre.

Des études réalisées dans la région sud de la Tunisie ont montré que le rendement en huile essentielle varie selon l'origine de la plante. Les valeurs obtenues en fonction de la région de récolte : (Gabès, Médenine et Benguerdane 0.36%, 0.60% et 0.30%, respectivement). Le deuxième paramètre considéré était le mois de la récolte, les valeurs observées sont de 0.32%, 0.42% et 0.15% respectivement pour les mois d'Août, Novembre et Avril) (Neffati et al., 2009). En plus, Otmani en 2014 montre que l'extraction de l' *Haloxylon scoparium* qui a été effectué par deux méthodes, la première par hydrodistillation a fourni un très faible rendement de 0,18% par contre l'extraction par solvant a fourni un rendement plus important de 0, 572%.

Il semble, en fait que la teneur maximale en huile est obtenue quand toute les fleurs ont atteint leur pleine maturité, parce que les celices contiennent le plus grand nombre de glandes sécrétrices par unité de surface (Rahman et al., 1999).

Les analyses chromatographiques de l'huile essentielle *Haloxylon articulatum* ont permis d'identifier 69 composés qui représentent principalement les polyphénols, les terpènes.....ect,

Thymol (14,19%), Alphaterpinène (11,02), β -E-Ocimène (9,64), 1,8-Cineole (8,69), Oleuropine (5,17%), Linalol (5,12%), Delta-3-Carène (4,12). Les résultats obtenus corroborent avec les travaux de **Chaouche et al., (2014)** qui ont prouvé la présence des polyphénols. Plusieurs travaux réalisés sur la partie aérienne de la plante ont montré la présence des tanins, flavonoïdes (**Alghazeer et al., (2012)**). Ces composés phénoliques sont formés dans la voie des phénylpropanoïdes, qui est stimulée principalement par l'enzyme phénylalanine ammoniac-lyase (PAL). Le métabolisme des phénylpropanoïdes transforme phénylalanine, le point substrat de branche entre le métabolisme primaire et secondaire, alors que le stress environnemental, tels que la sécheresse peut influencer la voie de biosynthèse de polyphénol (**Andre et al., 2009**). En réponse à des stress environnementaux, l'activité de PAL augmente et que l'enzyme active de nombreux gènes engagés dans la synthèse des phénylpropanoïdes (**Oh et al., 2009**). Il a été montré que l'induction de l'accumulation des composés phénoliques, peut jouer un rôle dans le mécanisme de protection pendant un stress hydrique (**Miura et Tada, 2014**).

Compte tenu du caractère polaire des extraits, l'analyse réalisée a été orientée pour les composés hydrophiles, en particulier les phénoliques. De plus, l'activité antioxydante des espèces végétales est souvent liée à leur teneur phénolique, car ces composés sont connus pour leurs propriétés redox (en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, extincteurs à oxygène singulet ou chélateurs d'éléments métalliques) (**Rice-Evans et al., 1996**). En effet, la présence de phénols et de nombreux autres groupes de composés phénoliques (de concentrations différentes) dans les extraits végétaux est un facteur déterminant pour prévenir l'oxydation des lipides (**Rice-Evans et al., 1996**), qui constitue l'un des types les plus forts de activité antioxydante vérifiée parmi les espèces étudiées. En fait, planter les composés phénoliques peuvent retarder le début de l'oxydation des lipides et la décomposition des hydroperoxydes dans les produits alimentaires ainsi que dans les tissus vivants (**Carocho et Ferreira, 2013**). De plus, Certaines études ont montré que l'activité biologique des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Les composés purs, exemple le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des chémotypes. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (**Lahlou, 2004**).

2. Etude phytochimique

Selon les résultats du criblage phytochimique des plantes étudiées on a observé la richesse de la plante *Haloxylon articulatum* en métabolites secondaires tel que : alcaloïdes, saponosides,

coumarines ; tandis que *T.hirsuta* le résultat a révélé la présence une faible quantité (des traces) des Tannins et saponosides.

D'autres travaux ont montrés que les extraits méthanoliques de *T.hirsuta* et de *H.scoparium* contiennent d'importants métabolites secondaires comme : les flavonoïdes, glycosides cardiotoniques et les tannins ainsi que des alcaloïdes (**Mohammedi, 2013**). Donc ils peuvent attribuer aux extraits diverses propriétés thérapeutiques. **Levin (1976)** a observé la présence des alcaloïdes chez 36% des espèces de thymelaeacées, alors que **Touati (1985)** a signalé que *Thymelaea hirsuta* ne contient pas. Quant aux tannins, ils semblent être peu courants dans la famille des Thymelaeaceae. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (**Hegnauer, 1973**). Alors que les feuilles de *Thymelaea hirsuta* contiennent des tannins de type gallique (**El Beiheiry, 2000**). **Ferrari (2002)** affirme que les thymelaeaceae ne sont pas une famille à saponines.

Les polyphénols diminuent le risque des maladies cardiovasculaires en protégeant les lipoprotéines de faible densité contre l'oxydation et en limitant l'agrégation plaquettaire et les dysfonctionnements de l'endothélium vasculaire. (**Aichouba et Tenni, 2014**). Ils sont caractérisés aussi par leurs propriétés anti-apoptotiques, anti-vieillissements, anti-carcinogènes et anti-inflammatoires. Des propriétés antibactériennes, cardiotoniques sont décrites chez les terpénoïdes. Leur présence signifie que les plantes sont une bonne source en substance antimicrobiennes. Les glycosides sont connus pour abaisser la pression sanguine. (**Mohammedi, 2013**).

Les alcaloïdes sont caractérisés par une activité antibactérienne, antispasmodique et analgésique, ces molécules présentent aussi une certaine toxicité ce qui exige l'utilisation avec prudence des plantes. La présence des tannins confère aux plantes des propriétés antiseptiques et antioxydantes. Nos résultats indiquent la présence des flavonoïdes dans les extraits testés. Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et antioxydantes.

3. Evaluation de l'activité antioxydant

La capacité des extraits naturels à piéger les radicaux libres dépend de plusieurs paramètres : la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation des molécules bioactives.

La teneur élevée en phénols totaux dans les extraits et les interactions synergiques pourraient expliquer les fortes propriétés antioxydantes de ces plantes. Un tel concept a été prouvé par plusieurs travaux. (**Oktay et al., 2003 ; Ksouri et al., 2008 ; Cakir et al., 2003**) En comparant les résultats obtenus avec les données précédemment publiées sur *H.articulatum* et *T.hirsuta*, nous

avons trouvé que les teneurs totales en phénols et en flavonoïdes sont comparables aux études d'**Alghazeer et al.(2012)**.

Les extraits de ces plantes ont montrés une capacité à piéger le radical DPPH. L'extrait de *H.articulatum* présente une IC₅₀ de l'ordre de (15.06±1,45) µg/ml inférieure par rapport à celle de l'extrait de *T. hirsuta* (7,83±0,307) µg/ml. Ceci est en concordance avec les résultats de **Mohammedi, (2013)** obtenus à partir des extraits méthanoliques de *H. scoparium* et *T. hirsuta* qui ont montrés une activité antioxydante avec des IC₅₀ de l'ordre de 26,94±0,2128 et 12.37±0.307 µg/ml respectivement.

Les composés phénoliques de l'extrait de *H.articulatum* étaient probablement impliqués dans leur activité antiradicalaire. Ainsi, **Alghazeer et al (2012)** ont montré que *H.articulatum* est impliqué dans plusieurs processus biologiques, dont des activités antioxydantes (DPPH/IC50 8 mg/mL). Les données expérimentales révèlent que l'extrait de *H.articulatum* est susceptible d'avoir un effet plus puissant de piégeage des radicaux libres que le contrôle positif (BHT). L'effet de piégeage des extraits phénoliques et du standard sur le radical DPPH exprimé en valeurs IC50 était dans l'ordre suivant : *H.articulatum* (6,32- 0,25 mg/mL) (**Chaouche et al., 2014**).

L'activité antioxydante des plantes testées pourrait être attribuée à leur teneur totale en phénols et/ou flavonoïdes. Il existe une relation très positive entre les phénols totaux et l'activité antioxydante de nombreuses espèces végétales, en raison de la capacité de piégeage de leurs groupes hydroxyle (**Vinson et al., 1998**). Il a également été rapporté que les composés phénoliques sont des donneurs d'hydrogène efficaces, ce qui en fait de très bons antioxydants (**Yen, Duh, & Tsai, 1993**). De plus, les flavonoïdes agissent comme piégeurs de diverses espèces oxydantes, c'est-à-dire l'anion superoxyde (O₂ -•), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxy, ils agissent également comme des quenchers d'oxygène singulet (**Das et Ratty, 1986**).

Amari et al., (2014) montrent que l'extrait de *T.hirsuta* (feuille, fleur, tige) présentait une activité de piégeage dépendante de la concentration contre le radical hydroxyle dans un système réactionnel, et les potentiels de piégeage des radicaux libres des extraits se sont avérés être de l'ordre extrait de fleur>extrait de feuille>extrait de tige. Il semble que les trois extraits de parties aériennes de *T.hirsuta* possèdent des capacités de don d'hydrogène pour agir comme antioxydant.

En plus, les teneurs élevées en phénols et en flavonoïdes de *T.hirsuta* peuvent être responsables de son activité de piégeage des radicaux libres. De plus, le criblage de composés phytochimiques chez *T.hirsuta* a révélé la présence de tanins, d'alcaloïdes, de stéroïdes, de saponines, de composés réducteurs de coumarines et d'antraquinones.

4. L'effet du traitement par l'huile essentielle de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss et du nickel sur le poids corporel et le poids des organes :

Les résultats enregistrés montrent clairement que le poids des animaux exposés aux (Ni) est significativement inférieur à celui des animaux témoins qui se traduit par une diminution du gain pondéral. Toutefois, l'anorexie causée par ces métaux peut être justifiée par leur action sur plusieurs neurotransmetteurs qui sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, comme la sérotonine, la dopamine, norépinephrine, et le glutamate pourraient jouer un rôle primordial dans le contrôle de la satiété (Torres and Nowson, 2007). En plus, La modification du poids corporel ainsi que de la prise alimentaire indiquent évidemment que le stress est devenu une partie intégrale de la vie quotidienne (Bowers et al ., 2008 ; Frick et al ., 2009). Cependant, l'exposition au stress chronique peut apporter des conséquences nuisibles au cerveau et confère la susceptibilité à certains désordres émotionnels (Fernandez et al ., 2010). Citons que la diminution du poids corporel est l'un des symptômes dépressifs (Klerman and Weissman, 1988), les différences des poids observées au cours de cette expérimentation peuvent soulever l'hypothèse abordée par (Strekalova et al ., 2004) qui met en avant une prise alimentaire plus faible consécutive à une dépression.

Dans les mêmes séries d'expériences, nous avons observé une réduction significative du poids du rein, foie et cerveau chez les rats intoxiqués (Ni,) comparé aux témoins. Cela peut être dû au ralentissement dans le développement des organes internes (foie et rein, cerveau) (Bisson, 2012).

Par conséquent, l'administration de l'huile essentielle de *H. articulatum* Bois et *T.hirsuta* a des rats exposés aux (Ni) a permis d'observer une nette augmentation dans le gain corporel ceci comparé aux animaux intoxiqués. Ainsi une élévation significative du poids des organes tel que : cerveau, foie et rein. Ce regain de poids enregistré pourrait être dû à la présence de composés terpénoïdes qui agissent en stimulant le transport du glucose dans les cellules. Vu que, les variations de sucre et de l'hormone d'insuline dans le sang sont liées à l'appétit, à la faim et à différents besoins en nourriture, particulièrement des besoins en hydrates de carbone. En contrôlant le taux de ces paramètres dans le sang, elle constitue donc un complément efficace pour corriger la perte de poids chez l'animal (Judpientienë et Mockutë, 2004 ; Vinay Dwivedi et al., 2011).

Le poids corporel et le poids relatif des organes de tous les rats traités ne différaient pas significativement ($P > 0:05$) de ceux des groupes témoins. Cela indique que l'extrait n'a pas affecté l'appétit ou n'a pas eu d'effets indésirables sur la croissance des animaux (Kharchoufa.L et al., 2020)

5. Effet du nickel l'huile essentielle de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur le comportement cognitif chez le rat

Dans cette étude, nous avons étudié le comportement et l'effet neuropathologique potentiel de l'exposition expérimentale de rats au Nickel, et les animaux testés ont présenté des troubles neurologiques, notamment des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, l'état de la dépression, de l'anxiété, de l'activité locomotrice, ainsi qu'une perte neuronale par rapport aux témoins.

Concernant le test de la nage forcée, les résultats obtenus montrent clairement que les rats intoxiqués au Ni présentent un temps d'immobilité plus important que les rats témoins, ce qui reflète un comportement dépressif se manifestant par une réduction dans la nage et l'installation d'un état de désespoir qui est la conséquence de la perturbation de la voie sérotoninergique au niveau cérébral principalement striatum, hippocampe et l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cependant, la dépression est une pathologie qui serait liée à un hypofonctionnement du système sérotoninergique central (**Meltzer et Lowy , 1987**).ce résultat est similaire le résultat de **K. Kahloula et al en 2014** qu'ils ont montre clairement que les animaux intoxiqués au Ni durant la gestation et la lactation présentent un temps d'immobilité plus important que les animaux témoins, Ces données sont en accord avec certains travaux qui rapportent que l'exposition au Ni entraîne une diminution globale significative de l'expression des gènes liés à 5-HT reflétant en grande partie l'effet négatif sur le récepteur (**Lauder, 1985; Dreyfus, 1998**). De plus, les altérations du transporteur de la sérotonine pourraient participer à la physiopathologie de la dépression (**Slotkin et Seidler, 2008**).

Alors, L'augmentation de l'immobilité dans le FST indique un comportement de désespoir aggravé, ce qui est sans aucun doute expliqué par un dérèglement au niveau des systèmes de régulation induit par le Ni. Le stress génère donc des modifications comportementales et il serait responsable chez l'homme selon des études réalisées de beaucoup de désordres psychiatriques comme la dépression et l'anxiété (**Garcia-Bueno et al ., 2008 ; Horstmann and Binder, 2011**).

Par ailleurs, les deux lots de rats : Ni.HEHa et Ni.HETH présentent une réduction de (TIM) comparant avec les rats reçu le sulfate du nickel et résultat sont particulièrement proches du groupe témoin, ce qui reflète une action efficace des molécules végétales et des éléments chélatants sur le rétablissement de l'état normal.

En plus, Certaines études ont montré que l'activité biologique des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés séparément. Les composés purs, exemple le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différentes activités des

chémotypes. L'aldéhyde cinnamique est généralement indifférent aux deux phénols (**Lahlou, 2004**), donc présente un effet antidépresseur.

Cependant, L'analyse statistique dans le test open field qu'est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'activité locomotrice et l'anxiété chez les rongeurs montre une forte activité locomotrice qui est représentée par le nombre de carreaux traversés, aussi une augmentation significative de nombre de visites au centre et le nombre de redressement chez les rats exposés au Ni comparé aux rats témoins. Ces résultats confirmés par **K. Kahloula et al en 2014**, qu'ils ont montré clairement que l'administration du Ni pendant la gestation et la lactation a présenté une augmentation significative dans le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressement, ce qui révèle une hyperactivité locomotrice chez les rats intoxiqués par rapport aux rats non intoxiqués. Cette augmentation dans l'exploration du milieu est peut-être expliquée par l'action du Ni sur le système dopaminergique qui se traduit par une augmentation de la synthèse, de la libération du neurotransmetteur et l'hyperfonctionnement des récepteurs post synaptiques.

En revanche, nous avons observé que l'administration de l'huile essentielle avec le sulfate de nickel quelque soit pur le *H. articulatum* ou bien pour *T. hirsuta* une diminution significative dans le nombre de carreaux traversés et dans le temps de latence et le nombre de défécation en comparaison avec le groupe intoxiqué.

L'extrait de *H. articulatum* et *T. hirsuta* a révélé un meilleur effet sur l'apprentissage chez les animaux puisque l'évitement passif dans ce groupe était amélioré par rapport aux animaux intoxiqués. Ces résultats concordent avec les données précédemment rapportées indiquant qu'une co-administration de certaines préparations végétales comme l'extrait de *Vitis vinifera* avec Al a montré une guérison des troubles amnésiques (**Lakshmi et al., 2014**). Ce résultat obtenu dans cette étude est similaire au résultat de **Berkiks et al en 2014** suggèrent que l'extrait éthylique de *Thymelaea lythroides* peut entraîner une diminution de l'activité exploratoire et de la locomotion. De tels effets sont généralement médiés par une activité dans le système nerveux.

On peut expliquer que, l'acétylcholine est généralement liée à la mémoire à court terme et à l'activité locomotrice, les métaux lourds sont des métaux potentiellement toxiques qui inhibent des enzymes comme l'acétylcholinestérase cependant nos extraits de plantes protègent efficacement les fonctions neurologiques peut-être par inhibition l'effet du Ni (**Tair et al., 2016**).

En ce qui concerne les résultats enregistrés pour le test de la piscine de Morris nous avons constaté que le temps d'apprentissage des animaux intoxiqués était élevé d'une manière significative durant la phase d'acquisition par rapport aux animaux témoins. Cela indique que les

animaux exposés au Ni ont des difficultés ou des troubles d'acquisition. Concernant le probe test le temps de latence dans le quadrant cible par les rats intoxiqués est significativement inférieur à celui des rats témoins ce qui signifie que les animaux exposés au Ni n'ont pas bien mémorisé la localisation de la plateforme en se référant à des indices spatiaux. Par contre, la phase de la plateforme visible, les résultats de présent étude présentent un temps de latence significativement élevé chez les rats intoxiqués au Ni par rapport aux rats témoins, cela peut être dû aux troubles visuels installés au cours de la période de développement cérébral. Ces derniers sont expliqués par la perturbation et les affaiblissements des capacités d'apprentissage et de mémorisation (**Xu et al ., 2009**). D'après les résultats de **HALOUI. M (2014)**, les rattes soumises au stress chronique de contention montrent une augmentation significative du temps de latence avec diminution du temps passé dans le quadrant cible dans le test aquatique de Morris.

Les réponses physiologiques principales du stress chronique incluent l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) et le système sympathico-éduulosurrénale, par lesquels les niveaux de corticostérone et des catécholamines pourraient être modifiés (**Cohen and Hamrick, 2003 ; Yi et al ., 2013**). Ce qui en résulte une modification des fonctions cognitives incluant l'apprentissage et la mémoire spatiale (**Yi et al ., 2013**). Les troubles : apprentissage/mémoire spatiale sont à mettre en lien avec les altérations spécifiques de l'hippocampe dont dépendent largement ces taches comportementales (**Vann and Albasser, 2011**).

Dans des situations stressantes l'hypothalamus reçoit des stimulations directes du système limbique ainsi que des stimulations noradrénergiques provenant du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire (**Carrasco and Van De Kar, 2003 ; Itoi, 2008**). En réponse à ces stimulations, l'hypothalamus libère le CRH qui active l'adenohypophyse sécrétant à son tour l'ACTH. Ce dernier induit alors la synthèse des glucocorticoïdes à partir du cholestérol par les glandes surrénales. Ces hormones sont impliquées au cours du stress dans de nombreuses régulations fonctionnelles, dans les métabolismes et le système nerveux central (**Morilak et al., 2005**).

En plus, Le système glutamatergique, spécifiquement le complexe du récepteur NMDA, est une cible qui fait l'objectif de l'action neurotoxique du Ni. Cependant, l'exposition à ce métal induit des changements des fonctions du récepteur NMDA. Aussi, il est possible que le Ni puisse aggraver les lésions neuronales en potentialisant l'activité de NR2B, en particulier dans les neurones en développement (**Marchetti et Gavazzo, 2003 ; Gavazzo et al., 2011**). De plus, ce métal entre en compétition avec le Mg²⁺, Zn²⁺ et surtout avec Ca²⁺ dans les différents sites de liaisons de la libération du neurotransmetteur et sa régulation qui a des effets négatifs sur les fonctions normales physiologiques (**Eichhorn, 1975 ; Spiro, 1980**). Ainsi donc, les effets du Ni sur le système

glutamatergique pourraient contribuer à expliquer les perturbations du processus de l'apprentissage et la mémoire.

Par ailleurs, le traitement par *H.articulatum* et *T.hirsuta* a permis de diminuer significativement le temps de latence pour arriver à la plateforme durant les 4 jours de la phase d'acquisition pour l'huile essentielle. De plus, durant le probe test, les rats traités par ces deux plantes ont un temps de latence important dans le quadrant cible par rapport aux rats intoxiqués par le Ni et mettent peu de temps afin de trouver la plateforme dans la phase de la plateforme visible ce qui suggère l'effet correcteur de l'huile essentielle de ces deux plantes étudiées des troubles et des dommages causés par le sulfate e nickel. Donc l'extrait des deux plantes *H.articulatum* et *T.hirsuta* a augmenté la mémoire et les taches d'apprentissages en réduisant le taux d'acétylcholinestérase au niveau de la clé synaptique du cerveau.

