

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de M'sila
Faculté des sciences



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme

Master académique de l'université de M'sila

Délivré par : Département de Microbiologie et de biochimie
Discipline ou spécialité : Analyses Biochimiques

Présenté et soutenu par
KADI Imed Eddine

Le 22 Juin 2014

**L'effet du prétraitement par la vitamine C sur
la néphrotoxicité aigue du nickel chez les souris males**

Devant le jury

Président : M ^r GUETTOUACH M.	MAA.	<i>université de M'sila</i>
Promoteur : M ^r DAHDOUH F.	MAA.	<i>université de M'sila</i>
Examineur : M ^r BENKHALED A.	MAA .	<i>université de M'sila</i>
Examineur : M ^r BELABESS A.	MAA .	<i>université de M'sila</i>

Année universitaire : 2013 – 2014

Sommaire

Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
المخلص	
Abstract	
Résumé	
Introduction	01

Chapitre 01 : Synthèse bibliographique

1 . Nickel ; Caractéristiques et toxicité	03
1-1- Généralité.....	03
1-2- Sources d'exposition.....	04
1-3- Usage des composés de nickel.....	05
1-4- Evaluation toxicologique.....	07
1-4-1- Toxicité aiguë.....	07
1-4-2- Toxicité chronique et subchronique.....	07
1-4-3- Cancérogénicité.....	08
1-4-4- Toxicité hépatique et rénale.....	08
1-4-5- Toxicité pulmonaire.....	09
1-5- Hématotoxicité de nickel	09
1-6- Le nickel et le stress oxydatif.....	09
2- Vitamine C (ascorbique acide)	
2-1- Généralité.....	11
2-2- Caractéristiques physico-chimiques.....	12
2-3- Métabolisme de la vitamine C.....	12
2-4- Distribution de la vitamine C et son transport.....	13
2-5- Rôles de la vitamine C dans les voies biologiques.....	13
2-6- Biosynthèse de la vitamine C.....	14
2-7- Sources alimentaires.....	14

Chapitre 02: Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes.....	15
1_ Matériels.....	15
1-1- Matériel biologique.....	15
1-2- Matériel chimique.....	15
2- Méthodes.....	15
2-1- Evaluation toxicologiques et traitements des souris.....	15

2-2- Prélèvement des échantillons.....	19
2-3- Prélèvement des organes.....	19
2-4- Dosage des paramètres biochimiques.....	19
2-4-1- Dosage de l'urée.....	19
2-4-2- Dosage de la créatinine.....	19
2-4-3- Dosage de l'acide urique.....	20
2-4-4- Dosage des lipides totaux.....	20
2-4-5- Dosage des protéines totales.....	20
2-5- Evaluation histologique.....	20
2-6- Analyse statistique.....	21

Chapitre 03 : Résultats

1- Effet des traitements sur les paramètres physiologiques.....	22
1-1- Effet sur l'évolution de poids corporel des souris.....	22
1-2- Effet sur le poids absolu et relatif des reins.....	25
2- Effet des traitements sur les bio-marqueurs biochimiques de l'exploration rénale en fonction des différentes doses de nickel.....	27
3- Effet des traitements sur le taux des lipides totaux et des protéines totales.....	31
4- Effet des traitements sur les bio-marqueurs biochimiques de l'exploration rénale en fonction de différente durée d'exposition.....	34
5- Evaluation histo-pathologiques de l'organe excréteur (reins).....	37
5-1- Evaluation histo-pathologiques en fonction de la dose.....	37
5-2- Evaluation histo-pathologiques en fonction de durée d'exposition.....	39

Chapitre 04 : Discussion, Conclusion générale et perspectives

* Discussion.....	41
*conclusion générale.....	45
*Perspectives.....	45

Références bibliographiques

*Références bibliographiques

Annexes: Fiches techniques des dosages biochimiques

- * Fiches techniques des dosages biochimiques.
- *Tableaux des mesures du poids et des paramètres biochimiques.
- *Schéma récapitulatif des résultats .

Remerciements

*Au terme de ce travail , je tiens a exprimer toute ma reconnaissance et mon profond respect au monsieur **DAHDOUH Faouzi** . **MAA** a l'université de M'sila pour avoir accepté de m'encadrer et qui ma fait confiance et apporté ses conseils tout au long de réalisation de ce travail . Merci pour son accueil , sa disponibilité , et son enthousiasme .*

*J'adresse aussi mes sincères remerciements au Monsieur **GUETTOUACH M.** maitre assistant a l'université de M'sila pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce mémoire.*

*C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment monsieur **BENKHALED A.** chef de département de Microbiologie & Biochimie a l'université de M'sila pour avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Je tiens également a adresser mes plus chaleureux remerciements au monsieur **BELABBES H.** maitre assistant a l'université de M'sila pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens a exprimer ma profonde reconnaissance au **M^{ame} BENTOUMI** , responsable du laboratoire d'analyses médicales pour l'aide permanente tout au long de ma pratique au laboratoire*

*J'exprime toute ma gratitude et mes vifs remerciements au **M^r BENAROUDJ** professeur en cytologie et anatomo-pathologie pour leur disponibilité et leurs précieux conseils pour réaliser l'étude histologique de ce travail.*

Mes plus sincères remerciements a l'ensemble des techniciens du laboratoire de biochimie , pour l'intérêt qu'ils ont porté a ce travail et a l'aide pour l'élaboration de ce mémoire.

Je remercie aussi mes collègues et mes amis pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble . et également a l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de plus ou de loin a la réalisation de ce travail .

Dédicaces

JE DÉDIE CE TRAVAIL A MES PARENTS QU'ILS
TROUVENT ICI TOUTE MA GRATITUDE

Liste des tableaux

Numéro	Titre	page
01	Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel métal.	03
02	Composition du régime croquette (ONAB Bejaia)	15
03	Effets des traitements sur le poids absolu et relatif des reins.	26

Liste des figures

Numéro	Titre	page
01	Schéma générale de la toxico-cinétique de nickel dans l'organisme	05
02	Effet carcinogène du nickel	10
03	La structure de l'acide L-ascorbique (la vitamine C)	11
04	Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant 7jours, les souris traités en 8eme jour par 5mg Ni(II)/kg PC (IP) et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8eme jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (en 9 eme jours).	23
05	Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant sept jours, les souris traités en 8eme jour par (IP) du 3mg et 10mg Ni(II)/kg PC (IP) et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8eme jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 3mg et 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (en 9 eme jours).	23
06	Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant 7 jours, les souris traités en 8eme jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8eme jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 6 heures (en 198 eme heures).	24
07	Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC), les souris traités en 8eme jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8eme jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 48 heures (en 240 eme heures).	24
08	Variation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique entre les souris témoins et les souris traités par 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ Kg de poids corporel de l'animal par voie intrapéritonéale et pour une durée d'exposition de 24 heures.	28