L'analyse des données relatives au test du double compartiment obscurité/ lumière a montré que les animaux intoxiqués par le Ni ont souhaités de passer plus de temps dans le compartiment sombre durant les 5 min du test par rapport au lot témoin ce qui confirme un état d'anxiété des animaux intoxiqués. Certains auteurs ont indiqué que l'exposition au Ni présentera par la suite des troubles psychologiques à savoir : des tremblements, une anxiété et une dépression (**Kahloula et al., 2014**). Ces résultats sont corrélés avec ceux de Kang et al. (**Kang et al., 2006, 2007**) qui suggèrent que l'exposition au Ni affecte le fonctionnement de plusieurs canaux ioniques neuronaux différents de type N-méthyl-D aspartate (NMDA) dépendants du calcium. De plus, certains auteurs indiquent que ce métal lourd module l'activité des récepteurs NMDA d'une manière qui dépend en partie de la sous-unité (NR2A ou NR2B) (**Marchetti et Gavazzo, 2003 ; Gavazzo et al., 2009**). Cette médiation des récepteurs fournit un rôle important dans la plasticité synaptique qui organise le système nerveux en développement (**Yashiro et Philpot, 2008**).

Par ailleurs, les deux lots de rats : Ni.HEHa et Ni.HETH passent un temps significativement inférieur à celui du groupe intoxiqué par le Ni dans le compartiment sombre. Tandis que ces derniers lots des rats ont tendance de passer plus de temps dans le compartiment claire que les rats soumis a un stress par le Ni.

Le teneur en polyphénols totaux de 86.44 mg/g pour *Themylaeahirusta* et le teneur en flavonoïde totaux est de 83.86 mg/g(**GHOUL, 2019**), ces molécules jouent un rôle antioxydant important qui inhibe l'effet du Ni.

D'après ces résultats, l'HE de ces deux plantes peut avoir un effet anxiolytique.

6. Impact du Ni et HE de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur le stress oxydant érythrocytaire

Les enzymes antioxydants endogènes sont responsables de la neutralisation du radical libre ainsi que de la prévention de son action responsable de dommage tissulaire. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de ROS et défenses antioxydantes, qui à son tour provoque une série des événements déréglementer les fonctions cellulaires. Les enzymes antioxydants, telles que la SOD, CAT et GPX constituent une équipe solidaire de la défense contre ROS (**Bandyopadhyay et al., 1999**).

Les résultats obtenus montrent que le sulfate de nickel on provoqué une augmentation importante de la concentration de CAT et une diminution de la glutathion peroxydase et SOD dans le sang des rats intoxiqués par le Ni par rapport aux rats témoins. Ce résultat est nettement en accord avec ce qui a été décelé par **Martin-Mateo et al., 1997** qui ont attribué à cette augmentation d'activité suite à une augmentation du taux de Ni sanguin accompagné par une surexpression de la CAT. De plus, **Das et al., 2006** ont rapporté des résultats similaires au niveau érythrocytaire chez des rats adultes ayant reçu la solution de NiSO₄ par voie IP et avec ceux de **Chen et al., 2002** qui ont noté cette surexpression dans des lymphocytes humaines. D'autre part, la CAT peut réduire partiellement les oxydants induits par l'élévation du taux de Ni. Elle prévient aussi la génération des radicaux hydroxyles (**Das et al., 2008**). L'étendue de la peroxydation lipidique induite par le nickel a montré une relation inverse avec certains des systèmes de défense antioxydants cellulaires endogènes, à l'exception de la SOD, de la CAT et de la glutathion-S-transférase. De plus, l'exposition des lymphocytes de rat au sous-sulfure de nickel augmente la formation de ROS de manière concentration-dépendante (**Chakrabarti et Bai, 1999**).

Dans le même contexte, on a constaté que l'administration orale du Ni à des rats en développement a provoqué une diminution de l'activité du glutathion peroxydase (GPx). Ces travaux se concordent avec ceux de **Das et al., 2008** et **Wu et al., 2007** qui ont posté que l'administration du Ni entraîne une baisse de l'activité du GPx. Néanmoins, **Saka et al., 2011** ont révélé que la diminution de cette activité peut conduire à un état de stress oxydatif notamment au niveau des globules rouges.

Et en ce qui concerne le dosage de la SOD, nous avons remarqué que l'intoxication par le Ni a diminué significativement la concentration de cette enzyme au niveau érythrocytaire. Ceci est d'une part en accord avec les travaux de **De Moffarts et al., 2005** qui ont suggéré que le Ni joue rôle important en tant que catalyseur de la SOD, avec ceux de **Das et al., 2007** qui ont obtenu des

résultats similaires au niveau érythrocytaire chez des rats adultes ayant reçu la solution de NISO₄ par voie IP.

Ces résultats ont montré que le traitement chronique par le Ni a provoqué des dommages oxydants érythrocytaires importants conduisant en premier lieu à une peroxydation des lipides qui s'accompagne habituellement par l'augmentation significative du taux des radicaux libres, ce qui donne par la suite naissance à une série de modifications à l'échelle biochimique touchant particulièrement l'activité enzymatique antioxydante. Toutefois, ces perturbations cellulaires étaient à l'origine de la perte de la capacité de lutte contre les dommages issus des agressions radicalaires. Ceci a été confirmé par **Saka et al., 2011**.

Par conséquent, on peut noter que la toxicité du Ni(II) réside dans la génération de radicaux libres à partir de complexes Ni(II)-thiol ou d'oxygène singulet ou d'hydroxyperoxydes lipidiques de manière complexe. Il est possible que l'accumulation de fer induite par le nickel soit directement responsable de la formation et de l'amélioration subséquente des espèces réactives de l'oxygène (ROS) de la peroxydation lipidique via les voies redox (**Stohs et Bagchi, 1995**).

En plus, Le nickel induit un stress oxydatif avec génération de ROS peut stimuler les voies de signalisation cellulaire en développant un microenvironnement intracellulaire à faible teneur en oxygène. Ceci, à son tour, active le facteur de transcription hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) et régule toutes les expressions du gène de l'hypoxie. La voie peut se transformer en réponse adaptative contre l'hypoxie cellulaire induite par le nickel ou en apoptose. En outre, il a également été observé que les métaux lourds comme le nickel (II) via les ROS peuvent imiter l'hypoxie cellulaire mais peuvent ne pas toujours activer les gènes dépendants de HIF-1 (**Salnikow K et al., 1994**). La raison possible de l'activation induite par le nickel du facteur de transcription HIF-1 α est que Ni(II) remplace Fe(II) dans le transporteur d'oxygène et produit une forme hybride d'hémoglobine non fonctionnelle. Ce phénomène évolue vers une hypoxie intracellulaire permanente, qui active alors HIF-1 α (**Lynn S et al., 1998**).

Alors que, **Rioux, 2009** a suggéré que le Ni présente une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), ce qui lui permet d'activer facilement les antioxydants contenant du soufre.

Cependant, les résultats obtenus par les deux lots des rats Ni.HEHa et Ni.HETH, a permis d'observer une augmentation significative de la teneur en GPx. Cet effet positif de l'huile essentielle de *H. articulatum* et *T. hirsuta* algérien sur la défense contre le stress oxydatif est probablement dû à sa composition en métabolites secondaires dont les alcaloïdes, les polyphénols et les flavonoïdes.

Benkrief et al en 1990 ont signalé que *H. scoparia* d'Algérie contenait les alcaloïdes carnégine et la N-méthylisosaloline comme alcaloïdes majeurs de la tétrahydroisoquinoléine en plus de

l'isosalsoline, la Nméthylcoryaldine, la déhydrosalsolidine, l'isolsalsolidine et la Nméthyltryptamine comme alcaloïdes mineurs, tandis que d'autres ont signalé que *H. scoparia* des régions algériennes communément appelées Naborsactose contenait l'actose quercétinalnose majoritaire. flavonoïde le plus actif (**Abraham et Flechas, 1992**).

De même, des études récentes ont mis en évidence le rôle déterminant de certains métabolites secondaires isolés spécifiés tels que le resvératrol (**Zaky A et al., 2013**) et la quercétine (**Sharma et al., 2013**) dans la protection et la rémission respectivement de la neuroinflammation cérébrale induite par Al et des troubles cognitifs/dysfonctionnement de la neurotransmission liés aux dommages oxydatifs.

En plus, Thymol compris parmi les antioxydants phénoliques, qui inhibe la peroxydation des lipides en agissant comme chaîne rupture antioxydant, ainsi que l'amélioration les activités des enzymes antioxydants. Thymol possède propriété antioxydant caractérisé par son groupe hydroxyle phénolique dans sa structure qui donne des électrons à éteindre les radicaux libres. Elle empêche également l'oxydation de Fe^{+2} par H_2O_2 dans la réaction de Fenton (**Saxena et Flora, 2004**).

De plus, des études antérieures ont démontré que la partie aérienne de *T. hirsuta* présentait une ressource antioxydante potentielle, principalement en raison de leur énorme teneur en composés phénoliques et flavonoïdes (métabolites secondaires) qui sont considérés comme les composés phytochimiques les plus importants (**Akrout et al., 2011 ; Trigui et al., 2013 ; Amari, 2014**). Ces composés bioactifs naturels jouent un rôle bénéfique dans la prévention des dommages cellulaires dus au stress oxydatif causé par les radicaux libres. Il est largement connu que les radicaux libres sont les agents causals de plusieurs maladies (**Rahman et al., 2012 ; Carocho et al., 2013**).

Alors ces résultats ont démontré que le traitement par l'huile essentielle de *H.aticulatum* et *T.hirsuta* corrige les altérations enzymatiques induit par l'intoxication du nickel,

7. Les paramètres biochimiques

Au niveau sanguin, nous avons entrepris une série d'expériences portant sur le dosage du nickel, l'analyse des teneurs en glucose, urée, créatinine, TGO/TGP, cholestérol et triglycéride, L'analyse sur l'activité des enzymes antioxydant (CAT, SOD et GSH-Px).

7.1. La détermination du taux sanguin de nickel

Les résultats obtenus de dosages du nickel sanguin par l'utilisation de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA), sont de l'ordre de $50,21 \pm 0,05$ $\mu\text{g/dl}$ pour les rats intoxiqués par le $NiSO_4$. Ces taux sont diminués significativement ($p < 0.001$) à la suite de

l'administration de l'extrait des deux plantes respectivement (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) (28,17±0,11),(31,09±0,03)).

Minoia et al., (1990), Observent des valeurs de référence dans le sang et le sérum respectivement de 22 – 56 nmol/L et 4 – 48 nmol/L. ce qui est comparable avec nos résultats. Il est évident que le Ni comme étant un métal lourd, se lie aux protéines spécifiques et quelques acides dans le sang et le placenta qui sont indispensables pour son transport et sa distribution dans le corps (**Das et al ., 2008**). La clairance du plasma obéit à un modèle à deux compartiments (**Hotchkiss et al., 1993**) dominé par la filtration glomérulaire et un « puits » des tissus mous. Le nickel présenté aux cellules sous forme de Ni²⁺ soluble pénètre principalement dans les organites extranucléaires, alors que les particules phagocytées se concentrent près du noyau enveloppe et sont ensuite solubilisés après quoi le nickel s'accumule dans le noyau (**Brunmark, 1995**). Cela peut expliquer le potentiel cancérigène plus élevé des particules, telles que NiS et Ni₂S₃. En plus, une étude a rapporté une augmentation transitoire des réticulocytes sanguins chez les travailleurs qui buvaient de l'eau d'une fontaine à eau contaminée par du sulfate de nickel, du chlorure de nickel et de l'acide borique (**Das et al., 2008**). Cependant, le traitement par l'HEHa et HETH a permis de réduire le taux sanguin de nickel chez les groupes exposés au Ni et traité en comparaison avec le groupe exposé au Ni. Alors que, l'huile essentielle de ces deux plantes étudiée a été plus efficace pour réduire le taux du nickel sanguin, ce qui suggère qu'elles sont douées d'un pouvoir d'huile essentielle de *H.articulatum* et *T.hirsuta* de détoxification.

7.2. Effets du Ni et HE de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur le bilan glucidique

Les résultats indiquent une différence fortement significative ($p < 0,001$) du taux de glucose sanguin chez les rats subit à une intoxication par le NiSO₄ par rapport à celle des rats témoins. Ceci est peut être lié directement aux effets néfastes de sulfate de nickel sur le pancréas et plus exactement sur l'excrétion d'insuline par les îlots de Langerhans.

Ces résultats en accord avec les résultats obtenus par **K.Kahloula et al** en 2014, où ils se trouvent que l'exposition au Ni au cours de la gestation et la lactation a permis d'enregistrer une hyperglycémie chez les jeunes rats intoxiqués comparés aux rats témoins. Ce la signifie que l'administration du Ni durant la période de développement entraîne un dysfonctionnement du métabolisme énergétique, cette augmentation de la concentration sanguine de glucose est le résultat de la glycogénolyse hépatique et musculaire pour couvrir les besoins énergétiques de l'organisme surtout cérébral. Certains auteurs confirment que l'exposition au Ni engendre un effet stressant qui se traduit par une hyperglycémie sous l'action des hormones de stress à savoir: la corticotropine

releasing factor, la corticotropine et la cortisone au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénale respectivement, activant ainsi les enzymes du métabolisme glucidique (**Kasdallah et al., 2005**). Les résultats obtenus sont en accord avec les travaux de Klas (**Klas, 1990**) qui indiquent que l'injection intrapéritonéale de chlorure de Ni chez le rat entraîne une hyperglycémie. Cependant, le système nerveux est particulièrement sensible au stress oxydatif et au dysfonctionnement mitochondrial qui est entraîné par le Ni en raison de ses besoins énergétiques élevés et sa forte teneur en lipides, bien que le glucose soit considéré comme une source de l'énergie pour le cerveau (**Ebert et Haller, 2003 ; Weydt et al., 2006**).

D'autre part on observe que taux de glucose sanguin est diminué chez les rats traités par l'HE de *H.articulatum* et *T.hirsuta* en comparant aux rats intoxiqués. L'administration de l'huile essentielle de ces deux plantes à des rats exposés au NiSO₄ entraîné une diminution de niveau de glucose dans le sang, il a montré que cette huile essentielle effectue une activité hypoglycémique, entre autres choses (**Prasad et al., 2005**). Il réprime l'expression de gènes de phosphore-énol pyruvate-carboxykinase (PEPCK) et le glucose 6- phosphatase (G6Pase), qui codent pour des enzymes contrôlent la gluconéogenèse hépatique.

D'après les résultats des expériences réalisées et leur discussion, nous suggérons que trois classes de métabolites secondaires peuvent être à l'origine de l'effet antihyperglycémiant observé avec l'extrait HEHa et HETH ; les alcaloïdes, les flavonoïdes et les saponosides et qu'elles agissent le plus probable en synergie. D'autre part ces molécules peuvent agir en inhibant le transport intestinal du glucose, ou en stimulant la sécrétion de l'insuline, ou en stimulant l'utilisation périphérique du glucose. Les flavonoïdes sont considérés comme des potentielles molécules pour le traitement du diabète sucré et de ses complications (**Chen et al., 2015**). Et les saponosides sont aussi connus par leur activité antidiabétique, et ceux de nature triterpénoïdes sont considérés comme de potentielle molécules très prometteuse pour le développement de nouveaux médicaments antidiabétiques (**Li et al., 2004**).

Les triterpènes pentacycliques, sont considérés par Wen et ces collaborateurs comme une classe de molécules prometteuses comme des agents hypoglycémiant, la même équipe a proposé qu'ils agissent en partie par l'inhibition de la glycogène phosphorylase, une enzyme clé dans l'hydrolyse du glycogène (**Wen et al., 2008**).

Par ailleurs, les classes des métabolites secondaires, auquel appartiennent les principaux constituants phytochimiques de *H. scoparia*, sont des molécules antidiabétiques prometteuses. Ainsi les trois classes d'alcaloïdes isolés de *H. scoparia*, les tetrahydroisoquinolines, les indoles et les β -carbolines (**El-Shazly et Wink, 2003 ; Benkrief et al., 1989**) sont bien connues par leur effet antidiabétique.

7.3. Effets du Ni et HE de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur les biomarqueurs de la fonction rénal

Les résultats montrent une augmentation significative du taux sérique d'urée, créatinine et l'acide urique des rats intoxiqués au nickel par apport aux rats témoins et rats traités. Ces paramètres biochimiques sont considérés comme des biomarqueurs de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqués par ce métal. Particulièrement, la créatinine et l'urée sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale, en basant sur la filtration glomérulaire (Vyscosyl et al., 2003).

Ces résultats montrent bien que le Ni agissent sur la filtration glomérulaire en provoquant des variabilités au niveau de la concentration de l'urée et la créatinine dans le sang (Albahary et al., 1965 ; Ponnappakkam et al., 2003).

En plus, La concentration sérique élevée de l'urée et de la créatinine peut être expliqué par le catabolisme des composés protéiques du corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes qui jouent un rôle important dans ce processus, où les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine (Pari et Amudha, 2011). D'un point physiologique, le rein est particulièrement sensible à l'action des toxiques, en raison de son intense activité métabolique et de ses multiples fonctions, notamment celles d'excrétion et de concentration des xénobiotiques (Sunderman et al. 2001). Les résultats enregistrés chez les rats intoxiqués ont montré une accumulation de Ni au niveau rénale. Tikare et al., (2013) ont révélé que le nickel s'accumule au niveau des reins, où il induit des lésions au niveau des glomérules et une protéinurie, ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, avec baisse de la filtration glomérulaire (Adeyemi et al., 2014). D'une autre part, l'augmentation de la concentration sérique de l'acide urique dans notre étude s'explique la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN) (Cavallo et al., 2003). Autrement, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de l'organisme contre les effets délétères des radicaux libres, dont il augmente la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique qui prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (Patel et al., 2012 ; Becker et al., 1993).

D'autre part, après le traitement par HEHa et HETH sur les rats intoxiqués au Ni on remarqué une diminution de l'urée, l'acide urique et la créatinine, qui s'explique par les propriétés inhibitrices de thymole de l'enzyme cyclo-oxégénale. Ce qui induit une diminution de la synthèse de prostaglandine de sa concurrence avec l'acide arachidonique (Hamdard, 2014). Donc L'HE de

H.aticulatum et *T.hirsuta* répare les tissus rénales endommagés. Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **Alqasoumi, et al., (2012)** qui ont évalué que l'extrait de Haloxylon présente un effet protecteur hépato-néphroprotecteur.

7.4. Effets du Ni et HE de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur les biomarqueurs de la fonction hépatique

L'analyse des marqueurs de la fonction hépatique, indique qu'au niveau sérique l'activité de l'ALT et AST sont significativement plus élevées chez les rats intoxiqués (Ni) vis à vis aux rats témoins ($p < 0.05$). Ainsi que l'exposition au Nickel augmente la teneur en bilirubine totale chez les animaux intoxiqués (Ni) comparées aux animaux témoins. Le foie constitue une cible importante du nickel ce qui conduit à des nécroses hépatiques et la sortie des aminotransférases (TGO et TGP) dans le sérum (**Saad et al., 2011**).

Ces transaminases (ALT et AST) sont des enzymes hépatocytaires (originaires du foie) dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide alphacétonique (**Guyader, 2005**). Sont des enzymes déchargées dans la circulation en cas de cellules endommagées (**Singh et al., 1998 ; Ozturk et al., 2009**). Et considérés comme de bons indicateurs de la cytolyse hépatique. Sont fréquemment attribués aux effets métaboliques et/ou toxiques de différentes drogues comme les psychotropes (**Himmerich et al., 2005**), l'alcool (**Liappas et al., 2006**) et les agents polluants tels que les résidus de l'industrie (**Michailova et al., 1998**).

Tandis que, L'augmentation des métaux lourds dans le foie est accompagnée d'une augmentation significative des taux d'ALAT et d'ASAT sériques. Selon (**Williamson et al., 1995**) des niveaux élevés d'aspartates d'alanine aminotransférases sont des paramètres fiables pour détecter des dommages hépatiques. En règle générale, ces résultats peuvent indiquer des changements dégénératifs et nécrotiques dans le foie (**El-Nekeety et al., 2009**). Ce qui s'explique clairement l'effet hépatotoxique du nickel qui est pénétré dans les cellules et à traversé la membrane nucléaire (**Patierno et al., 1987**). Ce qui est capable d'induire la mort cellulaire des hépatocytes par nécrose due aux effets de la production accrue des radicaux libres conduisant à la lyse cellulaire accompagnée par libération des constituants hépatiques et cellulaires notamment les transaminases vers le milieu extracellulaire (**Pari et Amudha, 2011; He et al., 2013**) en raison de lésions des membranes des hépatocytes, entraînant une libération accrue et la fuite de ces enzymes du cytosol du foie nécessaire pour la libération de ces enzymes à partir du tissu dans le plasma (**Pardeep et al, 2004**)

De plus l'augmentation des transaminases est expliquée par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et l'acide glutamique dans le sang provenant de la dégradation des protéines du corps. Ainsi ces acides aminés peuvent se transformés sous l'action des transaminases en composés carboxyliques tel que l'acide α céto glutamique et l'acide pyruvique puis en glucose, ce qui traduit la forte activité enzymatique des transaminases (Navarro *et al.*, 2005). L'augmentation sérique des aminotransférases est liée à l'effet hépatotoxique des xénobiotiques et leurs associations. Nos résultats sont cohérents avec les résultats de (Misra *et al.*, 1990) après le traitement des rats male par 107 μ mol/kg d'acétate de nickel.