09	Effet du prétraitement par la vitamine C sur la variation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique après injection intra - péritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.	29
10	Pourcentage d'augmentation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.	30
11	Effet du prétraitement par la vitamine C sur la variation des concentrations sériques des lipides totaux et protéines totales après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ Kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.	32
12	Pourcentage d'augmentation des concentrations sériques des lipides totaux et protéines totales après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.	33
13	Effet du chlorure de nickel administré par voie intrapéritonéale en raison de 5mg/kg de poids corporel en fonction de différentes durée d'exposition (6 h, 24 h et 48h) sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale. Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm SEM$	35
14	Effet du chlorure de nickel administré par voie intrapéritonéale en raison de 5mg/kg de poids corporel en fonction de différentes durée d'exposition (6 h, 24 h et 48h) sur les protéines totales et les lipides totaux . Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm SEM$	36
15	Coupes histologiques des reins des souris témoin (A), les traités par la vitamine C (16.66mg/kg) (B), les traités par le chlorure de nickel aux différentes doses 3mg/kg (C), 5mg/kg (D) et 10mg/kg (E) et les prétraités par la vitamine C suivie par une injection intra- péritonéale de nickel; Vit C + Ni(II) 3mg/kg (F), Vit C + Ni(II) 5mg/kg (G) et Vit C + Ni(II) 10mg/kg (H). Gr: x40.	38
16	Coupes histologiques des reins des souris traités par le chlorure de chlorure de nickel à raison de 5mg/kg aux différentes durée d'exposition ; 6h, 24h et 48h (I, J, K), et les prétraités par la vitamine C suivie par une injection intra péritonéal de nickel; Vit C + Ni(II) 5mg/kg 6 h, 24h et 48h (L, M, N) Gr: x40.	40

Liste des abréviations

GSH	Glutathion
MTS	Métallo thionine
ERO	Espèces réactifs oxygénés
SOD	Super oxyde dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathion peroxydase
SVCT	Sodium dépendent vitamin C transporter
NADP	Nicotinamide adénine di nucléotides phosphate
IP	Intraperitoniale
PC	Poids corporel
SEM	Erreur standard de la moyenne
ANOVA	Analyse de variance
ns	Non significative
DL50	Dose létale 50
Ni(II)	Cation (+2) de Nickel

Abstract

Exogenous antioxidant substances are considered to be helpful in attenuating toxic effects and carcinogenicity of heavy metals. Therefore, this study was devoted to evaluate whether pretreatment with vitamin C could attenuate nickel induced nephrotoxicity in dose response and time course in mice. In this investigation nickel chloride (5 mg/kg b.wt) was administered intraperitoneally for 24 hours to induce acute toxicity. Vitamin C (16.66mg/kg b. wt/per day) was administered by oral gavage to mice for 7 days. For Ni(II) + Vit C, mice were administered orally by vitamin C for 7 days. On the 8th day, NiCl₂ (5 mg Ni/kg b. wt.) was injected i.p. to Vit C- for 24 hours. In dose response, mice were treated with 3mg, 5mg and 10mg Ni(II)/kg b.wt for 24 hours. In time course, mice were injected with 5mg Ni(II)/kg b.wt for 6 hours, 24 hours and 48 hours. Pretreatment with vitamin C along with nickel chloride in dose dependant and time course was also studied in mice. Vitamin C pretreatment alone did not disturb kidney function. Nickel caused in dose and time dependent manner a significant decrease in final body weight along with significant increase in kidney-body weight ratio and the serum levels urea, creatinine, uric acid, total lipids and total proteins as compared to controls. The extent of kidney marker alterations in Vit C + Ni treated mice was attenuated when compared with nickel alone and to control treated mice. Pretreatment with Vit C reduced the increased biochemical markers in the kidney caused by Ni injection. We therefore conclude that the effect of Vit C pretreatment on Ni toxicity is more efficient in dose and time dependent.

Key words: Pretreatment, vitamin C, nickel, nephrotoxicity, time course and dose response.

Résumé

Les Substances antioxydantes exogènes sont utilisées pour atténuer les effets toxiques et cancérigènes de métaux lourds. Par conséquent, cette étude a été consacrée pour évaluer le prétraitement par la vitamine C et son pouvoir d'atténuer la néphrotoxicité de Nickel en dose-réponse et en fonction du temps d'exposition chez les souris. Dans cette enquête le chlorure de nickel (5 mg / kg de poids corporel) a été administré par voie intrapéritonéale pendant 24 heures pour induire une toxicité aiguë. La vitamine C (16.66mg/kg de poids corporel / par jour) a été administré par gavage aux souris pendant 7 jours. Pour Ni (II) + Vit C, les souris ont été administrés par voie orale de la vitamine C pendant 7 jours. En 8^{ème} jour, NiCl₂ (5 mg Ni / kg de poids corporel.) a été injectée ip pendant 24 heures. En dose – réponse , les souris ont été traitées avec 3 mg, 5 mg et 10 mg de Ni (II) / kg poids corporel pendant 24 heures. En fonction du temps, les souris ont été injectées avec 5 mg de Ni (II) / kg poids corporel à 6 heures, 24 heures et 48 heures. Le prétraitement avec de la vitamine C avec le chlorure de nickel en dose-réponse et en fonction du temps a également été étudiée. Le prétraitement par la vitamine C seul ne perturbe pas la fonction rénale. Le nickel a provoqué en dose et au temps de manière dépendante une diminution significative de poids corporel final en même temps que l'augmentation significative du rapport de poids du corps et les reins, du taux sériques de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, des lipides totaux et des protéines totales par rapport aux ceux enregistrés chez les souris témoins. L'ampleur de la modification des biomarqueurs biochimiques de fonction rénale chez les souris traitées Vit C + Ni a été atténuée en comparaison avec ceux traités au nickel seul et les témoins. Un prétraitement avec Vit C réduit l'augmentation des marqueurs biochimiques dans le rein causées par l'injection de nickel. Nous concluons donc que le prétraitement par la vitamine C a un effet bénéfique sur la toxicité de nickel en fonction de la dose et en fonction du temps.