En plus, L'élévation observée de la concentration sérique de la bilirubine totale et est aussi compatible avec la présence de lésions hépatiques qui est un indicateur de la présence d'une hyperbilirubinémie est clairement démontre par (Leelavinothan and Kasinathan, 2011). Alors que, L'augmentation de la bilirubine plasmatique indique le dysfonctionnement dans le foie. Nos résultats montrent une augmentation en bilirubine chez les rats intoxiqués. Ces observations sont en accord avec d'autres études (Yousef *et al.*, 2003 ; Yousef, 2004 ; Ben Amara *et al.*, 2011).

Cependant. Le traitement par les huiles essentielles des la plantes (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) on permis d'observer une diminution significative dans les activités transaminases (ALT et AST) et de la bilirubine totale comparée aux rats intoxiqués au (Ni). Ce qui indique une action protectrice des tissus hépatiques qui pourrait s'expliquer par l'effet chélateur et donc antioxydant des composants phénoliques que contient l'HE de ces deux plantes étudiées, qui réduit considérablement les radicaux libre générés par l'intoxication qui provoque la mort cellulaire dans le tissu hépatique (Ola El-Segaey *et al.*, 2007). Ces résultats sont montrés par Saleh *et al* (2012) signifient après les résultats obtenus que les trois plantes testées *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* et *Ochradenus baccatus* ne sont pas hépatotoxiques. Et ce résultats est confirmé par une autre étude de la même groupe de Saleh (Soliman *et al.*, 2012) qui a confirmé que cette plante n'est pas hépatotoxiques.

Ce résultat aussi en accord avec une étude réalisée par Kharchoufa *et al* (2020) afin qu'ils trouvent que les taux sériques d'ALT et d'AST des groupes 500, 1 000 et 2 000 mg/kg/pc étaient statistiquement inférieurs à ceux du témoin. En plus de cela, toutes les valeurs trouvées sont dans la plage normale pour l'espèce *Haloxylon scoparium*.

7.5. Effets du Ni et HE de *T.hirsuta* et *H.articulatum* Boiss sur le bilan lipidique

Le foie participe à de nombreuses phases du métabolisme des lipides, l'estérification et l'élimination du cholestérol, seul le dosage du cholestérol libre et estérifié du sérum a été largement utilisé pour l'étude des affections hépatiques (Awde, 2014).

Le résultat de l'effet du nickel sur le profil lipidique a montré une augmentation significative chez les rats intoxiqués (Ni) comparé aux rats témoins de la concentration sérique des composés lipidiques qui est principalement le cholestérol, triglycérides. Notre étude est concomitante à celle de Hfaiedh et al, 2008 ils ont trouvé que le traitement par le nickel a entraîné des perturbations du métabolisme lipidique. Cette augmentation peut être expliquée par les dégradations intenses des lipides aux niveaux des tissus adipeux dans l'organisme (Cempel et Janicka, 2002). Par conséquent, un taux élevé de cholestérol sérique peut être hépatique. Due à un dysfonctionnement hépatique (Das et al, 2006), qui est associée à l'augmentation en triglycérides et aussi peut indiquer une possible peroxydation lipidique de la membrane cellulaire due aux effets oxydatifs des radicaux libres due à une nécrose du foie. De plus, peut augmenter encore les dommages oxydatifs. La LPO constitue un processus d'oxydation radicalaire dans lequel les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire se décomposent pour donner, entre autres, des hydroperoxydes lipidiques hautement réactifs H₂O₂ hydroxyle (Misra et al., 1990 ; Hfaiedh et al, 2008).

Par ailleurs, l'administration par la voie intrapéritonéale de HEHa et HETH chez les rats préalablement exposés au Nickel ont montré une réduction significative des triglycérides et le cholestérol total comparé aux rats intoxiqués. Alors que Le traitement par l'HE de *H.articulatum* et *T.hirsuta* chez les rats intoxiqués présente une amélioration dans la valeur de cholestérol, les triglycérides, ces résultats sont similaires avec la travail de Saleh et al en 2012 qui montrent La nature non toxique des extraits éthanoliques de *L. pyrotechnica*, *H. salicornicum* et *O. baccatus* dans l'étude de toxicité aiguë et qu'est bien étayée par les niveaux normaux de données biochimiques après 35 jours de période de traitement chez le rat.

En plus, ils montrent que Les extraits à l'éthanol testés ont été bien tolérés après un traitement aigu et subchronique et ils n'ont produit aucun signe manifeste de toxicité clinique ni aucun signe d'hépatotoxicité. De plus l'HE de *T.hirsuta* pourrait être efficace pour la prévention aux effets toxiques qui provoque l'augmentation des taux de lipides induite par le nickel. Alors il possède un effet d'abaissement du taux de triglycéride et cholestérol.

8. Effet du Ni et HE de (*H.articulatum*, *T.hirsuta*) sur l'architecture des organes

8.1. Effet Ni et HE de *H.articulatum* et *T.hirsuta* sur l'architecture du rein :

Dans la présente étude, les résultats de l'examen microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des reins de rats exposés au Ni ont montré une altération et des changements de l'architecture tissulaire du rein clairement observées en comparaison avec ceux des témoins. Ces altérations où la plus part des glomérules sont nécrosées, avec dégénérescence de la capsule de Bowman, la présence d'une réponse inflammatoire, vacuolisation cytoplasmique et une dilatation de certains tubules rénaux. Ces altérations tubulaires causés par la toxicité par le Ni pourraient être le résultat d'un changement hydrauliques dans le tissu rénal et suggèrent que l'intoxication par le métaux lourds cède à une défaillance partielle des pompes de transport ionique dans les cellules tubulaire qui à son tour produit un gonflement tubulaire et provoque une nécrose et la vacuolisation de la tubules (**Wei et al., 2001**). Ces observations histo-pathologiques sont en accord avec ceux trouvés par **Das et Buchner, (2007)**.

Cependant, les lots intoxiqués au nickel et traités par HEHa, les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés); une régénération de la capsule de Bowman et des cellules interstitielles, avec des tubes contournés. Tandis que, **Kharchoufa et al en 2020** ont montré que quelques anomalies mineures ou légères ont été notées dans l'histoarchitecture des reins des (1000 mg/kg et 2000 mg/kg) dont une réduction des cellules glomérulaires (triangle rouge), une perte de composants cellulaires tubulaires (flèche noire), expansion de l'espace Bowman (étoile noire) et distorsions de la membrane épithéliale de la capsule Bowman. En revanche, aucun changement significatif n'a été observé dans les marqueurs biochimiques de la fonction rénale chez tous les rats traités. Au vu de cet écart entre les résultats biochimiques et histologiques des reins, on peut dire que l'extrait d'HS ne présente pas une néphrotoxicité suffisante pour avoir une altération des fonctions des reins. Cela peut être dû à la courte période de traitement (30 jours).

Dans le même contexte, les animaux qui sont exposés au Ni et traités par HETH montrent une régénérescence tissulaire avec un parenchyme rénal marqué par une discrète réaction inflammatoire faite d'un infiltrat inflammatoire discret de type lymphocytaire. cette étude montre que l'activité anti-radicalaire est corrélée avec le taux des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (**Mariod et al., 2009**). En outre, l'extrait de *T.hirsuta* peut avoir un effet correcteur sur la néphrotoxicité, en réduisant les concentrations sériques de marqueurs rénaux et la peroxydation des lipides (LPO), par conséquent, cet effet peut être attribué à l'activité de piégeage des radicaux libres. Alors il possède un effet néphroprotecteur grâce à son

pouvoir antioxydant, il a pu restaurer la structure des glomérules et des tubules rénaux. Donc cette plante a pu améliorer désorganisation tissulaire causé par le nickel.

8.2. Effet Ni et HE de *H.articulatum* et *T.hirsuta* sur l'architecture du foie :

Les résultats obtenus après l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau hépatique chez les rats intoxiqués par NiSO₄ ont permis d'observer une nécrose et le parenchyme hépatique siège d'un gonflement avec un infiltrat inflammatoire, d'une ballonnisation des hépatocytes et de vacuoles lipidiques au sein des hépatocytes réalisant des foyers de stéatose comparé aux rats témoins. Des études récentes sur des rats par **Das et al à 2006** ont révélé un effet dégénératif induit par le sulfate de nickel sur le tissu hépatique. Ils ont observé qu'après l'injection intrapéritonéale de sulfate de nickel, l'architecture hépatique normale était fortement altérée, ainsi que l'apparition d'un cytoplasme vacuolé (foie gras), de noyaux excentriques et d'une hypertrophie des cellules de Kupffer.

La vacuolisation des hépatocytes peut être due à la rétention de liquide à l'intérieur de la cellule entraînant ce qu'on appelle une dégénérescence hydrophile, un gonflement cellulaire probablement dû à la réduction de l'apport énergétique nécessaire à la régulation de la concentration ionique des cellules, à une anoxie légère ou à court terme, ou stress métabolique (**Hedau et al., 2017 ; Emam et al., 2018**). De même, la nécrose des hépatocytes, qui attribuent une perméabilité accrue de la membrane cellulaire entraînant la libération de transaminases dans le sang.

Cependant, les lots intoxiqués au nickel et traités par huile essentielle de *Haloxylon articulatum* ont montré la présence modérée de quelques foyers d'inflammation. De même, aucune nécrose ni de lésions épithéliales n'est observé. Tandis que, **Kharchoufa et al en 2020** ont montré que Les rats traités de manière subaiguë avec 500 mg/kg d'extrait de HS n'ont causé aucun effet indésirable sur l'histoarchitecture des hépatocytes. En revanche, les coupes de foies prélevées dans le groupe traité par HS (1000 mg/kg) ont montré des changements histologiques, tels qu'une dilatation modérée des sinusoides, une légère désorganisation des cordons hépatiques, une stéatose et des hépatocytes tandis que certaines cellules binucléées. En outre, l'administration subaiguë d'extrait de HS à la dose la plus élevée (2 mg/kg) pendant 30 jours a provoqué une altération significative de l'histoarchitecture des rats traités, montrant une veine centrale dilatée et congestionnée, une légère désorganisation des cordons hépatiques et des hépatocytes binucléés. Plusieurs études sur les constituants de l'HS ont montré que cette plante est principalement formée d'alcaloïdes (types isoquinoléines), de glycosides, d'esters, d'acides gras et d'autres composés (**Haida et al., 2020**). Deux alcaloïdes (N-éthylisalsoline et carnégine) avaient été précédemment décrits à partir des parties aériennes de *Hammada articulata* ssp. *scoparia* (**Benkrief et al., 1990**).

Une étude approfondie de ce matériel végétal a maintenant conduit à l'isolement de huit alcaloïdes mineurs et d'un flavonoïde. Les alcaloïdes comprennent quatre isoquinoléines (isosalsoline, salsolidine, déhydrosalsolidine et isosalsolidine), une isoquinolone (N-éthylcorydaldine), la tryptamine, la N-oméga-méthyltryptamine et une bêta-carboline (tétrahydroharman).

Dans le même contexte, les animaux qui sont exposés au Ni et traités par HETH a révélé des hépatocytes subissent des signes derégénération : hépatocytes de grande taille binucléés au cytoplasme granuleux. On a observe que l'administration de HE de *T.hirsuta* peut diminuer d'une manière significative le taux sérique de l'ASAT, l'ALAT, Cette régulation des concentrations sériques de marqueurs hépatiques due a une action protectrice des tissus hépatiques qui pourrait s'expliquer par l'effet chélateur et donc antioxydant des composants phénoliques que contient l'HETH, et qui réduit considérablement les radicaux libre générés par l'intoxication qui provoque l'altération cellulaire dans le tissu hépatique.

Conclusion

Conclusion

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet de l'huile essentielle de *Thymélaea hirsuta* et de *Haloxylon articulatum* administrée par la voie intra péritonéale à une dose de 0.1 ml /Kg durant une période de 21 jours chez des rats après exposition aux NiSO₄ (0.2%), l'impact de cette étude sur le fonctionnement érythrocytaire, hépatique et rénale, selon différentes approches expérimentales (eurocomportementales, biochimiques et histologique).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse de l'huile essentielle de *Haloxylon articulatum*, nous a permis de révéler que les composés majoritaires sont des Thymol (14,19%), Alphaterpinène (11,02), β -E-Ocimène (9,64), 1,8-Cineole (8,69), Oleuropine (5,17%), Linalol (5,12%), Delta -3- Carène (4,12).

En plus, Les extraits de ces deux plantes étudiée renferment des teneurs importantes en polyphénols et en flavonoïdes ce qui permet de confirmer les réactions de caractérisation en ce qui concerne la présence de ces molécules dans les extraits des plantes testées.

Le potentiel antioxydant a été déterminé par une méthode de DPPH. Les résultats obtenus ont montrés que les deux extraits testés présentent une activité antioxydante dont la plus importante est enregistrée chez l'extrait de *H. articulatum* avec l'IC₅₀ la plus basse par rapport à celle de *T. hirsuta*.

Par ailleurs, Les résultats obtenus après l'exposition au nickel ont permis d'observer chez les jeunes rats une baisse significative dans le gain corporel par rapport aux témoins, on a également observé une baisse dans le poids des différents organes étudiés (foie, rein et cerveau) ce qui traduit par une perturbation dans leurs fonctionnements respectifs.

De plus, Ce métal a pu modifier le comportement des rats intoxiqués en induisant une hypoactivité locomotrice observé dans le test Open Field Test avec un état de dépression et d'anxiété enregistré dans le test de la nage force et le double compartiment sombre/ clair et un déficit d'apprentissage spatial (test de la piscine de Morris) en comparaison avec le lot témoin.

Tandis que, Le dosage du nickel dans le sang, est un bon indicateur du nickel biologiquement actif et est reflet de l'exposition du mois précédent. Nos résultats montrent une augmentation significative du taux de Ni au niveau sanguin chez les rats intoxiqués. Tandis que, Les rats intoxiqués et qui sont préalablement traités a l'extrait de ces deux plantes testées montre une diminution significative de nickel sanguin comparés aux rats intoxiqués. Alors que, L'huile

essentielle de ces deux plantes étudiée a été plus efficace pour réduire le taux du nickel sanguin, ce qui suggère qu'elles sont douées d'un pouvoir d'huile essentielle de *H.articulatum* et *T.hirsuta* de détoxification.

Au niveau érythrocytaire, Nos résultats montrent que l'exposition au nickel entraîne des anomalies métaboliques (hyper-glycémie, hyper-urémie, hyper-créatinémie, l'augmentation des transaminases (TGO, TGP) et augmentation de bilan lipidique : cholestérol et triglycéride) et des anomalies enzymatiques (augmentation de catalase et SOD, la diminution de l'activité de glutathion peroxydase chez les rats Wistar), ce qui a permis d'augmenter la sensibilité des cellules au stress oxydant.

Au niveau hépatique, nous avons enregistré une augmentation des enzymes TGO et TGP dans le sang, Ce qui s'explique clairement l'effet hépatotoxique du nickel qui est pénétré dans les cellules et à traversé la membrane nucléaire. Ceci à été confirme par l'étude histologique qui montre que le nickel cause des dommages très sévères au niveau des hépatocytes. Ce qui est capable d'induire la mort cellulaire des hépatocytes par nécrose.

D'après aux résultats que nous avons obtenus des analyses biochimiques, qui montrent l'augmentation du taux sanguin de l'urée et créatinine, Ces résultats montrent bien que le Ni agissent sur la filtration glomérulaire et ceci à été confirme par l'étude histologique qui montre que le nickel provoque un nécrose rénale, avec dégénérescence de la capsule de Bowman.

En revanche, l'administration de l'huile essentielle de *T.hirsuta et H.articulatum* a permis d'observer une augmentation dans le gain corporel et poids des organes ainsi une amélioration dans les différents tests neurocomportementaux étudiés et d'autre part, les tests biochimiques montrent une diminution de tous les paramètres analysés y compris glucidique et les paramètres de la fonction rénale et hépatique ainsi une régénération de la capsule de Bowman, des cellules interstitielles et régénération hépatocytaire.

Ceci se traduit par l'effet de l'huile essentielle de ces deux plantes testées par une action protectrice des tissus rénale, hépatiques et comme un régulateur biochimique, (antidépresseur, anxiolytique).

A la lumière de ces résultats trouvés, il serait envisageable d'entreprendre un protocole expérimental plus approfondi portant sur :

-l'évaluation de l'effet curatif des extraits aqueux et méthanolique de *Thymélaea hirsuta* et de *Haloxylon articulatum* Boiss.

- L'évaluation du statut oxydatif suite à une exposition chronique au nickel.

- réalisation une étude sur le stress oxydant au niveau tissulaire.
- Il serait nécessaire de réaliser une nouvelle expérimentation portant sur le mecanismes d'action de T.hirsuta et H.articulatum sur l'amélioration du tissu cérébrale.

Reference
bibliographiques

Reference bibliographiques

A

- Abid, S., A. Lekchiri, H. Mekhfi, A. Ziyat, A. Legssyer, M. Aziz and M. Bnouham, 2014. Inhibition of α - glucosidase and glucose intestinal absorption by *Thymelaea hirsuta* fractions. *Journal of Diabetes*, 6: 351– 359.
- Abou-Karam M., El-Shaer, N.S., Shier, W.T. 1998. Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosine-specific protein kinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. *Phytother. Res*, 12(4): 282-284.
- Abraham GE, Flechas JD. Management of fibromyalgia: rationale for the use of magnesium and malic acid. *J Nutr Med* 1992; 3: 49-59.
- Achour, S, Iken, I et Amarti, A. 2014. L'intoxication au plomb : caractéristiques toxicologiques et clinico-biologiques. [éd.] S Dr Benchekroun. *Toxicologie Maroc*. 2014, 21, pp. 9-12.
- Adli, D. E. H., Kahloula, K., Slimani, M., Brahmi, M., & Benreguieg, M. (2017). Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse. *Phytothérapie*, 1-7.
- AFNOR, 1996. Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p
- AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles*. AFSSAPS, 2008.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for Nickel*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2005. p. 95-107.
- Aharoni, A., Jongasma, M.A. and Bouwmeester, H. J., 2005. Volatile science.
- AICHOUBA Amina, TENNI Saliha. 2014. Activité biologique (Antioxydante) des extraits de l'*Anacyclus valentinus* L. Mémoire de Master en Biologie, spécialité biotechnologie microbienne et sécurité sanitaire, option : Contrôle de qualité des aliments. Faculté SNV, département biologie .université de Mascara.

- Ait hamadouche N. (2009)**, effets de l'exposition chronique au plomb sur le système reproducteur et l'axe hypothalamo-hypophysaire chez le rat mâle wistar. Etude histologique et biochimique
- Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2010)**. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC complementary and alternative medicine*, 10(1), 21.
- Akesson B, Skerfving S.** Exposure in welding of high nickel alloy. *Int Arch Occup Environ Health* 1985; 56 : 111-7.
- Akrouf, A., L.A. Gonzalez, H.J. El Jani and P.C. Madrid, 2011.** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern of Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 342–347.
- Albahary C., Richet G., Guillaume J. and Morel Maroger L. (1965)** - Le rein et le saturnisme professionnel. *Arch Mal Prof*, 26, 5.
- Alghazeer R, El-Saltani H, Saleh N, Al-Najjar A, Hebail F.** Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Nat Sci* 2012;4:324e35.
- Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M., Tabti, B., Ghalem, S. & Benabadji, N. (2008)**. Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 2701-2710.
- Alverson, W.S., Karol, K.G., Baum, D.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., McCourt, R., Sytsma, K.J. 1998.** Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae: Evidence from *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot*, 85: 876-887.
- Amari NO, Bouzouina M, Berkani A, Lotmani B.** Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pac J Trop Dis* 2014; 4(2): 104-109.
- Amari, N.O., 2015.** Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité antifongique de *Thymelaea hirsuta* (Cas des dermatophytes), thèse de doctorat, Univ. Mostaganem, Algérie.
- Ambrose AM, Larson PS, Borzelleca JF & Hennigar GR (1976)** 'Long term toxicologic assessment of nickel in rats and dogs'. *J Food Sci Technol* 13:181-187.
- American Biogenics Corporation (ABC).** Ninety day gavage study in albino rats using nickel. Final report submitted to U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste. Study 410-2520. Submitted by Research Triangle Institute and American Biogenics Corporation, NY, 1988.