Mots clés: Prétraitement , nickel, Vitamine C, néphrotoxicité, temps et dose réponse,

الملخص

تعتبر المواد المضادة للإجهاد التأكسدي ذات المصدر الخارجي مفيدة في تخفيف حدة السمية وأمراض السرطان للمعادن الثقيلة ، لذلك أجريت هذه الدراسة على غرار معرفة إذا كانت المعالجة القبلية بالفيتامين C قادرة على تخفيف التسمم الكلوي للنيكل وذلك في تغيير نظام الجرعة مع الاستجابة الجسمية ، وتغيير مدة التعرض للمادة السامة . في هذه الدراسة 5ملغ من النيكل حقنت في المجرى تحت الفخذ لمدة 24 ساعة وذلك لإحداث التسمم الحاد . الفيتامين C (16.66 مغ/كغ وزن جسمي) أدخلت عن طريق الفم للفئران لمدة 7 أيام . للمعالجة ب(النيكل+فيتامينC) عولجت الفئران بفيتامين C عن طريق الفم لمدة سبع أيام وفي اليوم الثامن تلقت 5 مغ/كغ وزن جسمي من كلوريد النيكل عن طريق الحقن تحت الفخذ لمدة 24 ساعة . الدراسة السمية بتغيير جرعات النيكل واستجابة الفئران ، عولجت الفئران ب 3ملغ،5ملغ،10ملغ من النيكل /كغ وزن جسمي لمدة 24 ساعة . الدراسة السمية لتغيير مدة التعرض للمادة السامة ، عولجت الفئران ب 5ملغ/كغ وزن جسمي عن طريق الحقن تحت الفخذ لمدة 6 ساعات ، 24 ساعة ، و 48 ساعة .المعالجة القبلية بالفيتامين C لوحده لم تبين اضطرابات في الوظيفة الكلوية ، إضافة إلى ذلك أدى عنصر النيكل إلى انخفاض ملحوظ في الوزن الجسمي النهائي مع ارتفاع في نسبة الوزن الكلوي و الوزن الجسمي و المستوى المصلي لمادة اليوريا ، الكرياتينين ، و الحمض اليوري و البروتينات و الليبيدات الكلية وذلك وفقا لتغيرات جرعات النيكل ومدة التعرض للمادة السامة . التأثير واسع المدى على المعايير الكلوية لفيتامين C و النيكل قد انخفضت على الفئران مقارنة مع الفئران المعالجة بالنيكل فقط ومع مجموعة السيطرة .المعالجة القبلية بالفيتامين C خفضت من حدة تأثير النيكل المؤدي إلى ارتفاع في تراكيز المعايير البيوكيميائية للكلية . و خلاصة لذلك ، المعالجة القبلية بالفيتامين C على سمية عنصر النيكل تعتبر جد فعالة وفقا لتغير الجرعات و مدة التعرض للمادة السامة

الكلمات الدلالية : المعالجة القبلية ، فيتامين C ، النيكل ، التسمم الكلوي

Introduction

Introduction

Le développement rapide des sciences technologiques, des industries (chimiques et métalliques), de la médecine, et de l'agriculture a exposé l'homme et son environnement aux nombreux métaux lourds toxiques. Ces derniers, en plus d'être toxiques à des faibles concentrations, ont tendance à s'accumuler dans les organismes vivants car leurs taux d'excrétion est plus faible que le taux d'absorption.

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

Le nickel est un élément trace, ses applications industrielles sont nombreuses; Production de batteries, alliages métalliques, industrie du tabac, de la céramiques, fabrication des organes artificiels et des prothèses dentaires, etc. Les ions Ni^{+2} ont des effets oxydatifs, hépatotoxiques et néphrotoxiques sur la santé publique comparables à ceux d'autres métaux lourds. Le nickel phagocyté par la cellule augmente l'activité des radicaux libres oxygénés, catalysent la transformation de DNA et peuvent causer un cancer (**Tikare et al., 2013; Hattiwale et al., 2013**). De nombreuses études ont montré que l'exposition chronique, aiguë et subchronique au nickel peut produire potentiellement des perturbations métaboliques et fonctionnelles (**Pari & Amudha, 2011**). Elle a été documentée que la vitamine C (acide ascorbique) est un potentiel agent antioxydant, capable d'éliminer les radicaux libres issues de stress oxydatif responsable à l'induction des différentes maladies et pathologies, via la production des espèces réactives de l'oxygène, et par conséquent, elle assure la protection de l'organisme contre les effets hépatotoxiques (**Ebuehi et al., 2013**) et néphrotoxiques (**Atasayar et al., 2008**) des métaux lourds. La littérature scientifique internationale a accumulé une masse considérable de preuves attestant de l'extrême toxicité des métaux lourds pour les êtres humains (**Henderson et al., 2012**). Les effets préventifs de la vitamine C sur l'hépatotoxicité (**Das et al., 2013; Ebuehi et al., 2012**), le néphrotoxicité (**Atasayar et al., 2008**) et l'hématotoxicité (**Das et al., 2007**) des métaux lourds ont été bien documenté. Cependant, certains chercheurs ont étudié les effets du vitamine C sur l'hépatotoxicité (**Rao et al., 2009; Kasprzak et al., 2011**) et l'hématotoxicité

du nickel (**Das *et al.*, 2007**). Mais l'effet néphroprotecteur de la vitamine C sur la toxicité du nickel reste mal élucidé. A cet effet, notre travail a pour but d'explorer l'effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité du nickel en dose-réponse et en fonction de temps sur la fonction rénale chez des souris blancs de sexe male.

Au vu de ces données, dans notre étude nous allons dans un premier temps dans la partie bibliographique présenter d'une part quelques connaissances acquises sur le nickel dans l'environnement et son comportement dans les systèmes biologiques et d'une autre part aborder sur la bibliographie de la vitamine C. Puis dans la partie expérimentale, nous intéressons aux effets néphrotoxiques du nickel suite au détermination de quelques biomarqueurs biochimiques de la fonction rénale . et étudions l'effet protecteur de la vitamine C .

Chapitre 1

Synthèse

bibliographique

1. Nickel ; Caractéristiques et toxicité

1.1. Généralité

Le nickel (Ni) est un métal blanc bleuâtre, brillant, dur, ductile et malléable. Il doué des propriétés ferromagnétiques et résiste à l'oxydation. C'est également un bon conducteur électrique et thermique. Ubiquitaire, il est présent naturellement dans l'environnement, non comme élément mais dans des minerais (**Haber et al., 2000**). Le Nickel (Ni) est le 24^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre, comportant environ 3% de composition de la terre. De plus, il est le 5^{ème} élément le plus répandu en poids après le Fer, l'oxygène, magnésium et silicium (**Cempel, 2006**). Le nickel a été découvert en 1921 par le chimiste Suédois *Alex Cronstedt*. Le nickel 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} (**Haber et al., 2000**). Dans l'environnement, le nickel provient essentiellement des minerais sulfurés extraits de sous-sols et dans les minéraux silicatés se trouvant en surface. Le nickel métallique ne se rencontre pas fréquemment dans la nature, il existe sous forme d'un alliage Fer- Nickel dans certaines roches ultramafiques riche en fer et en magnésium (**Das et al., 2006**). De plus, le nickel provient des rejets industriels, des poissons contaminés par l'eau de mer, de la circulation urbaine, des végétaux qui se trouvent à proximité des sources d'émission de raffineries et du tabac. Les personnes les plus contaminées sont les garagistes, les fumeurs et certains professionnels exposés (**Chakroun et al., 2002**).

Tableau 01 : Quelques caractéristiques physico-chimiques du nickel métal (**Ajith et al., 1997**).

Caractères physico-chimiques	Donnés bibliographiques
Masse molaire	58,69 g/mole
Point de fusion	1455 °C
Point d'ébullition	2730 °C
Densité	8,9 g/cm ³
Solubilité	Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Mais, il dissout lentement dans les acides forts.

1.2. Sources d'exposition

L'homme et l'animal peuvent être exposés aux composés de nickel à travers la consommation d'eau et de la nourriture contaminés par les produits métalliques contenant de nickel même à des faibles concentrations (**Cempel et al., 2005**). Le nickel atmosphérique peut être venir de la poussière dérivée de la désintégration des roches et des sols, les émissions volcaniques et les feux des forêts. Mais généralement les concentrations les plus élevés de nickel dans l'air sont remarquées dans les pays industrialisés (**Das et al., 2006**). De plus, le tabac et les implants dentaires ou orthopédiques présentent des niveaux faibles d'exposition au nickel (**Cempel and Janicka, 2002**).

En cas d'exposition professionnelle, la principale voie de pénétration dans l'organisme est l'absorption par voie respiratoire. Le dépôt, la rétention au niveau du tractus respiratoire et l'absorption du nickel après inhalation dépendent des caractéristiques physico-chimiques des particules inhalées. La solubilité et la taille géo-dynamique des particules étant des facteurs déterminants. Chez l'homme, environ 20 à 35 % du nickel déposé au niveau des poumons sont absorbés. Le reste est expectoré, ingéré ou alors retenu au niveau du tractus respiratoire (**Hattiwale et al., 2013**). De façon schématique, les composés solubles sont facilement absorbés, des composés tels le sulfate, le chlorure et le nitrate de nickel (11 %, 9,8 % et 34 % respectivement) sont donc rapidement absorbés. En revanche, les composés moins solubles comme le subsulfite et l'oxyde de nickel (0,47 %, 0,01 % respectivement) sont absorbés très lentement. Ces valeurs d'absorption en % sont en relation avec la solubilité des différents composés de nickel (**Haber et al., 2000**). Dans le plasma, le nickel est essentiellement lié à l'albumine, l'alpha 2 globuline et à la L-histidine avec une demi-vie d'absorption chez l'homme variant de 1 à 2 jours (**Das and Saha, 2010**). Chez l'animal, Après exposition par voie orale, la distribution du nickel s'effectue principalement dans les reins, mais il est également retrouvé au niveau du foie, du cœur, des poumons, du tissu adipeux, du système nerveux périphérique et du cerveau (**ATSDR, 1997**). Après administration intra trachéale, la voie d'élimination du nickel chez les rats dépend de la solubilité des composés; Pour les composés solubles (chlorure, sulfate), environ 70 % de la dose administrée est excrétée dans l'urine en 3 jours. Pour les composés moins solubles (oxyde, disulfure de trinickel), une grande partie de la dose est excrétée dans les fèces (**ATSDR, 1997**). Le nickel n'est pas un toxique cumulatif, la majorité de la quantité absorbée est rapidement excrétée avec une demi-vie comprise entre 17 et 39 heures chez les travailleurs essentiellement exposés aux dérivés de nickel (**Lauwerys, 2000**). Ainsi la concentration de nickel dans l'urine et le plasma constitue

un indicateur valable d'une exposition aux dérivés solubles du nickel (**figure 1**) (**Lauwerys, 2000**).