-Andre, C. M., Oufir, M., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Rogez, H., Larondelle, Y., & Evers, D. (2009). Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6), 517-524

-Anonyme. 2005. *Thymelaea hirsuta*. Paris: tela-botanica.

-APG (Angiosperm Phylogeny Group), 1998. An update of the angiosperm Phylogeny Group.

-Arrouijal FZ, Marzin D, Hildebrand HF, Pestel J, Haguenoer JM. Differences in genotoxic activity of alpha-Ni3S2 on human-lymphocytes from nickel-hypersensitized and nickel-unsensitized donors. *Mutagenesis* 1992;7:183–7.

-ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for nickel. Atlanta, GA, USA: ATSDR/U.S. Public Health Service, ATSDR/TP-88/19, 2003.

-Awde. S. 2014. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse : Relation entre proteolyse hépatique et qualités technologiques et sensorielles du foie gras de canard. 202 pages. -<https://www.oeil.nc/sites/default/files/pdf/FICHES%20DESC/2-20NICKEL/OEIL%20-%20FICHE%20NICKEL%20GP.pdf>. Date de dernière mise à jour : janvier 2015.

-Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine. p35-39, 40, 47.

-Azaizeh H., Fulder S., Khalil K., Said O., 2003. Ethnobotanical knowledge of local Arab practitioners in the Middle Eastern region. *8T18TP:18T19T748T19T:98–108*

-Azza Z and Oudghiri M (2015). *In vivo* anti-inflammatory and antiarthritic activities of aqueous extracts from *Thymelaeahirsuta*. *Pharmacognosy Res.*, 7(2): 213-216.

-Azza Z, Marnissi F, Naya A, Benjelloun N, Zamiyati S, Amrani M, et al. Toxicological evaluation of *Thymelaea hirsuta* and protective effect against CCl4-induced hepatic injury in rats. *Int J Biol Chem Sci* 2012;6:379-93.

B

-Baba, K., Takeuchi, K., Kozawa, M. 1987. Chemical study on the constituents of the *Thymelaeaceae* plants – V. Structure of a new biflavonoid,

daphnodorin from the root of *Daphne odora* Thunb. *YakugakuZasshi*, 107 : 863-868.

-**Badiaga, M. (2011)**. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.

-**Batanoumy, K. 2005**. *Thymelaea hirsuta* (L.) end. Thymelaeaceae. A guide to medicinal plant in northafrica .publié par *ilucn international malaga*, spain.

-**Beddou F.2014**.Etude phytochimique et activité biologique de deux plantes médicinales sahariennes *remex vesicaruis L* et *Anvilia radiatacoss* et *Dur* .These de doctorat d'état, université Abou Baker Belkaide, Tlemcen, 144p.

-**BELHADJ-TAHAR.S.2018**. Caractérisation structurale de quelques métabolites secondaires issus de quelques plantes de la famille 'Amarantaceaes ' du Sahara septentrional. Thèse de Doctorat de l'université **KASDI MERBAH - OUARGLA**

-**Bellakhdar, J. (1997)**.La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires-Saint-Etienne, Edit. Ibis Press.

-**Ben Amara, I., Troudi, A., Garoui, E.M., Hakim, A., Boudawara, T., Zeghal, K.M., Zeghal, N. 2011**. Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63. 553-561

-**Ben Salah H., Jarraya R., Martin M-T., Veitch N. C., Grayer R. J., Simmonds M. S. J et Damak M. 2002**. Flavonol Triglycosides from the Leaves of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50 (9), 1268-1270.

-**Benabid, N.; Mesfioui, A.; Ouichou, A**. Effects of photoperiod regimen on emotional behaviour in two tests for anxiolytic activity in Wistar rat. *Brain Res. Bull.* **2008**, 75, 53–59.

-**Bencko V., Wagner V., Wagnerova M. and Reichrtova E. (1983)** - Immuno-biochemical findings in groups of individuals occupationally and non-occupationally exposed to emissions containing nickel and cobalt. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 27, 4, 387-394.

-**Bencko V, Wagner V, Wagnerovǎ M, Zavǎzal V**. Human exposure to nickel and cobalt: biological monitoring and immunobiological response. *Environ Res* 1986;40:399–410.

-**Beniston, W. S. 1984**. Fleurs d'Algérie. Alger : Edition Entreprise Nationale du livre.

- Benkrief M, Brum-Bousquet F, Tillequin et M. Koch 1990**, Ann. Harmaceutiques francaises 48, (4): 219-224.
- Benkrief.R, Brum-Bousquet.M, Tillequin.F, and Koch.M**, “Alkaloids and flavonoid from aerial parts of Hammada articulata ssp. scoparia,” Annales Pharmaceutiques Francaises, vol. 48, no. 4, pp. 219–224, 1990.
- Benson JM, Burt DG, & Carpenter RL (1988)** 'Comparative inhalation toxicity of nickel sulfate to F344/N rats and B6C3F1 mice exposed for twelve days'. Fundam Appl Toxicol 10:164-178.
- Berkiks, I., Mesfioui, A., Kribii, A., Ouichou, A., Benazzouz, B. and El Hessni, A. (2014)** Evaluation of Acute Toxicity and Sedative Effects of Ethylic Extract of Thymelaea lythroides in Wistar Rats. *Journal of Behavioral and Brain Science*, **4**, 120-128.
- Bernadet M., 2000**. Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles.
- Benaissa, O. (2011)**. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
- Benarous, K. (2009)**. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes: a amylase, trypsine et lipase ; université Amar Telidji Laghouat, Mémoire de fin d'étude d'Ingénieur d'état en génie biologique.
- Benayad N., 2008**. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.
- Bisson A. (2012)**. Manganèse et ses dérivés. INERIS-fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques 2:5-30.
- Bnouham, M., F.Z. Merthfour, A. Legsser, H. Mekhfi, S. Maâllem and A. Ziyat, 2007**. Antihyperglycemic activity of *Arbustus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. Pharmazie, 62 (8):630–2.
- Bnouham, M., W. Benalla, S. Bellahcen, Z. Hakkou, A. Ziyat, H. Mekhfi, M. Aziz and A. Legssyer, 2012**. Antidiabetic and antihypertensive effect of a polyphenolrich fraction of *Thymelaea hirsuta* L. in a model of neonatal streptozotocin-diabetic and NG-nitro-l-argininemethyl ester-hypertensive rats. *Journal of Diabetes*, 4: 307–313.

- BOLWER, P.G., BRAMLEY, P.M., MILLER, N. J., RICE-EVANS, C.A., et RIDHAM, J.B. (1995):** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, 22, 375-3.83.
- Booth, N.L., Dejan, N., Richard, B., Stoci, E. (2004).** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. p50, 120-123.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. p1217, 7972–7980.
- Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A. 1988.** Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the *Thymelaeaceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 24 : 41-49pp.
- Boubrit S, Boussad N, 2007.** Détermination "in vitro" du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clou de girofle et sarriette, et leurs applications à la conservation de la viande hachée. Ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses. Université de Mouloud Mammeri de Tizi –ouzou.
- BOUDET A. M. 2000.** L'usine chimique. 9ème conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16.
- Bouguerra, A. (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill.
- BOUHADJRA Keltoum. 2005.** contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Boukef M. K., 1986.** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de Coopération Culturelle et Technique. p. 82-83.
- Bourin, M., Hascoët, M. (2003).** Le test de la souris sur les zones sombres / claires. *European Journal of Pharmacology* , 463 (1-3), 55-65.
- Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., & Chaouch, A. (2007).** Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 3(2).

- Bourogaa, E., Bertrand, J., Despeaux, M., Jarraya, R., Fabre, N., Payrastre, L., El Feki, A. (2011).** Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leukemia research*, 35(8), 1093-1101.
- Bourogaa, E., Jarraya, R. M., Nciri, R., Damak, M. & Elfeki, A. (2014).** Protective effects of aqueous extract of Hammada scoparia against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. *Toxicology And Industrial Health*, 30 (2), 113–22.
- Bourogaa, E., Nciri, R., Mezghani-Jarraya, R., Racaud-Sultan, C., Damak, M. & El Feki, A. (2013).** Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Hammada scoparia against ethanol-induced liver injury in rats. *Journal Of Physiology And Biochemistry*, 69(2), 227-237.
- Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ.** Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun* 2008 ; 22, 105–13.
- Bremness L (1998) :** Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- Brian, M.L.** The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), 1995, 57-148.
- Brooks, G.E. and Evans, F.J. (1990)** Toxic Hazards of Plants from the Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In: Rizk, A.M., Ed., *Poisonous Plant Contamination of Edible Plants*, CRC Press, Boca Raton, 27-63.
- Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F.J., Rizk, A.F.M., Hammouda, F.M., El- Missiry, M.M., Ismail, S.E. 1990.** Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 29 (7) : 2235-2237pp.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. 2ième éd. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris, France. 915p.
- BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, édition, Tec et Doc. Paris, pp783-785.
- Bruneton, J. 1999.** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p1120.
- Brunmark P.** *Methods for assessment of exposure to aromatic amines/lisocyanates by air monitoring and biomarkers* 1995. [PhD Thesis]. University of Lund, Sweden.

-Bssaibis, F., Gmir, N., et Meziane M. (2009). Activité antibactérienne de *Dittrichiaviscosa* (L.) W, Greuter. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn*, 3(1), 44- 55.

-Burrows GE, Tyrl RJ, Edwards WC. Toxic plants of Oklahoma – thornapples and nightshades. *J Okla Vet Med Assoc* 1981;23:106–9.

C

-Calvet C. (2012) ; Quelques définitions pour mieux comprendre les Huiles Essentielles (HE).p 1/11

-Cameron, K.S, Buchner,V et Tchounwou, P.B. (2011). Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review, *Rev Environ Health*, 26: 81-92.

-Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MC, Kodavanti UP, Evansky PA, Costa DL, et al. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol Sci* 2001;64:243–52.

-Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. 2013a. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.

-Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003 ; 463, 235-272

-Cempel, M., & Janicka, K. (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat organs after oral administration of nickel (ii) chloride. *Biological Trace Element Research*, 90(1-3), 215–226. doi:10.1385/bter:90:1-3:215

-Cempel, M., Nikel, G. (2006). Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology, *Polish J. of Environ. Stud*, 15(3) : 375-382.

-Chakrabarti SK, Bai C. Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1501–10.

-Chao, H. C., Najjaa, H., Villareal, M. O., Ksouri, R., Han, J., Neffati, M. & Isoda, H. (2013). *Arthrophytum scoparium* inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in b16 melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 22(2), 131-136.

- Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Ksouri, R., & Atik-Bekkara, F. (2014).** Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77(6), 302-307.)
- Chashschin VP, Artunina GP, Norseth T.** Congenital defects, abortion and other health effects in nickel refinery workers. *Sci Total Environ* 1994; 148 : 287-91.
- Chemat F.** Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, - Dehradun, 311 pages. ISBN : 978-81-905771-3-7, 2009.
- Chen, C.Y., Huang, Y.F., Lin, Y.H., & Yen, S.F. (2003).** Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Archives of Toxicology* 2003(77) ,123-30.
- Chen, J., Mangelinckx, S., Adams, A., Wang, Z., Li, W. & De Kimpe, N. (2015).** Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Natural product communications*, 10(1),187-200.
- Chin B, Tobes MC, Han SS.** Absorption of 4,4'methylenebis (2-chloroaniline) by human skin. *Environ Res* 1983;32:167-78.
- Clapp DE, Piacitelli GM, Zaebs DD, Ward E.** Assessing exposure to 4,4'methylenebis-(2-chloroaniline) (MbOCA) in the workplace. *Applied Occup Environ Hyg* 1991 ;6: 125-30.
- Clarke S., 2008.** Chemistry of essential oil. 1st edition ELSEVIER. British, 302p.
- Clemons G, Garcia JF.** Neuroendocrine effects of acute nickel chloride administration in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 61 : 343-8.
- Cohen S, Hamrick N.** Stable individual differences in physiological response to stressors: implications of stress elicited changes in immune related health. *Brain Behav Immun* 2003 ; 17, 407-14.
- COOK M.C. ct SAMMAN S. (1996)** Flavonoids chemistry, Metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem*, 7.
- Cornara, L.B., Borghesi, Caporali, E., Casazza, G., Roccotiello, E., Troiano, G and Minuto, L. 2005.** Floral features and reproductive ecology in *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Plant systematics and evolution*,250(3-4): p157-172.
- Cornell RG, Landis JR.** Mortality patterns among nickel/chromium alloy foundry workers. In: Sunderman Jr FW, Aitio A, Berlin A, editors. Nickel in the human environment. IARC scientific publication no. 53. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1984:87-93.

-**Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. Thèse Présentée Par Mme Belyagoubi Née Benhammou Nabila.

-**Cuvier, F.G. 1825.** Dictionnaire des sciences naturelles. Tome trente-huitième, F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg, p34.

D

-**Dahlgren, R., Thorne, R.F. 1984.** The order Myrtales : circumscription, variation and relationships. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **71** : 633-699.

-**Daldrup T, Haarhoff K, Szathmary SC.** Toedliche nickel sulfaye-intoxikation. *Berichte zur Serichtlichen Medizin* 1983; *41* : 141-4.

-**Das KK, Dasgupta S.** Alteration of testicular biochemistry during protein restriction in nickel treated rats. *Biol Trace Elem Res* 1997;60:243–9.

-**Das KK, Dasgupta S.** Studies on the role of nickel in the metabolism of ascorbic acid and cholesterol in experimental animal. *Ind J Physiol Allied Sci* 1998;52:58–62.

-**Das KK, Dasgupta S.** Effect of nickel sulfate on testicular steroidogenesis in rats during protein restriction. *Environ Health Perspect* 2002;110:923–6.

-**Das, K. K., Gupta, A. D., Dhundasi, S. A., Patil, A. M., Das, S. N., & Ambekar, J. G. (2006).** Effect of l-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *17(1)*, 29-44. doi : 10.1515/jbcpp.2006.17.1.29

-**Das, K.K., & Dasgupta, S. (2006).** Studies on the role of nickel in the metabolism of ascorbic acid and cholesterol in experimental animals. *Indian Journal of Physiology and Allied Sciences* , 1998 (52) , 58-62.

-**Das KK, Buchner V.** Effect of nickel exposure on peripheral tissues: role of oxidative stress in toxicity and possible protection by ascorbic acid. *Rev Environ Health* 2007;22: 133–49.

-**Das, K. K., Das Gupta, A., Dhundasi, S. a ., Patil, A.M., Das, S.N., et Ambekar, J.G. (2007).** Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate. *Biometals , An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *20(2)*, 177– 84.

- Das, K. K., Das, S. N., & Dhundasi, S. a. (2008).** Nickel, its adverse health effects & oxidative stress, *The Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 412–25.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA.** Nickel: molecular diversity, application, essentiality and toxicity in human health. In: Blanc G, Moreau D, editors. *Biometals: molecular structures, binding properties and applications*. New York, NY: Nova Science Publishers, 2010:33–58.
- Das NP, Ratty AK, (1986).** *Plants Favonoids in Biology and Medicine; Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationship.* (V. Cody, E. Middleton, J. Harborne, Eds.) A.R. Liss, New York, 243-247.
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., Lekeux1, P. (2005).** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vét.* 149, 1- 9.
- **Dearman RJ, Kimber I.** Divergent immune responses to respiratory and contact chemical allergens: antibody elicited by phthalic anhydride and oxazolone. *Clin Exp Allergy* 1992;22:241–50.
- Debray, M., Jacquemin, H., & Razafindrambao, R. (1971).** Contribution to the inventory of medicinal plants of Madagascar.
- Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p.
- Denkhaus, E et Salnokow, K. (2002).** Nickel essentiality, toxicity and carcinogenicity, *CRC CR Rev Oncol-Hem*, 42:35-56.
- DERAMCHIA .N. 2018.** Activite antimicrobienne de l’huile essentielle et extraits brutes de *Thymelaea hirsuta*. Thèse de doctorat de L’universite Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem.
- Desmares C., Laurent A. & Delerme C., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.
- Diagomanolin, V., Farhang, M., Ghazi-Khan-Sari, M., Jafarzadeh N.** Heavy metals (Ni, Cr, Cu) in the karoon waterway river, Iran, *Toxicol. Let*, 151 (1), 63, 2004.
- Dieter M.P., Jameson C.W., Tucker A.N. et al. (1988).** Evaluation of tissue disposition, myelopoietic, and immunologic responses in mice after long-term exposure to nickel sulfate in the drinking water. *J. Toxicol. Environ. Health.* 24(3): 357-72.

- Diwan BA, Kasprzak KS, Rice JM.** Transplacental carcinogenic effects of nickel(II) acetate in the renal cortex, renal pelvis and adenohypophysis in F344/NCr rats. *Carcinogenesis* 1992;13:1351–7.
- Djeridane AYousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D,Stocker P and Vidal N (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97: 654-660.
- Djeridane, A., Yousfi,M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006.** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A et Gmira, N. 2003.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, (142) : pp61-78.
- Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bulletin- Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
- Dommeé, B., Denelle, N., Rioux, J.A. 1984.** Proportions des sexes dans deux populations françaises de *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Journal de Lettres botaniques*.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, c. and Courot, E.(2009)** Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganismes . *Trends biotechnol.* 27, 706-13.
- Dostal L.A., Hopfer S.M., Lin S.M. and Sunderman F.W. (1989)** - Effects of nickel chloride on lactating rats and their suckling pups, and the transfer of nickel through rat milk. *Toxicol Appl Pharmacol*, 101, 2, 220-231.
- Dreyfus CF.** Neurotransmitters and neurotrophins collaborate to influence brain development. *Perspect Dev Neurobiol* 1998;5:389—99.
- Dunnick J.K., Elwell M.R., Benson J.M., Hobbs C.H., Hahn F.F., Haly P.J., Cheng Y.S. and Eidson A.F. (1989)** - Lung toxicity after 13-week inhalation exposure to nickel oxide, nickel subsulfide, or nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 12, 3, 584-594.

-Dunnick JK, Benson JM, Hobbs CH, Hahn FF, Cheng YS & Eidson AF (1988) 'Comparative Toxicity of Nickel Oxide, Nickel Sulfate Hexahydrate, and Nickel Subsulfide after 12 Days of Inhalation Exposure to F344/N Rats and B6C3F1 Mice'. *Toxicology* 12: 145-156.

-Duval Laurent. Les huiles essentielles _a l'o_cine. Pharmaceutical sciences. 2012. <dumas-00713158>

E

-Ebert D, Haller RG, Walton ME. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci* 2003;23:5928—35.

-Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.-L. & Jouad, H. (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal Of Ethnopharmacology*,82(2), 97-103.

-Eichhorn GL. In: Eichhorn GL, editor. *Inorganic biochemistry*. Elsevier; 1975. p. 1210—43.

-El Amrani, F., A. Rhallab, T. Alaoui, K. El Badaouiet S. Chakir, 2009. Hypoglycaemic effect of *Thymelaea hirsute* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 625- 629.

-El Haci ; Ilias, F., Bensehaila, S., Medjdoub, K., , I., & Gaouar-Benyelles, N. (2015). The role of phenolic compounds in the defense of sooty mold of olive leaves (*Olea europea* L.). *African Journal of Microbiology Research*, 9(15), 1075-1081.

-El-Beheiry, M.A.H. 2000. Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. *Bull. Fac. Sci, Assiut Univ., D: Botany* 29 (1): p375-383.

-El-Elaimy, A., & El-Nabi, S.E.H. (1990). Influence of thiola on pesticide induced intoxication. II-preventive effect of liver damage. *Journal of Environmental Sciences.* 1, 67-82.

-El-Nekeety, A.A., El-Kady, A.A., Soliman, M.S., Hassan, N.S., Abdel-Wahhab,M.A., 2009. **Protective** effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-inducedoxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47. 2209–2215

- El-Shazly, A. & Wink, M. (2003).** Tetrahydroisoquinoline and β -carboline alkaloids from *Haloxylon articulatum* (Cav.) Bunge (Chenopodiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C*, 58,477-480.
- El-Shazly, A. & Wink, M. (2003).** Tetrahydroisoquinoline and β -carboline alkaloids from *Haloxylon articulatum* (Cav.) Bunge (Chenopodiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C*, 58,477-480.
- Emam, H., Ahmed, E., & Abdel-Daim, M. (2018).** Antioxidant capacity of omega-3-fatty acids and vitamin E against imidacloprid-induced hepatotoxicity in Japanese quails. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(12), 11694-11702.
- Emberger L., 1960.** Traité de botanique systématique : Les végétaux vasculaires. II. Masson et cie, ed., Paris, p. 441-862
- Enterline PE, Marsh GM.** Mortality among workers in a nickel refinery and alloy plant in West Virginia. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68 : 925-33.
- EPA (US Environmental Protection Agency).** *Drinking water criteria document for nickel*. NTIS PB86-117801. Cincinnati, OH: Environmental Criteria and Assessment Office, U.S. Environmental Protection Agency; 1985.
- Erdtman, G. 1952.** Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms. *Chronica Botanica Co.* Waltham, MA, pp.431-433.
- EU (2004)** *Nickel sulphate risk assessment. Draft, May 2004.* Prepared by the Danish Environmental Protection Agency for the European Union.