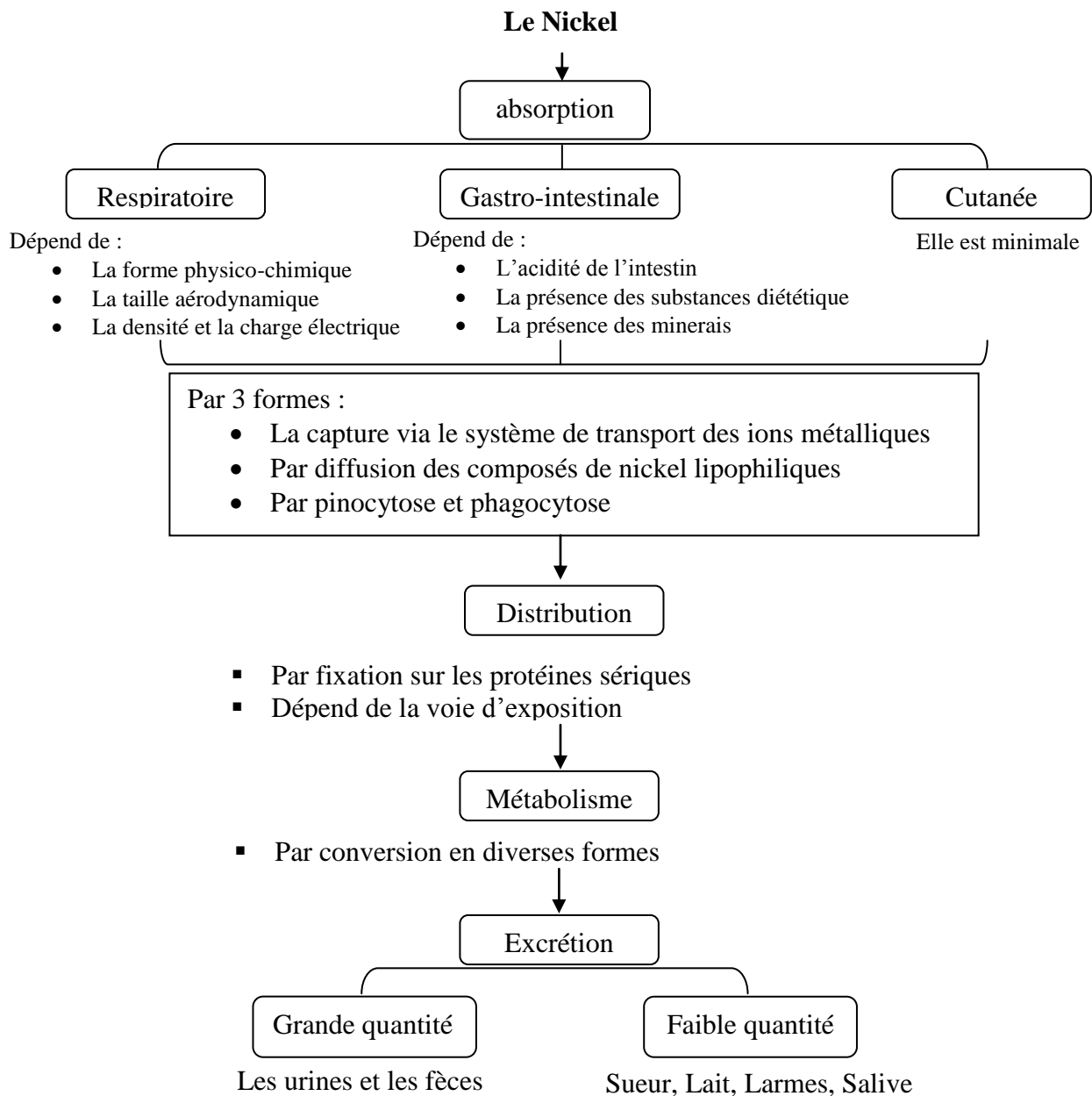


Figure 01: Schéma générale de la toxico-cinétique de nickel dans l'organisme (**Alexandra et al., 2011; Das et al., 2008**).

1.3. Usages des composés de nickel

Les composés du nickel sont employés dans divers produits et procédés:

- Le carbonate tétrahydroxytrinickel est employé pour le revêtement électrolytique, comme catalyseur pour céramique.
- Le carbonate de nickel est employé dans des pièces électroniques.
- Le dichlorure de nickel anhydre sert d'absorbant pour l'ammoniac dans les masques à gaz et pour le nickelage.
- Le dihydroxyde de nickel est employé pour la fabrication des électrodes dans les piles secondaires.
- Le monoxyde de nickel est principalement utilisé dans les opérations métallurgiques, où il constitue une importante matière première pour les procédés de fonte et de production d'alliages, et il est aussi employé dans la fabrication des catalyseurs et des solutions électrolytiques dans les piles nickel-cadmium (**Das et al., 2013 ; Pari amudha, 2011**).

1.4. Evaluation toxicologique

1.4.1. Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë accidentelle par voie orale provoque essentiellement des troubles digestif (nausée, vaniteusement, diarrhée, douleur abdominale), des céphalées et une asthénie associe parfois à une bradycardie et une légère hyperthermie. Ces signes cèdent assez rapidement mais dans certains cas, peuvent persister quelques jours. D'après un rapport récent, l'ingestion chez plusieurs personnes de 15 à 45 mg/Kg de nickel en 24 heures (sous formes de chlorure) a entraîné également, dans quelques cas, une petite élévation de la bilirubinémie (**Brouwere et al., 2012**). Un cas mortel à été signalé; celui d'un enfant ayant ingéré environ 200 mg/kg de nickel (sous forme de sulfate). L'emploi des sels de nickel dans l'industrie peut produire une dermatite, cette lésion appelée eczéma du nickel « Nickel itch »; apparaît surtout chez les travailleurs occupés aux opérations de nickelage. Il s'agit d'un eczéma allergique, cependant que l'allergie respiratoire est rare (**Lauwerys, 2000**). Des études ont été pointé sur des animaux de laboratoire et in vitro, indiquent que les sels solubles de nickel tel que le dichlorure, le sulfate et le nitrate de nickel ont une toxicité aiguë qui varie de modérée à très élevée chez le rat [(DL₅₀)] de 42,5 à 112 mg/Kg de masse corporelle, alors que la poudre de nickel et les sels de nickel insolubles (monoxyde de nickel vert ou noir, disulfure de trinickel et sulfure de nickel amorphe) présentent une toxicité plus faible (DL₅₀ de 3235 à 9000 mg/Kg(m.c) (**Haney et al., 2012**). Chez les rats exposés à l'acétate de nickel à la concentration de 500 ou 1000 mg/kg d'aliment, durant six semaines ont montré une réduction de gain du poids corporel, une diminution du taux d'hémoglobine et l'activité de la phosphatase alcaline dans le plasma. Cependant, les rats exposés à 100 mg/kg (équivalent à 5 mg/kg/j) d'acétate de nickel dans l'alimentation ne présentent pas des effets toxiques. D'autres études ont montré que les souris traitées par le chlorure de nickel hexahydraté à raison de 108 à 150 mg/kg de poids corporel, par voie orale pendant huit semaines présentant un œdème des principaux organes, des altérations glomérulaires et une nécrose tubulaire (**Haber et al., 2000**).

1.4.2. Toxicité chronique et subchronique

Dans une étude de toxicité chronique au cours de laquelle des rats ont été exposés pendant deux années au sulfate de nickel, par voie orale, à des concentrations de nickel de 100 et 250 mg/kg/j, une diminution de gain du poids corporel, le poids relatif moyenne de foie par 20 % par rapport au témoin ont été enregistré. Le même traitement induit chez les chiens une augmentation de l'excrétion de l'albumine dans l'urine, diminution de gain du poids corporel

et de la consommation d'aliment, une augmentation du poids relatif moyenne des reins et de foie (**Henderson et al., 2012**).

1.4.3. Cancérogénicité

Le lien potentiel entre l'exposition au nickel et le cancer a été étudié chez de nombreuses populations exposées en milieu de travail au nickel, présent surtout dans des composés inorganiques ou à l'état métallique. Dans l'analyse la plus poussée qui comportait un suivi supplémentaire de grandes cohortes, on a accordé une attention particulière aux concentrations et aux espèces des composés du nickel auxquels les travailleurs étaient exposés (**Wozniak et al., 2002**). On a observé une augmentation significative de la mortalité due au cancer du poumon chez les travailleurs qui ont surtout été exposés à des composés oxygénés et sulfurés du nickel. De plus, la mortalité due au cancer du nez était également plus élevée chez les travailleurs qui étaient principalement exposés à des composés solubles du nickel. Aucune information n'a été présentée au sujet d'une éventuelle exposition simultanée de ces travailleurs à des substances autres que le nickel (**Doll et al., 1990**). Notons aussi que chez les hamsters exposés à un aérosol d'oxyde de nickel (NiO) (7 heures /J, 5 J/ Semaine pendant toute leur vie) à une concentration de 53 mg/m^3 , ne présentent pas des effets cancérogènes des voies respiratoires mais présentent quelques tumeurs du tissu osseux et musculaire. Tandis que l'injection des plusieurs dérivés du nickel (par exemple le mono et le di sulfure de nickel) induisent des sarcomes chez le rat (**Lauwerys, 2000**).

1.4.4. Toxicité hépatique et rénale

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

Les lésions rénales se traduisent par une augmentation de la protéinurie tubulaire (excrétion de protéines de faible masse molaire) pouvant évoluer vers des dommages glomérulaires avec une forte diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire se caractérisant par une excrétion urinaire de protéines de grande masse molaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés, de calcium et réduction de la capacité de concentration des reins. Le Ni(II) inhibe aussi la réabsorption de calcium en bloquant un canal calcique situé dans le tubule distal, et cela conduit à une hypercalcinurie et à la formation d'un caillot (**Pari et al., 2011; Schaumlöffel, 2012**).

1.4.5. Toxicité pulmonaire

L'exposition répétée aux dérivés organiques du nickel produit une irritation des voies respiratoire (rhinite, ulcération de la cloison nasale, bronchite chronique) (**Das et al., 2007**). L'inhalation prolongée ou répétée de certains composés du nickel, entraîne essentiellement des signes naseaux et pulmonaire il s'agit de réactions inflammatoires, interstitielles, d'une hyperthermie avec une évolution possible vers un emphysème ou une fibrose (**Lauwerys, 2000**). Ces symptômes ont été également observés chez les rats traités par 100 mg de $\text{Ni}_3\text{S}_2/\text{m}^3$ pendant 12 heures avec l'apparition d'emphysème et avec la présence des réactions inflammatoires au niveau des alvéoles à la dose de $2,5 \text{ mg}/\text{m}^3$ (**Zhang et al., 2003**).

1.5. Hématotoxicité de Nickel

L'exposition au nickel produit des effets hématotoxiques chez l'homme et les animaux (**Cempel et al., 2006**). Des changements hématologiques ont été enregistré chez les ouvriers qui ont bu l'eau d'une fontaine riche en sulfate et de chlorure de nickel qui sont manifestés par une augmentation du taux des réticulocytes et diminution du taux d'hémoglobine (**Das et al., 2007**). De plus, des rats traités par le sulfate de nickel montrent une diminution du nombre des globules rouges, du taux d'hémoglobine, et le pourcentage d'hématocrite (**Swati et al., 2013**).

1.6. Le Nickel et le stress oxydatif

Le stress oxydant est un déséquilibre redox cellulaire qui peut être lié à la stimulation oncogène (**Das et al., 2008**). L'équilibre entre l'oxydant et les espèces antioxydants est le déterminant de meilleur fonctionnement de l'organisme contre les espèces réactifs oxygénés (ERO), toute perturbation dans cet équilibre peut causer une gamme des processus pathologiques (**Patel et al., 2012**).

Les effets toxiques du nickel sont essentiellement indirects. Ce métal lourd non oxydoréducteur en milieu biologique provoquerait la diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants. Des expositions courtes au Ni(II) semblent à inhiber les enzymes antioxydants comme la SOD la CAT et la GPx. Par contre, des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes (SanMiguel *et al.*, 2013) et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines, probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. De nombreuses études ont montré que le nickel est capable d'induire la formation des radicaux libres oxygénés responsables aux lipopéroxydations membranaires, lésions de l'ADN et oxydation des protéines (figure 02). Ces effets cytotoxiques conduisent à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Hassan *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 2012).

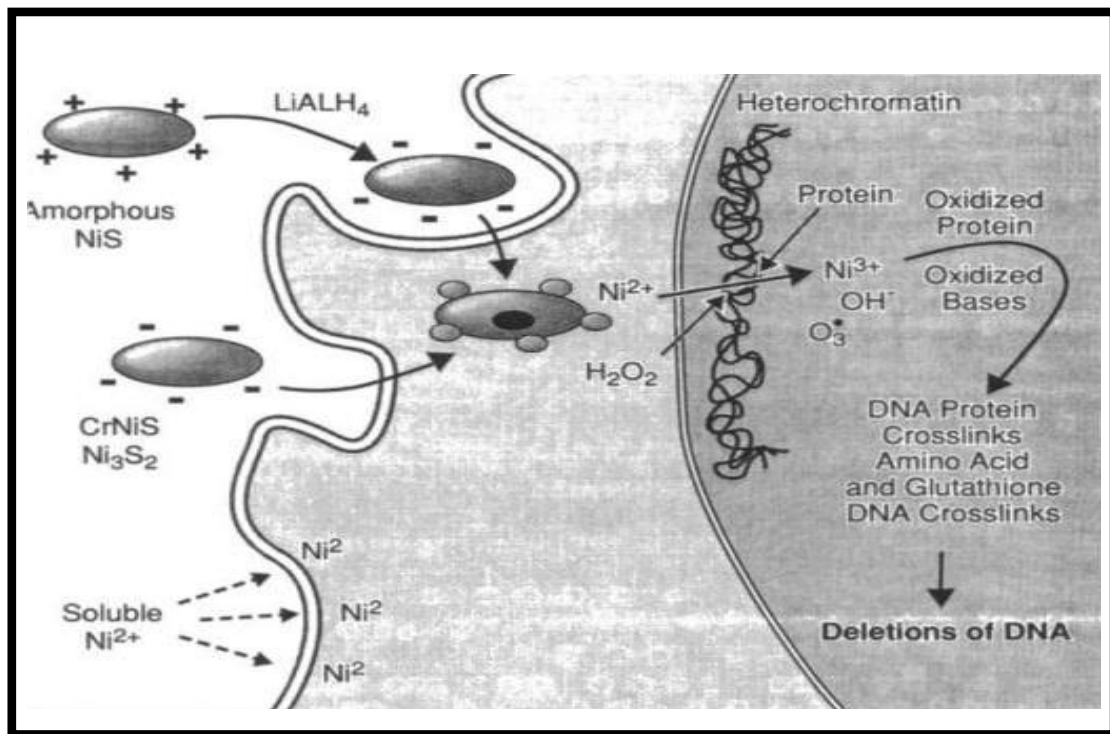


Figure 02 : Effet carcinogène du nickel (Costa *et al.*, 1994).

La figure montre l'entrée des particules du nickel sulfite par phagocytose, la dissolution des particules dans la cellule et leur action sur la chromatine. Notons que les sels de nickel ne peuvent pas entrer facilement dans la cellule. Alors, Elles ne sont pas potentiellement carcinogènes.

2. Vitamine C (Acide ascorbique)

L'organisme se protège par un ensemble de systèmes antioxydants. Parmi les composés antioxydants ; la vitamine C, apporté par les aliments agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables.