F

- Farmer PB, Rickard J, Robertson S.** The metabolism and distribution of 4,4'-methylenebis (2-chloroaniline) (MbOCA) in rats. *J Appl Toxicol* 1981; 1 :317-22.
- Fasla.B.(2009),** Évaluation du potentiel antimutogène et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Pp : 21-172. Thèse de magistère. Université d'Oran Es'Sénia.
- Fernandez ME, Alfonso J, Brocco MA, Frasc AC.** Conserved cellular function and stress-mediated regulation among members of the proteolipid protein family. *J Neurosci Res* 2010 ; 88:1298–308.

- FERNYHOUGH, A., OSMAN A.M., WONG K.K.Y. (2006)** : ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, 321—329.
- Ferrari, J. 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Thèse de doctorat. Ex A. Rich. Université de Lausanne, pp9, 17, 27, 42, 48, 158, 182.
- Figoni R, Treagan L.** Inhibition effect of nickel and chromium upon antibody response of rats to immunization with T-1 phage. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975;12:335–8.
- Florent, D.G. (2011).** Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum corse-sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*. Thèse de doctorat en chimie. Université de Corse- Pascal Paoli. France
- Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M. (2001).** The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteer rsun dersimulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, p39, 153-162.
- Fossati P, Prencipe, L. .** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.* 1982;28, 2077–2080.
- Franchomme, P.; Pénéol, D. 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- FRANÇOIS-NSEMI Muanda. 2010.** Identification Des Polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat université de Paul-Verlain Metz. France.
- Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, et al.** Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009 ; 12:134–43.

- Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, A. 1980a.** Thymeleaceae photochemistry. I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsute* L. leaves. *Anales Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim*, 76 (1) : p94-95.
- Garnéro J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques ; K 345-1, 39p.
- Gavazzo P, Guida P, Zanardi I, Marchetti C.** Molecular determinants of multiple effects of nickel on NMDA receptor channels. *Neurotox Res* 2009;15:38—48.
- Gavazzo P, Tedesco M, Chiappalone M, Zanardi I, Marchetti C.** Nickel modulates the electrical activity of cultured cortical neurons through a specific effect on N-methyl-D Aspartate receptor channels. *Neuroscience* 2011;177:43—55.
- Georges Sens-Olive. (1979)** : Les huiles essentielles – généralités et définitions, dans traité de phytothérapie et d'aromathérapie, éd. Maloine , p.141-142.
- Gerard D.et Francois C.2009.** Petite Larousse des plantes médicinales. ED., Paris,p :297.
- Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.M. 1970.** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. *U. Arab Rep. J. Pharm. Sci.* 11 (1): p101-106.
- GHOUL.K, ZEGHMAR.S. 2019.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des plantes *Mentha pulegium* L et *Thymelaea hirsuta* Endel. Thèse de Master en chimie. Université Larbi Ben M'Hidi Oum El-Bouaghi.
- Goyer R.** Toxic effects of metals. In: Amdur MO, Doull JD, Klaassen CD, editors. *Casarett and Doull's toxicology*, 4th ed. New York: Pergamon Press; 1991. p. 623-80.
- Graham JA, Miller FJ, Daniels MJ, Payne EA, Gardner DE.** Influence of cadmium, nickel and chromium on primary immunity in mice. *Environ Res* 1978;16:77–87.
- Guba, R. (2001).** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential, *International Journal of Aromatherapy*, 11, 76-83.
- Gupta AD, Das SN, Dhundasi SA, Das KK.** Effect of garlic (*Allium sativum*) on heavy metal (nickel II and chromium VI) induced alteration of serum lipid profile in male albino rats. *Int J Environ Res Public Health* 2008;5:147–51.

-**Gupta AD, Dhundasi SA, Ambekar JG, Das KK.** Effect of Lascorbic acid on antioxidant defense system in testes of albino rats exposed to nickel sulphate. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2007; 18 : 87-95.

-**Guyader.D,** Sémiologie biologique hépatique, Septembre 2005.

H

-**Haber, L.T., Erdreicht L., Diamond, G.L., Maier, A.M., Ratney, R., Zhao, Q.,Dourson, M.L.** Hazard Identification And Dose Response Of Inhaled Nickel-Soluble Salts, *Regul, Toxicol. Pharmacol*, 31, 210, 2000.

-**Habibtani.S, (2005),** thèse de magistère, étude phytochimique et pharmacologique des algues rouges de l'espèce *Jania rubens* pp. 61-62.

-**Haida, S., A. Kribii,A., Kribii,A., 2020.** Chemical composition, phenolic content and antioxidant capacity of Haloxylon scoparium extracts. *South African Journal of Botany* 131 (2020) 151_160. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.037>

-**Halder S, A K Mehta, R Kar, M Mustafa, P K Mediratta, K K Sharma (2011).** Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. *Planta Med* ; 77: 830–834.

- **Haley PJ, Shopp GM, Benson JM, Cheng YS, Bice DE, Luster MI, Dunnick JK & Hobbs CH (1990)** 'The Immunotoxicity of Three Nickel Compounds Following 13-week Inhalation Exposure in the Mouse'. *Fund. Appl. Toxicol*15:476-487.

-**HALOUI. M (2014).**Etude du dysfonctionnement neurobiologique et physiologique suite au stress de contention chez les rattes Wistar et leur progéniture, thèse de doctorat du l' Université Badji-Mokhtar-Annaba.

-**HARBORNE J.B. 1980.** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology, New series, vol 8, 329-402.

-**Hartmann, T. (1991).** Alcaloids . In *Herbivors : Their Interactions WithSecondary Plant Metabolites I : The Chemical Participants*, ed. GA Rosenthal, MR Berenbaum, pp. 79-121. San Diego: Academic.

-**Hathaway K, Clark AE.** *Magnetostrictive materials*. Warrendale, PA, USA: Materials Research Society; 1993. p. 34-41.

- He, M.D., Xu, S.C., Zhang, X., Wang, Y., Xiong, J.C., Zhang, X., Lu, X.L., Zhang, L., Yu, Z.P., & Zhou, Z. (2013). Disturbance of aerobic metabolism accompanies neurobehavioral changes induced by nickel in mice. *NeuroToxicology*, 38, 9–16.
- He, W., Cik, M., Appendino, G., Puyvelde, L.V., Leysen, J.E., Kimpe, N.D. 2002. Daphnane-type diterpenes orthoesters and their biological activities. *Med Chem*, 2 : 185–200.
- Hedau, M., Wankhede, V., & Wade, M. (2018). Effect of *Butea monosperma* feeding in ameliorating the toxicity of imidacloprid in liver in Japanese quails. *Indian Journal of Animal Research*, 52(12), 1766-1769.
- Hegnauer, R. 1973. *Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 6*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Heining, K.H. 1951. Studies on the floral morphology of the Thymelaeaceae. *Am. J. Bot.* 38 : pp113-132.
- Herbada, D. G. 2006. Origin and diversification of Thymelaea (Thymelaeaceae): inferences from a phylogenetic study based on ITS (rDNA) sequences. *plant systematics and evolution*, 257: 159–187.
- Heywood, V.H., 1996, *Les Plantes à Fleurs*. Editions Nathan, Paris, pp.159-160.
- Hfaïedh, N., Allagui, M.S., Croute, F., Soleilhavoup, J.P., Guermazi, F., Kammoun, A., El feki, A. (2004). Interactions d'une restriction calorique avec les effets du Nickel sur la reproduction chez le rat, *Andrologie* . 14, 443-451.
- Hfaïedh, N., Allaqui, M.S., Croute, F., Soleilhavoup, J.P., Jammoussi, K., Makni Ayadi, F., Kammoun, A. & El Feki, A. (2008). Interaction du jeûne intermittent sur les effets cytotoxiques rénaux du nickel chez le rat pubère. *Comptes Rendus Biologies*, 328(7), 648–660. doi : 10.1016/j.crv.2005.03.001
- Himmerich, H., Kaufmann, C., Schuld, A., Pollmacher, T. 2005. Elevation of liver enzyme levels during psychopharmacological treatment is associated with weight gain, *Journal of Psychiatric Research*. 39: 35-42
- Hocine, L. (2011). Détermination des marqueurs du stress oxydatif chez la progéniture de rats « Wistar » obèses sous régime hypergras. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en

agronomie. Faculte des sciences de la nature et de la vie et dessciences, Universite Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie.

-Hostynek JJ. Sensitization to nickel: etiology, epidemiology, immune reactions, prevention, and therapy. *Rev Environ Health* 2006;21:253–80.

-Hotchkiss SAM, Hewitt P, Caldwell J. Percutaneous absorption of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) and 4,4'-methylenedianiline through rat and human skin in vitro. *Toxicol in vitro* 1993;7:141-8.

- Huang X, Zhuang Zx, Frenkel K, Klein Cb& osta M (1994) 'Role of nickel and nickelmediated reactive oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis'. *Environ Health Perspect* 02: 281-284.

I

-IARC (1990) Nickel and nickel compounds. In: *Chromium, nickel and welding*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 257–445 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49).

-INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques). (2005). Nickel et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.

-International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding vol 49; Lyon: IARC Scientific Publications, Lion, France 1990. pp. 257–445.

- International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man (ICNC). Report of the International Committee on Nickel Carcinogenesis in Man. *Scand J Work Environ Health* 1990;16:1–82.

-IPCS (1991) *Nickel*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 108).

-ISERIN P, MASSON M et RESTELLINI J P. 2007. Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14.

-Iserin. P. Encyclopédie des plantes médicinales , identification, préparation ,soins.2nd Edition ,Copyright 1996,2001 Dorling kindersiey Limited ,Londres ;Text copyright 1996,2001Andrew Chevallier ; ISBN :2-03-560252-1.

-Ismail, S.I. 1978. Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV.

-Ismaili Alaoui, M. et Bendjilali, B. 1^{er} Séminaire Magrebin sur les plantes aromatiques, Tlemcen le 29-31Mai, 1990.

- Itoi K. Ablation of the central noradrenergic neurons for unraveling their roles in stress and anxiety. Ann N Y Acad Sci 2008 ; 1129, 47-54.

J

-Jacobsen N, Alfheim I, Jonsen J (1978) 'Nickel and strontium distribution in some mouse tissues. Passage through placenta and mammary glands'. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 20 (3):571-84.

-Jaffer, H., Mahmud, M., Jawad, A., Naji, A., & AL-Naib, A. (1983). Phytochemical and biological screening of some Iraqi plan Fitoterapia Lix 299.

-Jeanmonod, D., Gamisans, J. 2007. *Flora Corsica*, Edisud.

-JUDD Walter S, Campbell Christopher S, Kellogg Elizabeth A, Stevens Peter, 2002. Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université ,84-87 ,396-399.

-Judd, W. S., Campbell, C.S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. and. Donoghue, E. M. J. 2002. Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

-Judpentiene, A and D. Mockute, 2004. Chemical composition of essential oils of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) growing wild in Vilnius. Chemija, 15(4): 64-68.

K

-K. Hostettmann, M. Hostettmann, and A. Marston, (1986), Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation, Springer-Verlag, Berlin.

-Kadota I, Kurita M. Hyperglycemia and islet cell damage caused by nickel chloride. Metabolism 1955;4:337-42.

- **Kadri A, Zarai Z, Ben Chobba I, Gharsallah N, Damak M and Bekir A (2011)**. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil from Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(15):2930-2935.
- Kahloula, K., Adli, D. E., Slimani, M. (2017)**. Le précis des techniques neurocomportementales du petit rongeur. Éditions universitaires européennes.
- Kahloula, K., Adli, D. E. H., Slimani, M., Terras, H., & Achour, S. (2014)**. Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocomportementales chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 26(4), 186-192.
- **Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, et al.** A molecular determinant of nickel inhibition in Cav 3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2006;281:4823—30.
- Kang HW, Moon HJ, Joo SH, Lee JH.** Histidine residues in the IS3-IS4 loop are critical for nickel-sensitive inhibition of the Cav 3.2 calcium channel. *FEBS Lett* 2007;581:5774—80.
- Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Fazâa S.** Effets métaboliques et endocriniens de la privation hydrique et/ou alimentaire chez le rat. *C R Biol* 2005;328:463—70.
- Kasprzak K, Gabryel P, Jarezevska K.** Nickel toxicology. *Proc Int Conference* 1980; 2 : 59-62.
- Kawano M, Matsuyama K, Miyamae Y, Shinmoto H, Kchouk ME, Morio T, Shigemori H and Isoda H (2007)**. Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Exp. Dermatol.*, 16(12): 977-984.
- Kawano, M., K. Matsuyama, Y. Miyamae, H. Shinmoto, M.E.Kchouk, T. Mario, H. Shigemori and H. Isoda, 2007.** Effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 16: 977-982.
- Kerboub H. (2017)**. Valorisation de certaines plantes sauvages : *Thymelaea hirsuta* Endl. (Metnane) et *Haloxylon scoparium* Pomel.(Remt). Bio-activité et Caractérisation des Composés Phénoliques. Thèse de Magister. Université Mustapha Stambouli Mascara.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N., 2004.** Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation Methods. *Food Chemistry*. 86: 587-591.

-Kharchoufa L, Bouhrim M, Bencheikh N, El Assri S, Amirou A, Yamani A, Choukri M, Mekhfi H, Elachouri M. Acute and Subacute Toxicity Studies of the Aqueous Extract from *Haloxylon scoparium* Pomel (*Hammada scoparia* (Pomel)) by Oral Administration in Rodents. *BioMed Research International*. 2020. 11 page.

-KIM, D-O., LEE, C.Y et SEUNG, W. J. (2003): Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81, 321-326.

Klas N. Biological effects of mercuric chloride. nickel sulphate and nickel chloride. *Pro Med Chem* 1990;27.

-Klein CB, Kargacin B, Su L, Cosentino S, Snow ET, Costa M. Metal mutagenesis in transgenic Chinese hamster cell lines. *Environ Health Perspect* 1994;102(Suppl 3):63–7.

-Klerman GL, Weissman MM. The changing epidemiology of depression. *Clin Chem* 1988 ; 34, 807-812.

-Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p.

-Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I. & Abdelly, C. (2012). Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 32(4), 289-326.

-Künkele, U., Lobmeyer., T.R. 2007. Plantes médicinales : identification, récolte, propriétés et emplois. Edition Parragon, Royaume-Uni.

-Kusal K. Das, R. Chandramouli Reddy, Ishwar B. Bagoji, Swastika Das, Shrilaxmi Bagali, Lata Mullur, Jyoti P. Khodnapur and M.S. Biradar. Primary concept of nickel toxicity – an overview. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2019; 30(2): 141–152.

-Kusters E. Biological monitoring of MDA [Letter]. *BrJ Ind Med* 1992;49:72.

ℒ

-Lafont et Duval, 2001. Le préparateur en pharmacie dossier1 chimie-biochimie paris Technique et documentation.

-Lahlou M. (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18, 435-448.

- Lakshmi BV, Sudhakar M, Aniska M.** Neuroprotective role of hydroalcoholic extract of *Vitis vinifera* against aluminium-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotoxicology* 2014; 41: 73-9.
- Lamien-Meda A., C.E. Lamien, M.M.Y. Compaore, R.N.T. Meda and M. Kiendrebeogo., 2008.** Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13: 581-594.
- Larese, F., Gianpietro, A., Venier, M., Maina, G. and Renzi, N. 2007.** In vitro percutaneous absorption of metal compounds, *Toxicol. Letters*, 70, 49-56.
- Latloui, N. et Tantaoui-Elaraki, A. J. Essent. oil Res.** 1994, 165.
- Lauder JM.** Roles for neurotransmitters in development: possible interaction with drugs during the fetal and neonatal periods. In: Marois M, editor. Prevention of physical and mental congenital defects. New York: Alan R. Liss; 1985. p. 375—80.
- Le Floch E (1983).** Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. *Pub. Sci. Tunis*. Programme Flore et végétation Tunisiennes. 2 Part. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.
- LEE K. W., KIM Y. J., Lee H. J. and Lee C. Y. (2003).** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7292-7295.
- Leelavinothan, P. & Kasinathan, A. (2011).** Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 364–370. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.068
- Léon Raul HERNANDES OCHOA octobre 2005.** substitution de solvants et matières actives de synthèses par une combine solvant/actif d'origine végétale thèse de l'institut nationale polytechnique. Toulouse, France
- Levin, D.A. 1976.** Alkaloid bearing plants: an ecogeographic perspective. *Am. Nat.* 110(972): 261-284.
- Li, W. L., Zheng, H. C., Bukuru, J. & De Kimpe, N. (2004).** Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 1-21.
- Liappas, I., Piperi, C., Malitas, P.N., Tzavellas, E.O., Zisaki, A., Liappas, A.I., Kalofoutis, C.A., Boufidou, F., Bagos, P., Rabavilas, A., Kalofoutis, A. 2006.** Interrelationship of hepatic

function, thyroid activity and mood status in alcoholdependent individuals In vivo. *Toxicology*. 20: 293- 300

-Lightfoot, N.E., Pacey, A.M., et Darling, S. (2010). L'extraction et la transformation de l'or, du nickel et du cuivre, *Maladies chroniques au Canada*, 29(2) : 117-148.

-Lisman T., Caldwell S. H., Burroughs A. K., et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *Journal of Hepatology*. 2010;53(2):362–371. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.042.

-Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>.

-LOUCIF.A. 2020, Activité antioxydant de plant médicinal «Haloxylon scoparium », Thèse de Master, Université Mohamed Khider de Biskra. P :3-64.

-Lu CC, Matsumoto N & Iijimi S (1979) 'Teratogenic effects of nickel chloride on embryonic mice and its transfer to embryonic mice'. *Teratology* 19:137-142.

-Lucc ME, thèse sur : Extraction sans solvasnt assistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université de la reunion, 13 juillet 2005, 59-71.

-Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., 2004, «An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices», *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 134.

-Lucchesi M E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en chimie. Faculté des Sciences et Technologies. Université de la Reunion.

-Lynn S, Yew FH, Chen KS, Jan KY. Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair. *Environm Mol Mutagen* 1997;29:208–16.

-Lynn, S., Yew, F.H., Chen, K.S.& Jan, K.Y.(1998). Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 1998; 29 : 208-16.

-Lynn S, Shiung JN, Gurr JR, Jan KY. Arsenite stimulates poly (adp-ribosylation) by generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998;24:442–9.

M

- MACEIJ Stobiecki, 2000.** Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, *Phytochemistry*. 237-256.
- MACHEIX J J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMAND C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- Maehle L, Metcalf RA, Ryberg D, Bennett WP, Harris CC, Haugen A.** Altered p53 gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to nickel. *Cancer Res* 1992;52:218–21.
- MAKHLOUFI Ahmed. 2010.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de Doctorat d'état université de Tlemcen.
- Malecky, M. (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27. *Metabolic engineering of terpenoids in plants. Trends in Plant Science* Vol.10No.12, December
- Marchetti C, Gavazzo P.** Subunit-dependent effects of nickel on NMDA receptor channels. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;117:139—44.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116(1), 306-312.
- MARKOWICZ BASTOS, D. H., SALDANHA, L. A., CATHARINO, R. R., SAWAYA, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. (2007)** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432.
- Martín Mateo, M. C., Martín, B., Santos Beneit, M., et Rabadán, J. (1997).** Catalase activity in erythrocytes from colon and gastric cancer patients. Influence of nickel, lead, mercury, and cadmium, *Biological Trace Element Research*, 57(1), 79–90.
- Mas A , Holt D & Webb M. (1985)**' the acute toxicity and teratogenicity of nickel in pregnant rats'. *Toxicology* 35(1):47-57.