2.1. Généralité

Facteur vitaminique hydrosoluble indispensable à l'homme et à de nombreuses espèces animales, l'acide L-ascorbique, de formule brute $C_6H_8O_6$, est aussi appelé vitamine C. Sa carence alimentaire provoque l'apparition de tuméfactions douloureuses gingivales et articulaires, de lésions osseuses et d'hémorragies, l'ensemble constituant la plus anciennement décrite des avitaminoses: le scorbut. L'acide L-ascorbique se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans l'eau et l'alcool, insolubles dans les solvants des graisses. La solution aqueuse est dextrogyre. Le groupement essentiel de la vitamine C est la fonction ène-diol avec ses hydrogènes mobiles qui confèrent à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique, plombique, etc.). Cette fonction est également impliquée dans le rôle physiologique de cette vitamine (**Levine *et al.*, 1999**). L'acide ascorbique s'oxyde facilement, surtout en milieu alcalin, en acide déhydroascorbique, les deux formes étant physiologiquement actives et présentes dans les liquides de l'organisme. L'action réductrice de l'acide ascorbique sert de base à la détermination chimique du composé; dans la plupart des tissus animaux et végétaux, c'est la seule substance qui manifeste cette activité réductrice en milieu acide. À pH acide, l'acide ascorbique décolore le 2,6-dichloro-phénol-indophénol ; la réaction est quantitative et permet une microdétermination de l'ascorbémie. Les acides ascorbiques et déhydroascorbique sont dosés par formation d'hydrazones avec la 2,4-dinitro-phénylhydrazine. La plupart des animaux, sauf les primates et le cobaye, effectuent la synthèse de la vitamine C à partir de l'acide D-glucuronique qui est dans un premier temps réduit par une déshydrogénase à NADP en acide L-gulonique. Celui-ci est transformé en lactone par une lactonase, et un système microsomial oxyde la L-gulonolactone en 2-céto L-gulonolactone (**Wandzilak *et al.*, 1994**).

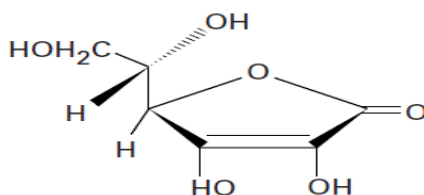


Figure 03: La structure de l'acide L-ascorbique (la vitamine C)

2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique sont liées à sa structure (**Burtis, 1999**). L'acide ascorbique rassemble au glucose en structure mais il est beaucoup plus réactif chimiquement. L'acide ascorbique est l'un des agents réducteurs les plus puissants dans les tissus vivants, il s'oxyde facilement et réversiblement à l'acide deshydro-ascorbique. Chez l'homme, les deux formes réduites et oxydées sont biologiquement actives (**Fahmy et al., 2008**). La vitamine C est un acide instable et facilement oxydé, il peut être détruite par l'oxygène, la température, et le pH alcalin (**Frei et al., 2004**). De plus, Les interactions de l'acide ascorbique avec divers produits chimiques et ions métalliques permettent à l'acide ascorbique et son acide deshydro ascorbique (produit de l'oxydation) et son radical de fonctionner pour faire un cycle des couples rédox dans des réactions impliquant le transport d'électrons (**D'Agostini et al., 2000**).

2.3. Métabolisme de la Vitamine C

La vitamine C est hydrosoluble, il est bien absorbé dans l'appareil gastro-intestinal et absorbé par le petit intestin à l'intermédiaire d'un mécanisme de transport actif. Le transport cellulaire de la vitamine C est possible par des *transporteurs sodium-dépendant* de la vitamine C (Sodium-Dependent Vitamin C Transporters ; *SVCT1* et *SVCT2*) (**Tsukaguchi et al., 1999**). L'acide ascorbique est largement distribué dans tous les tissus du corps, avec des niveaux plus élevés remarquables dans les glandes surrénales et la rétine, et des niveaux faibles dans les reins et les muscles.

Dans le plasma, la vitamine C se trouve soit sous forme libre ou bien liée à l'albumine. La concentration de l'acide ascorbique est basse (5-15 mg/l) dans le plasma et les globules rouges mais elle est très élevée dans les plaquettes et les globules blancs (80 fois supérieur). L'hypophyse et la corticosurrénale sont les organes les plus riches en acide ascorbique alors que le muscle et le foie ont les concentrations les plus faibles. De plus, la vitamine C est réabsorbée à plus de 90% au niveau tubulaire rénal après filtration glomérulaire (**Liang et al., 2001**). La vitamine C est métabolisée dans le foie et les reins, avec une série de réactions. Les formes non métabolisés de la vitamine C, comme l'oxalate sont en grande partie excrétés dans l'urine, l'élimination urinaire se fait sous forme native ou sous formes des métabolites (**Li and Zamble, 2009**).

2.4. Distribution de vitamine C et son transport

L'acide ascorbique est largement distribué dans tous les tissus du corps, avec des niveaux plus élevés remarquables dans les glandes surrénales et la rétine, et des niveaux faibles dans les reins et les muscles (**Das and Saha, 2010**). Dans le plasma, la vitamine C se trouve dans le plasma soit sous forme libre ou bien liée à l'albumine (**Das et al., 2007**). Chez l'homme, il n'existe ni synthèse ni stockage de la vitamine C dans l'organisme (**Olivier, 2004**). L'hypophyse et la corticosurrénale sont les organes les plus riches en acide ascorbique alors que le muscle et le foie ont les concentrations les plus faibles. De plus, la vitamine C est réabsorbée à plus de 90% au niveau tubulaire rénal après filtration glomérulaire (**Nielsen et al., 2002**).

2.5. Rôles de la vitamine C dans les voies biologiques

- L'acide ascorbique est un cofacteur pour plusieurs enzymes qui participent à l'hydroxylation microsomique dans la synthèse de la carnithine, dans la conversion de la dopamine en norépinephrine, et dans le métabolisme de la tyrosine.
- Il stimule le catabolisme de cholestérol, la détoxification des produits chimiques et il intervient dans le métabolisme des neurotransmetteurs.
- La vitamine C diminue les glucocorticoïdes dans la circulation, elle ramène également le tocophérol oxydé à sa forme active dans le foie (**Das and Saha, 2010**).
- Rôle de l'acide ascorbique dans le métabolisme cellulaire peut être expliqué par ses propriétés réductrices pour protéger les composants cellulaires contre les effets oxydatifs (**Aysun, 2009**).
- Rôle dans le métabolisme de tyrosine, de l'acide folique, et de tryptophane.
- La vitamine C joue un rôle métabolique dans l'activation de vitamine B, et la conversion de cholestérol en acides biliaires et la conversion de tryptophane en sérotonine (**Gey, 1998**).
- La vitamine C augmente l'absorption de Fer dans l'intestin; elle ramène le Fe (+3) ferrique aux ions Fe (+2) ferreux de ce fait favorisant l'absorption diététique de fer non hémique dans les tracts gastro-intestinales et stabilise les protéines Fer-contraindantes (**Maniyar et al., 2012**).