- Mauro, N. M. (2006)**. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- McRae, DW et Towers, GHN. (1984)**. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 23(6): 1207-1220.
- Meltzer HY, Lowy MT**. Psychopharmacology. In: Meltzer HY, editor. The third generation of progress. New York: Raven Press; 1987. p. 513—26.
- Mezghani-Jarraya, R., Hammami, H., Ayadi, A. & Damak, M. (2009)**. Molluscicidal activity of Hammada scoparia (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against *Galba truncatula*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7),1035-1038.
- Michailova, A., Kuneva, T., Popov, T.A. 1998**. Comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry, International Archives of Occupational and Environmental Health. 71: 46-49.
- Midoun, T. (2011)**. Extraction Des Composés Phénoliques Et Etude Leurs Activités Antioxydante Par La Voltamétrie Cyclique. Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de Master, Spécialité : *chimie appliquée*. Université Kasdi Merbah Ouargla. 53p.
- Minoia C et al. (1990)** Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *The Science of the Total Environment* 95 :89-105.
- Minuto, L., Casazza, G., Profumo, P. 2004**. Population decrease of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. In Liguria conservation problems for the North Tyrrhenian sea Plant Biosystems, Taylor and Francis Ltd, 138(1): pp11- 19(9).
- Misra, M., Rodriguez, R. E., & Kasprzak, K. S. (1990)**. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1), 1–17. doi : 10.1016/0300-483x(90)90095-x
- Misra, M., Rodriguez, R.E. et Kasprzak, K.S. 1990**. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicol.* 64: 1-17.
- Miura, K., Tada, Y. (2014)**. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in plant science*, 5, 4.
- Miyamae Y, Villareal MO, Abdrabbah MB, Isoda H, Shigemori H. Hirseins A and B**, daphnane diterpenoids from *Thymelaea hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *J Nat Prod* 2009;72:938-41.

- Miyamae, Y., Orlina Villareal, M., Ben Abdrabbah, M., Isoda, H., Shigemori, H., Hirseins, A.B. 2009.** Daphnane diterpenoids from *T. hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *Journal of Natural Products*, 72 : 938–941.
- Mohammedi Z.2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de région Tlemcen. L'obtention du diplôme de magistère, université Abou Baker Belkaide. Tlemcen, p : 1- 6-7.
- MOHAMMEDI Z. 2013.** Étude phytochimique et Activité biologique de quelques plantes médicinales de la région Nord et Suc Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat de l'Université de Tlemcen. Algérie.
- Mompon, B.** Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4ème rencontre internationale de Nyons, 1994, 149-166.
- Moosavi, M.A., Yazdanparast, R., Sanati, M.H. 2005a.** The cytotoxic and antiproliferative effects of 3- hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. *Biochem Mol Biol*, 38: 391– 398.
- Morel J.M.** *Traité pratique de phytothérapie*. Grancher (2008). 620p.
- Morilak D A ,Barrea G ,Echevarria D J, Garcia A S, Hernandez A, Ma S , Petre C O.** Role of brain morepinephrine in the behavioral reponse to stress progress in Neuro-psychopharmacology and biological psychiatry 2005 ; 29, 1214-1224.
- Morris, R. (1984).** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11(1), 47-60.
- Morvai V ,Szakmary E, Naray M & Ungvary G (1992)** 'The role of maternal and placental circulation in the embryotoxic and teratogenic effects induced by nickel sulphate' .*Reprod Toxicol* 6:2:183-4.

N

- NAGENDRAN B., KALYANA S., et Samir S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemitry.*, 99 : 191–203.

-**NAS. Nickel. National Academy of Sciences.** Washington, DC: National Academy Press; 1975. p. 4, 5, 17.

-**National Toxicology Programme. NTP** technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel sulphate hexahydrate (CAS No. 10101-97-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (inhalation studies). Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NTP-TRS No. 454, 1996a.

-**National Toxicology Programme. NTP** technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel oxide (CAS No. 1313-99-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (inhalation studies). Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NTP TRS No. 451, 1996b.

-**National Toxicology Programme. NTP** technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nickel subsulphide (CAS No. 12035-72-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (inhalation studies). Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. NTP-TRS No. 453, 1996c.

-**Navarro, M., Cubero, I., Chen, A.S., Chen, H.Y., Knapp, D.J., Breese, G.R., Marsh, D.J., Thiele, T.E. 2005.** Effects of Melanocortin Receptor Activation and Blockade on Ethanol Intake: A Possible Role for the Melanocortin-4 Receptor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 29:949–957.

-**Nawwar, M.A.M., Ishak, M.S., Sherbieny, A.D., Meshaal, S.A. 1977.** Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 16: pp1319-1320.

-**Neffati, A.**, Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*, 2010.

-**Nelly Grosjean. (2007)**-l'aromathérapie tout simplement. P52

-**Nestle FO, Speidel H, Speidel MO.** Metallurgy: High nickel release from 1- and 2- uro coins. *Nature* 2002; 419 : 132.

-**Nieboer E, Nriagu JO.** (Eds.), Nickel and Human Health. New York: Wiley; 1992.

-**Nielsen, G. D., Søderberg, U., Jørgensen, P. J., Templeton, D. M., Rasmussen, S. N., Andersen, K. E., & Grandjean, P. (1999).** Absorption and retention of nickel from drinking water

in relation to food intake and nickel sensitivity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154(1):67–75.

-Novelli EL, Diniz YS, Machado T, Proenca V, Tibirica T, Faine L, et al. Toxic mechanism of nickel exposure on cardiac tissue. *Toxic Subs Mech* 2015;19:177–87.

O

-Obone E, Chakrabarty SK, Bai C, Malick MA, Lamantagne L, Subramanian KS. Toxicity and bioaccumulation of nickel sulphate in Sprague-Dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure. *J Toxicol Environ Health* 1999;57:379–401.

-Otmami.F. 2014. Étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'Haloxylon scoparium pomel de la région de Naâma. Thèse de Mastère en agronomie de l'Université Abou-Bakr Belkaid-Tlemcen.

-Ottolenghi AD, Haseman JK, Payne WW. Inhalation studies of nickel sulfide in pulmonary carcinogenesis of rats. *J Nation Cancer Inst* 1974;54:1165–72.

-Ozenda P., 1958. Flore du Sahara septentrional et central. CNRS, ed., Paris. p. 486.

-Ozturk, S., Koksel, H., Ng, P.K.W.2009. Characterization of resistant starch samples prepared from two high-amylose maize starches through debranching and heat treatments. *Cereal Chemistry* 86, 503–510

P

-P. Quezel, and S. Santa, (1962), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.

-Pardeep, S., Garg, M. L., & Dhawan, D. K. (2004). Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 150(2), 199–209. doi : 10.1016/j.cbi.2004.09.012.

-Pari, L., & Amudha, K. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 364–370. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.068

-Patierno, S. R., Sugiyama, M., & Costa, M. (1987). Effect of nickel(II) on DNA-protein binding, thymidine incorporation, and sedimentation pattern of chromatin fractions from intact mammalian cells. *Journal of Biochemical Toxicology*, 2(1), 13–23. doi:10.1002/jbt.2570020103

-Pausas, J.G., Bonet, A., Fernando, T. M., Climent, A. 2006. The role of the perch effect on the nucleation process in Mediterranean semi-arid oldfields *Acta ecologica*, (29): 346-352.

-Pharmacopée Européenne, 3^{ième} Ed. 1999, 103-130.

-PHILIPPE M. servais.2000. Larousse de l'homéopathie. Edition : Larousse. Paris France.

-Piochon M. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. 2008.

-PIQUEMAL G. 2008. Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215

-Ponnappakkam T, Iszard M , Henry-sam, 2003. Effects of oral administration of manganese on the kidneys and urinary bladder of Sprague-Dawley rats. 22(3): 227-32.

-Porsolt, R.D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jalfre, M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, 47, 379–391.

-Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S. “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis” *Journal of Chromatography A*, 2007, Vol. 1162; pp 2- 24.

-Proust, B. 2006. Petite Géométrie des Parfums. Éditions du Seuil. Paris. 126p.

-Pradyot Patnaik, Ph.D. 2003. Handbook of Inorganic Chemicals.

-Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M (2005). An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* 96(1):295-301.

Q

-Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed., T2, p. 59.

R

- R. Amorati, M. C. Foti, et L. Valgimigli**, « Antioxidant Activity of Essential Oils », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no 46, p. 10835-10847, 2013.
- Rahman, T., I. Hosen, M.M.I. Towhidul and H.U. Shekhar, 2012**. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3: 997-1019.
- Rahman,A., Choudhary, M.I., Hayat, S., Khan, A.M., Ahmad, A., Malik, S., 1999**. Spatozoate and Varninasterol from the brown Alga *Spatoglossum variabile*. *Phytochemistry*. 52: 495-499.
- Rakotonanahary, M. (2012)**. Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.
- Rendall REG, Phillips JI, Renton KA**. Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *Ann Occup Hyg* 1994; 38 : 921-30.
- Renner, S. 2001**. How common is heterodichogamy. *Trends in ecology. Evolution.Elsevier science*. 19(11).
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996**. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Richard, H. 1992**. Épices et Aromates.Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339
- Robert, G. 2000**. Les Sens du Parfum. Osman Eroyle MultiMedia Paris.224p.
- Richard, J. A. Toxicology Brief** 1999.
- **Rioux C. (2009)**. Stress oxydatif et prévention des maladies chroniques la supplémentation s'impose-t-elle?. Mémoire de maîtrise en kinésiologie pour l'obtention du grade de maître en sciences, Faculté des études supérieures dans le cadre du programme (M.Sc.). Université de Laval.
- Rizk, A. M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1975**. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, III, Coumarins. *Acta chimica Academiae scientiarum Hungaricae*, 85(1): p107-115.
- Rizk, A., AM, R., AL NAGDY, S., & EL MISSIRY, M. (1982)**. CONSTITUENTS OF PLANT GROWING IN QATAR.
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M. et Ismail, S.I., 1982**. Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. III. Lipid fraction. *Plant Med.*, 26 (4). P 346 – 358.

- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1974.** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. *Plant Med*, 26(4): p346-358.
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., El-missiry M.M., Evans F.J. 1984,** Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. *Experientia*, 40(8): 808-809.
- RIZK, A.M., RIMPLER, H.1972.** Isolation of daphnoretin and β -sitosterol- β -Dglucoside from *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry* 11 (1): 473-475.
- Rodriguez, R.E., Misra, M., North, S.L. & Kasprzak K.S.(1991).** Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems. *Toxicology Letters*, 57(3), 269-281. doi:10.1016/0378-4274(91)90201-g
- ROLLAND Y .2004 :** Antioxydants naturels des végétaux.2004. Review.11 :1-6.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L ., Ganther, H.E ., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., et Hoekstra, W.G. (1973),** *Science*,179, 588-590.
- Roux, D. (2008).** Conseil en aromathérapie. Wolters Kluwer France. 187 p.
- **RTI.** Two-generation reproduction and fertility study of nickel chloride administered to CD rats in the drinking water: 90-Day exposure of CD rats to nickel chloride administered in the drinking water. Final study report (I of III). Report to Office of Solid Waste Management, U.S. Environmental Protection Agency by Research Triangle Institute. Research Triangle Park, NC, 1986.
- RTI.** Two-generation reproduction and fertility study of nickel chloride administered to CD rats in the drinking water: fertility and reproductive performance of the F1 generation. Final study report (III of III). Report to Office of Solid Waste Management, U.S. Environmental Protection Agency by Research Triangle Institute. Research Triangle Park, NC, 1988.

S

- Saka, S., Bahi, A., et Aouacher, W. (2011).** L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats, *Ann Toxicol Anal.* 23(3): 139-145.

- Saleh IA, Gamal AS, Amani SA, Abd El Raheim MD.** Anti-inflammatory activity, safety and protective effects of *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* in ulcerative colitis. *Phytopharmacology* 2012, 2(1) 58-71
- Saleh, M.R.I., Haddad, D.Y., Sar, T.M. 1965.** Isolation of the crystalline principle, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. *U. Arab Rep. J. Pharm. Sci*, 4: p49-56.
- Sallé, J. L.** « *Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie* », Edition Frison – Roche, Paris, 1991, 21.
- Salnikow K, Gao M, Voitkun V, Huang X, Costa M.** Altered oxidative stress responses in nickel-resistant mammalian cells. *Cancer Res* 1994;54:6407–12.
- SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A., SAURA-CALIXTO, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food. Agric*, 76: 270–276.
- Sanford WE, Nieboer E, Bach P, Stace B, Gregg N, Dobrota M.** The renal clearance and toxicity of nickel. In: Fourth International Conference on Nickel Metabolism and Toxicology, Abstracts, Espoo, Finland, 5-9 September 1988, Helsinki, Institute of Occupational Health, p.17.
- Sanjay G, Nihal A, Mirza M H&Ramesh C S (2000)** 'Involvement of Nitric Oxide in Nickel-Induced Hyperglycemia in Rats'. *Nitric oxide' Biology and Chemistry* 4: 2, 129–138
- SARNI-MANCHADO P. et CHEYNIER V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. p2- 10.
- Sathiyamoorthy P., Lugasi-Evgi H., Schlesinger P., Kedar I., Gopas J.,Pollack Y. et Golan-Goldhirsh A., 1999.** *Pharm. Biol.*, 37: 188-195. *In Ben Saleh et al.*, 2002.
- Saxena G, Flora SJS.** Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* **2004**; 18(4): 221–233.
- Scott RB, Reddy KS, Husain K, Schlorff EC, Rybak LP, Somani SM .** Dose response of ethanol o antioxidant defence system of liver, lungs and kidney in the rat, *pathophysiology* **2000**; 7:25-32.
- Scott-Fordsmand, J.J. (1997).** Toxicity of nickel to soil organisms in Denmark. *Rev. Environ. Contam, Toxicol*, 148, 1-34.

- Seu-Saberno, M.**; Blakeway, J. « *La mouse de chêne, une base de la parfumerie* », Pour la science, Edition Française de Scientific American, 1984, Mai, 83.
- Shaltout, K.H. 1987.** Pattern, phenology and sex ratio of Egyptian *Thymelaea hirsuta* populations. *Vegetatio*, 72: 67–73.
- Shannon H.S., Walsh C., Jadon N., Julian J.A., Weglo J.K., Thornhill P.G. and Cecutti A.G. (1991)** - Mortality of 11,500 nickel workers--extended follow up and relationship to environmental conditions. *Toxicol Ind Health*, 7, 4, 277-294.
- Sharma DR, Wani WY, Sunkaria A, Kandimalla RJ, Verma D, Cameotra SS, et al.** Quercetin protects against chronic aluminum-induced oxidative stress and ensuing biochemical, cholinergic, and neurobehavioral impairments in rats. *Neurotox Res* 2013; 23(4): 336-57.
- SHE (Service d'Histologie et Embryologie). 2020.** Université d'Oran - Faculté de médecine.
- Shenbrot, G. 2004.** Habitat selection in a seasonally variable environment: test of the isodar theory with the fat sand rat, *Psammomys obesus*. *Israel/Oikos. Negev Desert*, 106: 361.
- Shi, X., Dalal, N.S. & Kasprzak, K.S.(1993).** Generation of free radicals in reactions of Ni (II)-thiol complexes with molecular oxygen and model lipid hydro-peroxides. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 50(3), 211-25.
- Shi, X., Dalal., N.S.& Kasprzak, K.S.(1992).** Generation of free radicals from lipid hydroperoxides by Ni²⁺ in the presence of oligopeptides. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299 : 154-62.
- Sinha, AK. (1972).** Colorimetric assay of catalase, *Analytical Biochemistry*, 47(2), 389-394.
- Slotkin TA, Seidler FJ.** Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233(2):211—9.
- Smith MK, George EL, Stober JA, Feng HA & Kimmel GL (1993)** 'Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure'. *Environ Res* 61: 200-211.
- Soliman GA, Abd El Raheim MD, Amani SA, Saleh IA , Hasan Yusufoglu (2012)** Effect of *Emex spinosa*, *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* extracts on the reproductive organs of adult male rats, *Pharmaceutical Biology*, 50:1, 105-112.

- Spiro TG**. Nucleic acid-metal ion interactions. New York: John Wiley & Sons; 1980.
- Stefanova, T., Nikolova, N., Michailova, A., Mitov, I., Iancovii.; Zlabinger, g.I., Neychev, H., (2007)**. Enhanced resistance to *Salmonella enteric* sero var typhimurium infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*. p9, 7-14.
- Stohs SJ**, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicities of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995;18:321–36.
- Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., Stöckigt, D., (2002)**. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups *Review Journal of Chromatography A*, **967**, 85–113.
- STRANG C. 2006**. Larousse medical. Ed Larousse.
- Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, A Henn F, Gass P**. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 2004 ; 29, 2007–2017.
- SUN, T., POWERS, J.R., TANG, J. (2007)**. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus broccoli and their juices. *Food Chem*, 105: 101-106.
- Sunderman FW Jr, Coulston F, Eichhorn GL**. *Nickel*. Washington DC: National Academy of Science; 1975. p. 97- 143.
- Sunderman FW Jr, Dingle B, Hopfer SM**, Swift T. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. *Am J Ind Med* 1988;14:257–66.
- Sunderman FW Jr, Dingle B, Hopfer SM, Swift T**. Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride. *Am J Ind Med* 2007; 14 : 257-66.
- Sunderman Jr FW**. Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Stand J Work Environ Health* 1989;15:1–12.
- Sunderman, F.W., J.r, Marzouk, A., Hopfer, S.M., Zaharia, O.& Reid, M.C.(1985)**. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. *Ann Clin Lab Sci* 1985, 15(3), 229-3.

T

- Taïr, K., Kharoubi, O., Taïr, O. A., Hellal, N., Benyettou, I., & Aoues, A. (2016).** Aluminium-induced acute neurotoxicity in rats: Treatment with aqueous extract of *Arthrophytum* (*Hammada scoparia*). *Journal of acute disease*, 5(6), 470-482.
- Tandon, S., Rastogi, R.P. 1977.** Wikstrosin, a tricoumarin from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry*, 16 : 1991-1993.
- Tebani M. (2014).** L'apport du sélénium et de la vitamine E dans la toxicité du nickel chez le rat *Wistar Albinos*. Thèse de doctorat. Université de Badji Mokhetar Annaba.
- Teissedre, P.L.;** Waterhouse, A. L. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3801-3805.
- Thomas C, THOMAS L.** Labor diagnostik von Erkrankung en der Nieren und ableitendenHarnwege. Dans: Thomas L, 6 éd. Philadelphi: Labor und Diagnose. 1992
- Torjussen W, Haug F& Andersen I (1978)** 'Concentration and distribution of heavy metals in nasal mucosa of nickel exposed workers and of controls, studied with atomic absorption spectrometry and with Timms' sulphide silver method. *Acta Otolaryngol*, 86 : 449-463.
- Torjussen, W, Solberg LA & Hogetveit AC (1979a)** 'Histopathologic Changes of Nasal Mucosa Nickel Workers: A Pilot Study *Cancer* 44: 963-974.
- Torjussen W, Solberg LA & Hogetveit AC. (1979b)** 'Histopathological Changes of the Nasal Mucosa in Active and Retired Nickel Workers' *Br J Cancer* 40: 568- 579.
- Torres SJ, Nowson CA (2007).** Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23(11):887-894.
- Touati, D. 1985.** Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustes de la Méditerranée. Thèse de 3ème cycle. Université Claude Bernard, Lyon I.
- Trease, G., & Evans, W. (1987).** A text book of pharmacognosy. ELSB Baillere Tindal: Oxford.
- Trigui, M, Hsouna, A.B., Tounsi, S. and Jaoua, S. 2013.** Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41 : 150-157.

-**Trigui, M., A. Ben Hsouna, S. Tounsi, and S. Jaoua, 2013.** Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41: 150–157.

U

-**UCN., 2005**(union international pour la conservation de la nature et des ressources naturelles). A guide to medicinal plant in North Africa. Publié par International Union for Conservation of Nature and Natural resources. p. 133.

-**Umezawa, T. (2003).** Diversity in lignanbiosynthesis. *Phytochem. Rev.* 2(3): 371-390.

-**United State Air Force.** Nickel. In: Harry G, editor. *Installation restoration program toxicology guide*, vol. 5. Wright Patterson AFB, OH: Armstrong Aerospace Medical Research Laboratory; 1990.

V

-**Valko M, Morris H, Cronin MT.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161–208.

-**Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M.& Mazur, M.(2010).**Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160 : 1-40.

-**Van der Bank, M., Fay, M.F., Chase, M.W. 2002.** Molecular phylogenetics of Thymelaeaceae with particular reference to African and Australian genera. *Taxon*, 51: 329-339.

-**Vann SD, Albasser M M,** Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 2011 ; 21(3): 440-5.

-**Veien NK, Hattel T, Justesen O, Nórholm A.** Oral challenge with nickel and cobalt in patients with positive patch tests to nickel and/or cobalt. *Acta Derm Venereol* 1987;67:321–5.

-**Vernon, H., Heywood, R.K., Brummitt, A.C. and Seberg, O. 2007.** Flowering Plant Families of the World. Firefly Books: Ontario, Canada.

-**Vickery, J.R. 1980.** The fatty acid composition of seed oils from ten plant families with particular reference to cyclopropene and dihydrosterculic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 57, 87-91.

- Vickery, J.R. 1981.** The occurrence of dihydromalvalic acid in some seedoils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 : 731.
- Villars, D. 1807.** Catalogue méthodique des plantes. F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg. p103.
- Vinay Dwivedi , Richa Shrivastava , Showket Hussain , Chaiti Ganguly Mausumi Bharadwaj .** Comparative Anticancer Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) - an Indian Spice - Against Cancer Cell Lines of Various Anatomical Origin. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 12, 2011:189-193.
- Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. (1998).** Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 46, 3630- 3634.
- Vyskocil A, Senft V, Viau C, Cizkova M & Kohout J (1994a)** 'Biochemical renal changes in workers exposed to soluble nickel compounds'. *Hum Exp Toxicol.* 13:257-61.
- Vyskocil A, Viau C & Cizkova M (1994b)** 'Chronic nephrotoxicity of soluble nickel in rats'. *Hum Exp Toxicol* 13:689-93.

W

- Wang XX & Zhu YZ (2003)** 'Effect of nickel sulfate on gonad of female rats'. *ChungKuo Kung Kung Wei Sheng ; China Public Health* 19 : 946-7.
- Ward E, Smith AB, Halperin W, et al.** 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. *Am J Ind Med* 1987; 12:537-49.
- Wei. M.C, Zong.W.X, Cheng.E.H, Lindsten.T, Panoutsakopoulou.V, Ross.A,Roth.K.A, Macgregor.G.R, Thompson.C.B, Korsmeyer.S.J, Proapoptotic.B.A.X andBak.A.2001.** Requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *science* :(292)
- Weischer CH, Kordel W, Hochrainer D.** Effects of NiCl₂ and NiO in Wistar rats after oral uptake and inhalation exposure, respectively. *Zentral Bakteriell Mikrobiol Hyg (B)* 1980; 171 : 336-51.
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Cheng, K., Zhang, P., Zhang, L., . . . Zographos, S. E. (2008).** Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure– activity relationships, and X-ray crystallographic studies†. *Journal of medicinal chemistry*, 51(12), 3540-3554.

-Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 2006;4:349—62.

-Whanger PD (1973) Effects of dietary nickel on enzyme activities and mineral contents in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 25:323–331.

-Williamson, C. E. 1995. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems. *Ergeb. Limnol.* 43. 226 p.

-Winterbourne, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M and Carrel, R.W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity, *J. Lab.chem.Med*, 85, 337-341.

X

-Xu Y, Lin D, Li S, Shyamala SG, Barish PA, Vernon MM, et al. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacology* 2009 ; 57, 463–71.

Y

-Yang, D., Mei, H. and Dai, H. (2010) Antimicrobial Alkaloids from the Tubers of *Stephaniasuccifera*. *Z. Natuforsch.*, 65 (6), 757-761.

-Yanz, L. et Chunru, J.I. 1987. Chemical constituents and pharmacological actions of Thymelaeaceous plants. *Zhongcaoyao*, 18 (2) :80-89.

-Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008;55:1081—94.

-Yen GC, Duh PD, Tsai, CL. (1993). Relationship between antioxidant activity and maturity of peanut hulls. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 41, 67–70.

-Yi L, Xuemei Z, Lingshan G, Xin L, Xia T, Ling L, Youguang Z, Ling Z, Xiaoxing Y . Protective effects of nifedipine administration on the cognitive impairments induced by chronic restraint stress in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2013 ; 103, 474– 480.

-Yousef, M.I. 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199: 47-57.

-Yousef, M.I., Demerdash, F.M., Kamei, K.I., Salhen, K.S. 2003. Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology*. 189: 223-234.

Z

-Zaky A, Mohammad B, Moftah M, Kandeel KM, Bassiouny AR. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of aluminum-induced neuroinflammation. *BMC Neurosci* 2013; 14: 26.

-Zeghad N.2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister, Université Mentouri Constantine, 84p.

-Zenk, M.H., Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of Nitrogenous, compounds. *Phytochemistry Review* **68**, 2757 – 2772.

-Zerriouh M. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et activité antidiabétique de *Hammada scoparia* (Pomel), « Remth ». Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

-Zhao, J., Bowman, L., Zhang, X., Shi, X., Jiang, B., et al. (2009). Metallic nickel nano and fine particles induce JB6 cell apoptosis through a caspase-8/AIF mediated cytochrome c-independent pathway, *J Nanobiotechnology*, 7(2) 1-13.

-Zhong Z, Troll W, Koenig K & Frenkel K. (1990) 'Carcinogenic sulfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by human polymorphonuclear leukocytes' *Cancer Res* 50 : 5764-5770.

Annexe



REGULAR ARTICLE

Evaluation of the nephroprotective effect of the essential oil of *Haloxylon articulatum* in Wistar rats intoxicated by Nickel

Karima Grele, Djallal Eddine Houari Adli, Miloud Slimani, Hemida Houari, Dallal Kourat, Khaled Kahloula

Laboratory of Biototoxicology, Pharmacognosy and Biological Valorisation of plants (LBPVBP) Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Dr MoulayTahar – Saida– Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 29 Sep 2020

Revised: 19 Dec 2020

Accepted: 8 Jan 2021

*Corresponding Author:

Email: grekarima@gmail.com

Telephone: +213661780404

Keywords: Nickel, Rat, CPG-SM, Kidney, *Haloxylon articulatum*

ABSTRACT

Nickel compounds are environmental hazards, capable of inducing severe health problems and carcinogenic effects, which can be mitigated by numerous antioxidants. Therefore, the aim of this study was to determine the protective effect of *Haloxylon articulatum* essential oil (HAOA) by intraperitoneal injection of 0.1 ml/kg/day for a period of 21 days, against nickel-induced nephrotoxicity in Wistar rats. The extraction of the essential oil of *H. articulatum* allowed us to obtain an EOHA with a yield of 0.11% and the characterization of the plant by GC-MS indicated that the major components of this extract are Thymol (14, 19%), Alphaterpinene (11.02), β -E-Ocimene (9.64), 1,8-Cineole (8.69), Oleuropine (5.17%), Linalol (5.12%), Delta -3- Carene (4.12). The results obtained showed a decrease in corporel weight and kidney weight in nickel poisoned rats. Biochemical biomarkers of renal function following nickel exposure were demonstrated by significant increases in serum urea, uric acid and creatinine concentrations. The toxic effect of nickel was also indicated by a significant decrease in the enzymatic activity of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and hepatic glutathione levels (GSH). All these variations in biochemical parameters were confirmed by histopathological observations of the kidneys; glomerular necrosis with degeneration of the Bowman's capsule in comparison with the control rats. In addition, EOHA administration resulted in an increase in body and kidney weight of the rats compared to the poisoned rats. The results of the renal biochemical assays show a correction of the values following the administration of EOHA compared to those of the poisoned animals. Analysis of the antioxidant status in the kidney indicates that EOHA has restored the activity of the oxidative status. In fact, the histological study carried out showed a clear improvement in renal tissue architecture in poisoned rats treated with EOHA, which justifies the great importance of *H. articulatum* in traditional medicine and its therapeutic virtues.

1. Introduction

Nickel (Ni) is ubiquitous in our environment and there are various forms of Ni compounds in soil,

water, air and living organisms (Chau and Kulikovsky, 1995). Ni is a ubiquitous transition metal that is industrially applied in many forms, which inevitably leads to a high degree of occupational and envi-

ronmental exposure (Henderson et al., 2012). This widespread extraction and use increases Ni concentrations in biogeochemical cycles and increases human exposure to Ni and Ni compounds through environmental contamination and occupational exposure. Ni compounds have long been known to cause adverse health effects, including neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, genotoxicity, reproductive toxicity and increased cancer risk (Capasso et al., 2014; Razavipour et al., 2015; Dumala et al., 2017; Yu et al., 2018). Nickel (Ni) is a carcinogen responsible for certain lung cancers in the workplace. In animals, it accumulates in the kidneys, where it induces lesions in the glomeruli and proteinuria (Abdulqadir et al., 2019). Natural substances derived from plants have multiple uses in industry: in food, cosmetics and dermatology. Among these compounds are to a large extent the secondary metabolites, which have been particularly successful in therapy. Indeed, the modern pharmaceutical industry relies on the diversity of secondary plant metabolites to find new molecules with novel biological properties (Hostettmann et al., 1986). The Algerian flora with its 3000 species belonging to several botanical families, 15% of which are endemic (Quezel and Santa, 1962), this wide variety of plant species that can be used in medicinal applications. *H. articulatum* Boiss belongs to the Chenopodiaceae family, it is generally distributed in semi-desert and desert areas of soils containing high levels of salt. It is frequently used in traditional medicine and is said to be used for diseases such as diabetes, with anti-inflammatory and antiseptic characteristics. It is also used to treat eye disorders (Chaouche et al., 2014; Eddouks et al., 2002; Salah et al., 2002). The chemical composition of *H. articulatum* has been studied; the structures of the main secondary metabolites have been identified. It is above all a plant very rich in alkaloids and flavonoids (Salah et al., 2002). This plant is a remedy for hypertension (Eddouks et al., 2002), but also for the treatment of cancer, hepatitis and obesity. On the other hand, other work has been carried out on different extracts of *H. articulatum*, and different biological activities have been proven. Aqueous and methanolic extracts, administered to ethanol-treated rats, significantly reduced oxidative stress and

hepatic impairment (Bourogaa et al., 2014). Our work aimed to explore the impact of nickel on kidney function in Wistar rats and in the meantime to evaluate the effects of *H. articulatum* essential oil against nickel-induced toxicity.

2. Materials and Methods

Plant Material

The leaves of *H. articulatum* were collected from the region of Bechar 31°44'49" N 2°19'32" E (south west Algeria) in September 2018. The plant material is brought back by Pr Sitayeb (botanist) whose specimen was deposited at the laboratory of biology at the University of Saida. The leaves of the plant on which our work was carried out were cut into small pieces and dried at an ambient temperature of 20°C and protected from light for a fortnight. After drying the pieces were crushed.

Extraction of essential oils

The extraction of the essential oil *H. articulatum* (EOHA) was carried out by hydrodistillation which consists of immersing 75g in 750 ml of distilled water, the whole is boiled for 5 to 6 hours (Adli et al., 2017).

Determination of the chemical composition of the extract by GC-MS

The qualitative and quantitative analysis of the essential oil of *H. articulatum* was carried out by gas chromatography type VARIAN CHROMPACK - CP 3900 by injection of 1 µl of extract. The carrier gas used is helium (He) with a flow rate of 1.3 ml/min. The column used is a capillary column type HP-1, 60 m long and with an internal diameter of 0.32 mm. The thickness of the stationary phase is 0.50 µm; the temperature of the initial injection column is programmed to be 60°C for 2 min, and then rises in steps of 15°C/min to 245°C for 20 min; the detector used for this analysis is a mass spectrometry type detector (Saturn 20200) with a temperature of 250°C. The instrument is controlled by a menu-driven computer with software suitable for this type of analysis and a NIST database that allows the identification of compounds.

Origin of the animals and housing conditions

The experiments are carried out on albino rats of Wistar strain, from the local animal house of the university, Dr. MOULAY TAHAR, Saida, Department of Biology. The animals are housed at the pet shop in professional plastic cages (43 x 28 x 15cm). The room they occupy is maintained at a temperature of (22 to 23 °C) and is subjected to a constant light cycle (alternating 12 hours of darkness and 12 hours of light). The animals have focused Ad libitum on water bottles and feeders.

Distribution of groups

The experiments are carried out on Wistar rats, weighing 200 to 400 g. The rats are grouped in cages with 2 females and 1 male. They are placed in a ventilated animal house, at a temperature of 21 °C

± 1 °C with lighting artificial which establishes a day/night cycle (day between 7 and 19 h). The lots are divided into four:

-Group T: constituted by the animals which receive distilled water by oral way without nickel sulphate (n = 7 rats);

-Group Ni: consisting of animals receiving nickel sulphate at a rate of 2g/l in distilled water by the oral route (n = 7 male rats) (Kahloula et al., 2014)

-Ni-EOHA group: 24 hours after weaning the animals are treated with EOHA (0.1 ml/kg) (Ni: n=7) at the rate of one intra-peritoneal injection per day for 21 days (Adli et al., 2017).

-EOHA group: Weaned animals receive distilled water by mouth and an intraperitoneal injection (IP) of EOHA (0.1 ml/kg) per day for 21 days.

Body weight assessment

Monitoring of the young rats required daily weighing of body weight during the whole experimental period from weaning until the end of the experiment (21 days) (n=07), after which the young rats were sacrificed and their kidney weights were recorded. The number of suffering animals were minimized in accordance with the guidelines of the European Council Directive (86/609/EEC).

Biochemical dosage

Determination of the level of nickel in the

kidneys

After weaning and treatment with Haloxylon articulatum essential oil the animals were beheaded and the samples are collected in a 5 ml haemolysis tube containing a volume of 100 µl of 0.1% newt. After vortex agitation for 30 seconds, deproteinisation was achieved by adding 600 µl of HNO₃ (1M). This was followed by a second vortex agitation of the contents of the tube for ten minutes at room temperature. The next step was the centrifugation of the entire tube container at 3000 rpm for 10 minutes. At the end the nickel content was determined by a type atomic absorption spectrophotometer (SHIMA DZU AA6200).

Dosage of kidney parameters

Serum concentrations of uric acid, urea (Kaplan, 1984) and creatinine (Murray, 1984) were determined colorimetrically as measures of kidney functions.

Measuring the activity of antioxidant enzymes

The kidney of the recovered rats was homogenised in a buffer solution containing 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.32 M sucrose, at 4°C (1 mg tissue to 4 ml buffer solution) using a glass/glass homogeniser. The homogenate was centrifuged at 1000× g for 15 minutes at 4°C. The resulting supernatant was then centrifuged at 10 000 × g for 15 minutes at 4 °C. The pellet formed the mitochondrial fraction, and the supernatant was re

centrifuged at 10 000 g/30 minutes. The two pellets thus obtained are solubilised in a buffer solution containing 0.5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.32 M sucrose and 0.02% digitonin (pH

7.4); a second one was made at 10 000 × g for 15 minutes at 4 °C. The second pellet was centrifuged at 10 000 × g for 15 minutes at 4 °C. At the end, the pellet obtained, which constitutes the total fraction of mitochondria, is solubilised in a sucrose-containing solution (0.32 M at pH = 7.4) (Rotruck et al. 1973). Superoxide dismutase (SOD) [EC 1.15.1.1] was analysed on the supernatant using the technique of Kakkar et al. (1984).

The activities and levels of antioxidant enzymes at the renal level, such as glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) were analysed by the method of Rotruck et al (1973), Sinh (1972) and Jollow et al (1973). The determination of glutathione (GSH) was carried out according to the method of Ellman (1959).

Histological study

After sacrifice, kidney and liver samples were taken from all groups of rats and fixed in a buffered solution of formalin (10%), dehydrated in ascending grades of ethanol (70-100%), clarified in xylene and cast (the paraffin), blocked, cut to a thickness of 5 μ m, after routine staining with haematoxylin and eosin (H&E) dyes (Bancroft, 1975), and then examined microscopically with magnification ($\times 20$, $\times 100$).

Expression and statistical analysis of results

The results were expressed as the mean (M) of the individual values, assigned from the standard error to the mean (S.E.M.). The comparison of several

means was carried out by an analysis of variance (ANOVA) with the intoxication factor (Ni, T) and/or the treatment factor (EOHA, Ni), followed possibly by the Post-Hoc Student-Newman-Keuls test: A probability $*p \leq 0.05$ indicates a significant difference; $**p < 0.01$ indicates a highly significant difference; $***p < 0.001$ indicates a highly significant difference compared to the controls. The statistical analyses were carried out using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

Extract yield and main compounds

The hydro-distillation of *H. articulatum* plant material has resulted in a yield of 0.11%. Analysis of the plant extract by gas chromatography identified 69 major compounds listed in Table 01 in order of elution. Sixty-nine components representing the sum of the percentages of the components obtained were identified (82.20%). The major components of this essential oil are :Thymol

(14.19%), Alphater-pinene (11.02), β -E-Ocimene (9.64), 1,8-Cineole (8.69), Oleuropine (5.17%), Linalol (5.12%), Delta-3-Carene (4.12) (Table 1).

Effect of Nickel on body weight and kidney weight

Weight results show that animals exposed to NiSO₄ showed a significant ($p < 0.05$) decrease in body weight and kidney weight to that of control animals during the experimental period. Animals exposed to NiSO₄ and treated with EOHA showed a significant ($p < 0.05$) increase in body weight and kidney weight compared to untreated poisoned rats (Table 02).

Biochemical tests

Determination of biomarkers of renal function

The results show that animals exposed to NiSO₄ showed a significant ($p < 0.05$) decrease in body weight compared to control animals during the experiment. In addition, animals exposed to NiSO₄ and treated with EOHA showed a significant ($p < 0.05$) increase in body weight compared to the poisoned rats (Table 03). The results found in the poisoned animals also show a significant ($p < 0.05$) decrease in kidney weight compared to controls (Table 03). On the other hand, animals that were treated with EOHA showed a significant increase ($p < 0.05$) in the organ weights studied compared to the poisoned rats.

Activity of oxidative status enzymes at the renal level

Results of oxidative status in the kidney show a significant decrease in renal GSH, SOD, CAT and GPx in NiSO₄-exposed rats compared to control rats. While a significant elevation was observed ($p < 0.05$) under the action of EOHA in the treated lot following intoxication (Table 04).

The effect of Ni and EOHA on kidney histology

Histology of the renal cortex of rats from the control batch showed the presence of uniform glomeruli with well-defined membrane (Figure 01A). In the EOHA treated lots, the histology of the renal cortex showed a normal and comparable structure to that observed in the

control rats (Figure 01 D). The architecture of the renal cortex in the rats of the nickel poisoned batch was severely altered with most of the glomeruli being necrotic, with degeneration of the Bowman's capsule (Figure 01B). In the nickel poisoned and EOHA-treated batches, the glomeruli appeared larger and not rounded (dilated), with regeneration of the Bowman's capsule and interstitial cells, with contoured tubes.

4. Discussion

Yield and chemical composition of H. articulatum extract

Extraction resulted in an EOHA with a yield of 0.11%. According to some authors, the chemical composition and yield of the essential oil vary according to various conditions: the method used, the plant parts used and the products and reagents used during extraction, the environment, the plant genotype, its geographical origin, the harvest period of the plant, the degree of drying, the drying conditions, the temperature and drying time, the presence of parasites, viruses and weeds (Bajpai et al., 2008; Kelen et al., 2008). The chromatographic analyses of EOHA allowed identifier 69 compounds to be analysed which mainly represent polyphenols, terpenes.....etc, Thymol (14.19%), α -phaterpinene (11.02), β -E-Ocimene (9.64), 1,8-Cineole (8.69), Oleuropine (5.17%), Linalol (5.12%), Delta -3- Carene (4.12) . The results obtained corroborate with the work of Chaouche et al, (2014) who proved the presence of polyphenols.

Several studies carried out on the arial part of the plant have shown the presence of tannins, flavonoids (Alghazeeret al., 2012).

N°	Compounds	Tr (min)	Concentration (%)
1	Tricyclène	10.051	0.467
2	α - Thujène	10.310	0.625
3	α - pinene	10.901	0.438
4	Hexanoic acid ^{e,f}	11.211	0.300
5	Camphène	11.894	0.082
6	Verbnène	12.049	0.045
7	β -pinène	12.152	0.243
8	Sabinène	12.225	0.621
9	Octen-3-oL	12.333	0.560
10	Octanone - 3	12.907	0.133
11	Myrcène	12.978	0.142
12	Octanol	13.278	0.175
13	α -2- Carène	13.587	0.050
14	α -Phellandrène	13.705	0.066
15	Delta -3- Carène	13.755	4.102
16	p-Cymene	13.985	0.320
17	Alphaterpinène	14.675	11.023
18	Para-cymène	15.110	1.325
19	Limonène	15.458	0.544
20	1,8-Cineole	15.728	8.690
21	β -Z-Ocimène	16.080	0.153
22	β -E-Ocimène	18.316	9.640
23	Camphenilone	18.427	0.110
24	Gamma Terpinène	18.564	0.085
25	cis hydrate de sabinène	18.776	0.145
26	Metacimenène	19.032	0.062
27	Hotrienol	19.099	0.070
28	FeneHole	19.121	0.060
29	Linalol	19.939	5.012
30	Camphénol	20.595	1.324
31	α - Camphénol	21.802	0.021
32	Trans-pinoarvéol	21.872	0.041
33	Camphre	21.953	0.387
34	p-Methylacetyophenone ^{e,f}	22.352	0.293
35	ISO Bornèol	23.964	0.128
36	Bornèol	24.183	1.330
37	Terpin-4-oL	25.108	0.468
38	α Terminèol	25.348	0.130
39	Paracymène-8-oL	25.541	0.081
40	VerbénoL	25.994	0.760
41	Thymol-methylether	26.442	1.497
42	Perillaldehyde ^{e,f}	26.278	0.280
43	α - Terpène -7- AL	26.614	0.099
44	Thymol	26.873	14.195
45	Carvacrol	27.008	1.319
46	Alpha Copaène	27.215	0.128
47	Beta Bourbonnène	27.371	0.067
48	Beta Cubebène	27.475	0.099
49	Z- Caryophylène	27.562	1.154
50	E- Caryophylène	27.973	0.053

51	AL l o medandrène	28.237	0.036
52	Germacrène	29.025	0.317
53	β -Selinèn	29.764	0.120
54	lidene [†]	29.834	0.360
55	Valencène	30.643	0.145
56	β -Bisabolène	31.007	0.484
57	g- Cadinène	31.312	0.370
58	Δ -Cadinène	33.261	0.117
59	Calamenène cis	33.568	0.451
60	E-aBisabolène	33.864	0.112
61	Thymohydrouinone	34.031	0.008
62	Cadalène	34.318	0.038
63	Isoeugènol	34.534	0.015
64	Oleuropine	34.578	5.170
65	Verbacoside	34.708	0.980
66	Luteoline 7 - gluciside	34.754	0.087
67	β pegenine- glucoside	34.973	0.189
68	Rutine	35.105	0.091
69	Olerpeoside	35.269	0.408
Total Identifies :		82.20 %	

Table 1: Concentration in % and retention time of the different compounds obtained by GC-MS analysis of *H.articulatum* essential oil.

Parameter	Ni	EOHA	Ni-EOHA	T
Body weight(g)	61,22±3,92*	108,23±0,51	96,07±0,33*	113,6±0,24
KidneyWeight(g)	0,54±0,05*	0,84±0,01	0,67±0,02***	0,86±0,05

Table 2: Evaluation of weight parameters of control, NiSO₄ and EOHA-treated rats. The values are expressed as an average \pm SEM (*: p<0.05).

Parameter	Ni	EOHA	Ni-EOHA	T
Ni (μ g/g)	50,21±0,05*	0,19±0,08	28,17±0,11*	0,21±0,05
Blood urea(mg/dl)	7,21±0,037*	3,13 ±0,42	4,55 ±0,11*	3,02 ±0,09
Uric Acid(mg/dl)	6,41 ±0,5*	3,17±0,55	4,84±3,10*	3,05 ±0,34
Créatinine (mg/dl)	22,30 ±0,01*	6,78±0,06	11,91±0,03*	7,10 ±0,05

Table 3: Effect of EOHA on blood urea, uric acid and creatinine levels in NiSO₄ intoxicated rats compared to control rats. The values are expressed as an average \pm SEM (*: p<0.05).

Groups	Ni	EOH A	Ni-EOHA	T
SOD (U/g)	0,48±0,15*	0,97±0,31	0,82±0,32*	1,11±0,06
CAT (U/g)	0,46±0,31*	1,89±0,07	1,07±0,55*	1,92±0,56
GPx (U/g)	12,42±0,03**	38,63±0,24	25,54±0,32**	37,71±0,01
GSH (μ M/min)	50,17±0,23*	153,05±0,01	99,78±0,19	147,02±0,12*

Table 4: Effect of *H.articulatum* essential oil (EOHA) in the activity of anti-oxidant enzymes in kidney of rats intoxicated. The values are expressed as an average \pm SEM (**: p<0.01, *: p<0.05).

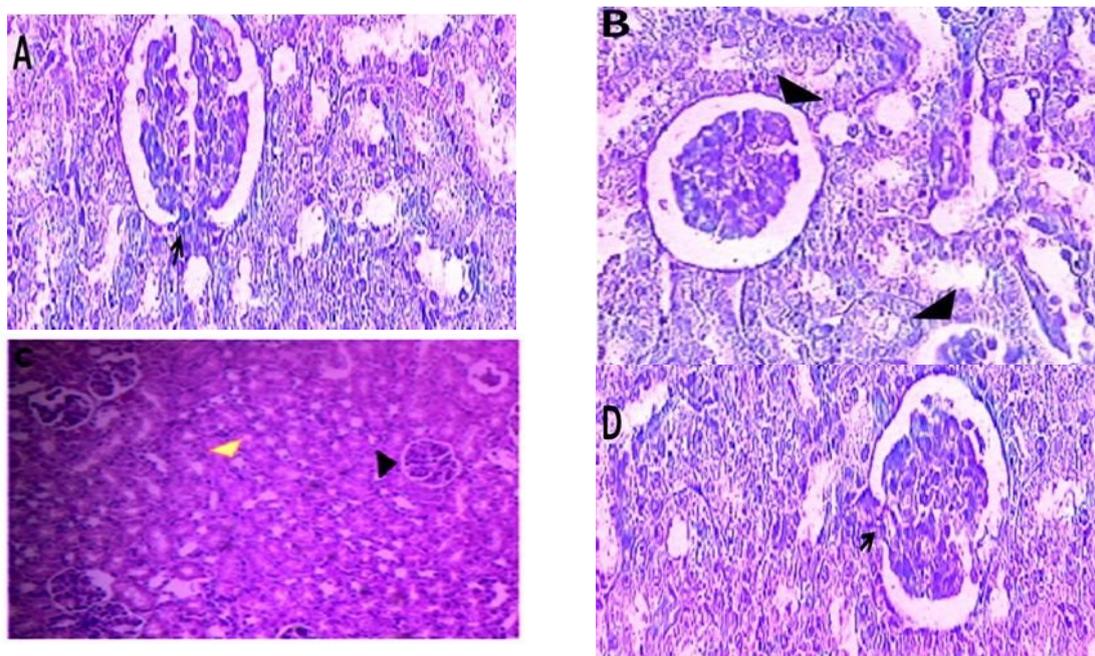


Figure 1: Light microscopy of kidney tissue stained with haematoxylin and eosin.

(A) G: (x100) in kidney sections of control rats appeared with normal architecture. (B) G: (x100) sections of rats exposed to Nickel showed necrosis and degeneration of Bowman's capsule (black arrow). (C) G: (x20) Sections of rats exposed to Nickel and treated with *H.articulatum* essential oil showed regeneration of Bowman's capsule (black arrow) and interstitial cells, with contoured tubes (yellow arrow) and (D) G: (x100) sections of normal kidney of rats treated with *H.articulatum* essential oil.

These phenolic compounds are formed in the phenylpropanoid pathway, which is stimulated mainly by the enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Phenylpropanoid metabolism transforms phenylalanine, the branch substrate point between primary and secondary metabolism, while environmental stress, such as drought, can influence the polyphenol biosynthesis pathway (Andre et al., 2009). In response to environmental stresses, PAL activity increases and the enzyme activates many genes involved in phenylpropanoid synthesis (Oh et al., 2009). It has been shown that induction of the accumulation of phenolic compounds can play a role in the protective mechanism during water stress (Miura and Tada, 2014).

Given the polar nature of the extracts, the analysis carried out was oriented towards hydrophilic compounds, particularly phenolics. Moreover, the antioxidant activity of plant species is often linked to their phenolic content, as these compounds are known for their redox properties (as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen extinguishers or chelators of metallic elements) (Rice-Evans et al., 1996). Indeed, the presence of phenols

and many other groups of phenolic compounds (of different concentrations) in plant extracts is a determining factor in preventing lipid oxidation (Rice-Evans et al., 1996), which is one of the strongest types of antioxidant activity verified among the species studied. In fact, planting phenolic compounds can delay the onset of lipid oxidation and hydroperoxide decomposition in food products as well as in living tissue (Carocho and Ferreira, 2013), and some studies have shown that the biological activity of essential oils is higher than that of its majority compounds tested separately. Pure compounds such as thymol and carvacrol have a clear synergistic effect, which would explain the different activities of the chemotypes. Cinnamic aldehyde is generally indifferent to both phenols (Lahlou, 2004).

Effect of Nickel and EOHA on weight and kidney weight

The recorded results clearly show that the weight of animals exposed to (Ni) is significantly lower than that of control animals resulting in a decrease in weight gain. However, the anorexia caused by

these metals can be justified by their action on several neurotransmitters that are involved in the regulation of food intake, such as serotonin, dopamine, norepinephrine, and glutamate could play a primary role in the control of satiety (Torres and Nowson, 2007). In the same series of experiments, we observed a significant reduction in kidney weight in poisoned rats (Ni) compared to controls. This may be due to slower development of the internal organs (liver and kidney) (Bisson, 2012). Therefore, the administration of *H. articulatum* essential oil to rats previously exposed to (Ni) allowed us to observe a clear increase in body gain compared to the poisoned animals. This recorded weight gain could be due to the presence of terpenoid compounds that act by stimulating glucose transport in cells (Vinay Dwivedi et al., 2011).

Effect of Ni and EOHA on biochemical parameters

Regarding the effect on kidney function, our results also showed a clear increase in serum levels of creatinine, uric acid and urea. These biochemical parameters are considered biomarkers of renal dysfunction and kidney damage caused by this metal. In particular, creatinine and urea are essential parameters for assessing renal function, based on glomerular filtration (Vyscosyl et al., 2003). The high serum concentration of urea and creatinine can be explained by the catabolism of the body's protein compounds under the action of glucocorticoid hormones, which play an important role in this process, where proteins can be broken down into amino acids and then into urea and creatinine (Pari and Amudha, 2011). From a physiological point of view, the kidney is particularly sensitive to the action of toxins, due to its intense metabolic activity and its multiple functions, particularly those of excretion and concentration of xenobiotics (Sunderman et al. 2001). The results recorded in poisoned rats showed an accumulation of Ni in the kidney. Tikare et al. (2013) revealed that nickel accumulates in the kidneys, where it induces lesions in the glomeruli and proteinuria, indicating the onset of transient renal failure, with a decrease in glomerular filtration (Adeyemi et al., 2014). On the other hand, the increase in serum uric acid concentration in our study is explained by the intense deg-

radation of genetic material (DNA and RNA) (Cavallo et al., 2003). Otherwise, the high level of circulating uric acid may be an indicator of the body's defence against the deleterious effects of free radicals, of which it increases the production

of endogenous antioxidants, among which uric acid, which prevents oxidative changes in endothelial enzymes and preserves the capacity of the endothelium to mediate vascular dilations to cope with oxidative stress (Patel et al., 2012; Becker et al., 1993).

On the other hand, after treatment with EOHA in Ni intoxicated rats, a decrease in urea, uric acid and creatinine was observed, as well as, the histological study company has shown a clear improvement in renal tissue architecture in poisoned rats treated with EOHA. Our results are consistent with the work of Alqasoumi, et al. (2012) who evaluated that Haloxylon extract has a hepatonephroprotective effect.

Concerning the oxidative effect, the nickel treatment showed a remarkable alteration of the antioxidant defence systems (enzymatic and non-enzymatic). At the same time, previous research had indicated the involvement of oxidative stress in the toxicity mechanisms induced by nickel (Cavallo et al., 2003). In fact, oxidative stress is the result of multi-step processes caused by an imbalance in the balance between pro-oxidants and antioxidants (enzymatic and non-enzymatic) and leading to tissue damage leading first to many diseases and eventually to apoptosis (Lee et al., 2016). Thus, exposure to heavy metals, including nickel, can induce a state of oxidative stress either by increased production of free radicals that accumulate in the cell, or by alteration of antioxidant defence mechanisms, including detoxification and scavenging enzymes, or by increased lipid peroxidation as a result of the interaction between Oxygen Reactive Species (ORS) and cell membranes (Attig et al., 2010).

In this study, nickel exposure resulted in a decrease in glutathione (GSH) levels and in the enzymatic activities of catalase and glutathione peroxidase (GPx) compared to the control batch. Nickel phagocytised by the cell increases the activity of free radicals, catalyses DNA transformation and can cause cancer, through

numerous reactions, producing toxic intermediate metabolites such as peroxides (Lou et al., 2013). These compounds are involved in redox or conjugation reactions requiring reduced glutathione, leading to its high consumption, and thus its depletion in living cells (Aouacheri et al., 2009), which clearly explains the critical role of reduced glutathione in the biotransformation of exogenous substances including heavy metals (SanMiguel et al., 2013). Our results corroborate all these observations and are consistent with the induction of ROS by this metal. The cell has for its protection to the GSH carrying a thiol function which constitutes an antioxidant system of the first defence by binding by its SH function to toxic metabolites. It also plays its antioxidant role in synergy with antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase (Loo et al., 2013).

Nickel leads to the formation of free radicals responsible for the oxidation of lipids, proteins and DNA (Rao et al., 2009; Lou et al., 2013), and consequently, the reduction of the antioxidant system including GSH content during the elimination of toxic metabolites formed by nickel (EL-Demerdash et al., 2012). However, EOHA- treated nickel poisoned rats compared to nickel poisoned rats showed a remarkable improvement in antioxidant defense system. This can be explained by the scavenger effect of polyphenols against oxygen radicals, i.e. instead of the free radicals produced by nickel being neutralised by GSH, they are captured by the polyphenols, thus maintaining normal cell glutathione levels (Oda et al., 2012; Mariod et al., 2009). In addition, the observed increase in glutathione peroxidase GPx and catalase activity in the kidney following treatment with EOHA (polyphenol-rich) compared to nickel poisoned rats may be due to its indirect action in reducing the levels of reactive oxygen species, thus resulting in reduced oxidative stress (Hattiwale et al., 2013; Mariod et al., 2009). These biochemical alterations in renal markers are supported by kidney tissue damage, showing that subchronic oral exposure of nickel leads to multiple kidney necroses associated with ultra-structural changes. These histopathological observations are in agreement with those found by Das and

Buchner, (2007). However, other studies show that antiradical activity is correlated with the level of polyphenols and flavonoids in medicinal plant extracts (Mariod et al., 2009).

5. Conclusion

Exposure of rats to Ni revealed nephrotoxic effects that resulted in a significant alteration of the antiradical system represented by the various enzymes. Treatment with EOHA in previously intoxicated rats showed a significant improvement in the histopathological image of the kidney as well as the biochemistry of renal function.

References

- Adeyemi OS, Elebiyo TC (2014) Moringa oleifera supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in wistar rats. Journal of nutrition and metabolism <https://doi.org/10.1155/2014/95862>
- Adli D E H, Kahloula K, Slimani M, Brahmi M, Benregueig M (2017) Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygiumaromati-cum* chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse. Phytothérapie 1-7
- Alghazeer R, El-Saltani H, Saleh N, Al-Najjar A, Hebail F (2012) Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. Natural Science 4(5): 324-335.
- Alqasoumi SI, Soliman GAEH, Awaad AS, Donia AERM (2012) Anti-inflammatory activity, safety and protective effects of *Leptadenia pyrotechnica*, *Haloxylon salicornicum* and *Ochradenus baccatus* in ulcerative colitis. Phytopharmacology 2(1): 58-71
- Andre CM, Oufir M, Hoffmann L, Hausman JF, Rogez H, Larondelle Y, Evers D (2009) Influence of environment and genotype on poly-phenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Food Composition and Analysis 22(6): 517-524
- Aouacheri W, Saka S, Djafer R (2009) The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of the enzymatic detoxification system of glutathione. Ann. Toxicol. Anal 21(3): 125-129
- Attig H, Dagnino A, Negri A, Jebali J, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F, Banni M (2010) Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. Ecotoxicology and Environmental Safety 73(7): 1712-9
- Bajpai VK, Rahman A, Kang SC (2008) Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandinadomestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology 125:117-122
- Bancroft JD (1975) Histopathological stains and their diagnostic uses. Edinburgh London and New York: Churchill Livingstone.
- Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. Free. Radic. Boil. Med 14:615-13
- Bisson A (2012) Manganese and its derivatives. INERIS-fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques 2:5-30.
- Bourogaa E, Jarraya RM, Nciri R, Damak M, Elfeki A (2014) Protective effects of aqueous extract of *Hammada scoparia* against hepatotoxicity induced by ethanol in the rat. Toxicology and Industrial Health 30 (2): 113-22.
- Capasso L, Camatini M, Gualtieri M (2014) Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. Toxicology Letters 226:28-34
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013a) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology 51: 15-25
- Cavallo D, Ursini CL, Setini A, Chianese C, Piegari P, Perniconi B, Iavicoli S (2003) Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. Toxicology In Vitro 17(5-6): 603-607
- Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Atik-Bekkara F (2014) Evaluation of antioxidant activity of hydromethanolic extracts of some medicinal species from South Algeria. Journal of the Chinese Medical Association 77(6): 302-307
- Chau Y, Kulikovskiy-Cordeiro O (1995) Occurrence of nickel in the Canadian environment. Environmental Reviews 3:95-120
- Das KK, Gupta AD, Dhundasi SA, Patil AM, Das SN, Ambekar JG (2007) Protective role of L-ascorbic acid on antioxidant defense system in erythrocytes of albino rats exposed to nickel sulfate. Biometals 20(2):177-184
- Dumala N, Mangalampalli B, Kamal SK, et al., (2017) Biochemical alterations induced by nickel oxide nanoparticles in female Wistar albino rats after acute oral exposure. Biomarkers 22:1-11
- Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H (2002) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). Journal of Ethnopharmacology 82:97-103
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77.
- Hattiwale SH, Saha S, Yendigeri SM, Jargar JG, Dhundasi SA, Das KK (2013) Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. Biometals 26: 329-336
- Henderson RG, Durando J, Oller AR, Merkel DJ, Marone PA, Bates HK (2012) Acute oral toxicity of nickel compounds. Regulatory Toxicology and Pharmacology 62:425-432
- Hoffman RP, Dye AS, Bauer JA (2012) Ascorbic acid blocks hyperglycemic impairment of endothelial function in adolescents with type 1 diabetes. Pediatric Diabetes 13(8): 607-10
- Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A (1986) Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Product Isolation, Springer-Verlag, Berlin.
- Kahloula K, Adli D E H, Slimani M, Terras H, Achour S (2014) Effet de l'exposition chronique au nickel sur les fonctions neurocompor-

- tementaies chez les rats Wistar pendant la période de développement. *Toxicologie Analytique et Clinique* 26(4): 186-192
- Kakkar P, Das B, Viswanathan PN (1984) A modified spectrophotometric assay superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 21:130-2
- Kaplan A et al (1984) *ClinChem The C.V. Mosby Co.* St Louis. Toronto. Princeton 1261-1266 and 418
- Kelen M, Tepe B (2008) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* 99: 4096- 4104
- Lahlou M (2004) Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448
- Lee YJ, Lim SS, Baek BJ, An JM, Nam HS, Woo KM, Cho MK, Kim SH, Lee SH (2016) Nickel(II)-induced nasal epithelial toxicity and oxidative mitochondrial damage. *Environ. Toxicology and Pharmacology* 42:76-84
- Lou J, Jin L, Wu N, Tan Y, Song Y, Gao M, Liu K, Zhang, He J (2013) DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. *Food and Chemical Toxicology* 55: 533-540
- Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N (2009) Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry* 116(1):306
- Miura K, Tada Y (2014) Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science* 5, 4
- Murray RL, Kaplan A et al, (1984) *ClinChem The C.V. Mosby Co.* St Louis. Toronto. Princeton 1261-1266 and 418
- Oda SS, El-Maddawy ZKH (2012) Protective effect of vitamin E and selenium combination on deltamethrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64: 813-819
- Pari L, Amudha K (2011) Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology* 650: 364-370
- Patel E, Lynch C, Ruff V, Reynolds M (2012) Co-exposure to nickel and cobalt chloride enhances cytotoxicity and oxidative stress in human lung epithelial cells. *Toxicol. Applied Pharmacology* 258:367-375
- Quezel P, Santa S (1962) *New flora of Algeria and southern desert regions.* Tome I, C.N.R.S.Paris.
- Rao MV, Chawla SL, Sharma SR (2009) Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food and Chemical Toxicology* 47(6): 1368-71
- Razavipour ST, Behnammorshedi M, Razavipour R, et al., (2015) The toxic effect of nickel nanoparticles on oxidative stress and inflammatory markers. *Biomedical Research* 26:370-4
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB (1973) Selenium. *Science* 179: 588-590
- Salah HB, Raoudha R, Marie-Thérèse M, Nigel CV, Renée JG, Monique S J S, Mohamed D (2002) Flavonol triglycosides from the leaves of *Hammada scoparia* (POMEL). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50:1268-1270
- Sunderman FW, Hopfer SM, Sweeney KR, Marcus AH, Most BM, Creason J (2001) Nickel absorption and kinetics in human volunteers. *J Biol.Chem* 276(25): 22223-22230
- Tikare S, Yendigeri S, Das GA, Salim AD, Das KK (2013) Protective effect of α -tocopherol against hematotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by nickel sulfate in male albino rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 57(3): 280-292
- Torres SJ, Nowson CA (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23(11):887-894
- Vinay D, Richa S, Showket H (2011) Comparative Anticancer Potential of Clove (*Syzygium aromaticum*) - an Indian Spice - Against Cancer Cell Lines of Various Anatomical Origin. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12:189-193
- Vyskocil A, Viau C, Cizkova M (1993) Chronic nephrotoxicity of soluble nickel in rats. *Human and Experimental Toxicology* 13(10): 689-93
- Yu S, Liu F, Wang C, et al., (2018) Role of oxidative stress in liver toxicity induced by nickel nanoparticles in rats. *Molecular Medicine Reports* 17:3133-9