2.6. La Biosynthèse de la vitamine C

La plupart des animaux peuvent synthétiser la vitamine C à partir de D-glucose par l'enzyme Oxydase de gluconolactone, mais les humains manquent de la dernière enzyme impliquée dans la synthèse de la vitamine C, ce qui exige la présence du vitamine dans le régime alimentaire (**Rahman et al, 2006**).

La Biosynthèse de l'acide ascorbique chez les animaux est incluse dans la voie biochimique de l'acide glucuronique qu'est une voie importante pour des processus de détoxification. Cependant, Les microorganismes peuvent synthétiser l'acide ascorbique ou l'un de ses isomères (**San Miguel et al., 2013**).

2.7. Sources alimentaires

La vitamine C est présente dans tous les végétaux, mais en quantités variables. Les principales sources de vitamine C sont les fruits (agrumes, fruits rouges) et les légumes . Pour assurer la couverture des besoins quotidiens en vitamine C, il est recommandé de consommer environ 500 g de fruits et légumes par jour (**Rahman et al, 2006**).

Chapitre 2

Matériels et

Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Nous avons travaillé sur des souris blanches mâles de la souche *Mus musculus*, pesant entre 24 et 31 g et fournies par l'annexe de Kouba de l'Institut Pasteur de l'Algérie. Les souris d'expérimentation sont hébergés dans l'animalerie du laboratoire où règne une température ambiante et une photopériode naturel (12 h jour/12h nuit). Les animaux ont accès à volonté à l'eau et à la nourriture (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) dont la composition est indiquée au tableau (2) qui est équilibrée en protéines, glucides, lipides, vitamines et sels minéraux.

Tableau 02: Composition du régime croquette (ONAB Bejaia)

Composants	%
Mais	52,80
Son	10,80
Soja	32,10
Calcaire	1,50
Phosphate	00,80
Complément vitaminique	02,00

1.2. Matériel chimique

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

- Chlorure de nickel (NiCl₂, Sigma).
- Vitamine C (Acide ascorbique, Sigma).

2. Méthodes

2.1. Evaluations Toxicologiques et Traitement des Souris

Trente six (36) souris males ont été répartis en deuze groupes de trois animales pour chacun: *On a quatre groupes pour l'évaluation toxicologique des traitements en utilisant une seule dose et un temps d'exposition fixé :*

- ❖ **Groupe 1:** Souris témoins (T) recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet, jusqu'au 8^{ème} jour (jour de sacrifice).
- ❖ **Groupe 2 [Vit C]:** Souris recevant la vitamine C par voie de gavage à raison de 16.6 mg/kg de poids corporel pendant sept (07) jours. En suite, les souris sont sacrifiées en 8^{ème} jour (**Dhir et al., 1991**).
- ❖ **Groupe 3 [Ni(II)]:** Souris recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet pendant sept (07) jours. En 8^{ème} jour, les souris sont traités par voie intra péritonéal au 5mg Ni(II)/kg poids corporel. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (**Chen et al., 1998**).
- ❖ **Groupe 4 [Ni(II) + Vit C]:** Souris prétraités par la vitamine C (16.6 mg/kg de poids corporel) jusqu'à le 7^{ème} jour. En 8^{ème} jour, le chlorure de nickel (5mg/kg PC) a été administré par voie IP et ensuite, les souris sont sacrifiées après 24 heures.

Pour évaluer la réponse de l'organisme aux différentes doses de nickel (Dose-réponse) on a 4 autres groupes :

- ❖ **Groupe 5 [Ni(II)]:** Souris recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet pendant sept (07) jours. En 8^{ème} jour, les souris sont traités par voie intra péritonéal au 3mg Ni(II)/kg poids corporel. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (**Chen et al., 1998**).
- ❖ **Groupe 6 [Ni(II)] :** Souris recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet pendant sept (07) jours. En 8^{ème} jour, les souris sont traités par voie intra péritonéal au 10mg Ni(II)/kg poids corporel. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (**Chen et al., 1998**).
- ❖ **Groupe 7 [Ni(II) + Vit C]:** Souris prétraités par la vitamine C (16.6 mg/kg de poids corporel) jusqu'à le 7^{ème} jour. En 8^{ème} jour, le chlorure de nickel (3mg/kg PC) a été administré par voie IP et ensuite, les souris sont sacrifiées après 24 heures.
- ❖ **Groupe 8 [Ni(II) + Vit C]:** Souris prétraités par la vitamine C (16.6 mg/kg de poids corporel) jusqu'à le 7^{ème} jour. En 8^{ème} jour, le chlorure de nickel (10mg/kg PC) a été administré par voie IP et ensuite, les souris sont sacrifiées après 24 heures.

Pour évaluer la réponse de l'organisme à une seule dose de nickel et en fonction du temps (variation temps -réponse) on a 4 autres groupes :

- ❖ **Groupe 9 [Ni(II)]:** Souris recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet pendant sept (07) jours. En 8^{ème} jour, les souris sont traités par voie intra péritonéal au 5mg Ni(II)/kg poids corporel. En suite, les souris sont sacrifiées après 6 heures (**Chen et al., 1998**).

- ❖ **Groupe 10 [Ni(II)]:** Souris recevant une alimentation normale, et une eau de boisson normale à base d'eau de robinet pendant sept (07) jours. En 8^{ème} jour, les souris sont traités par voie intra péritonéal au 5mg Ni(II)/kg poids corporel. En suite, les souris sont sacrifiées après 48 heures (**Chen *et al.*, 1998**).
- ❖ **Groupe 11[Ni(II) + Vit C]:** Souris prétraités par la vitamine C (16.6 mg/kg de poids corporel) jusqu'à le 7eme jour. En 8eme jour, le chlorure de nickel (5mg/kg PC) a été administré par voie IP et ensuite, les souris sont sacrifiées après 6 heures.
- ❖ **Groupe 12[Ni(II) + Vit C]:** Souris prétraités par la vitamine C (16.6 mg/kg de poids corporel) jusqu'à le 7eme jour. En 8eme jour, le chlorure de nickel (5mg/kg PC) a été administré par voie IP et ensuite, les souris sont sacrifiées après 48 heures.

Les animaux témoins et traités ont été pesés chaque matin, afin d'en déduire les courbes de croissance.

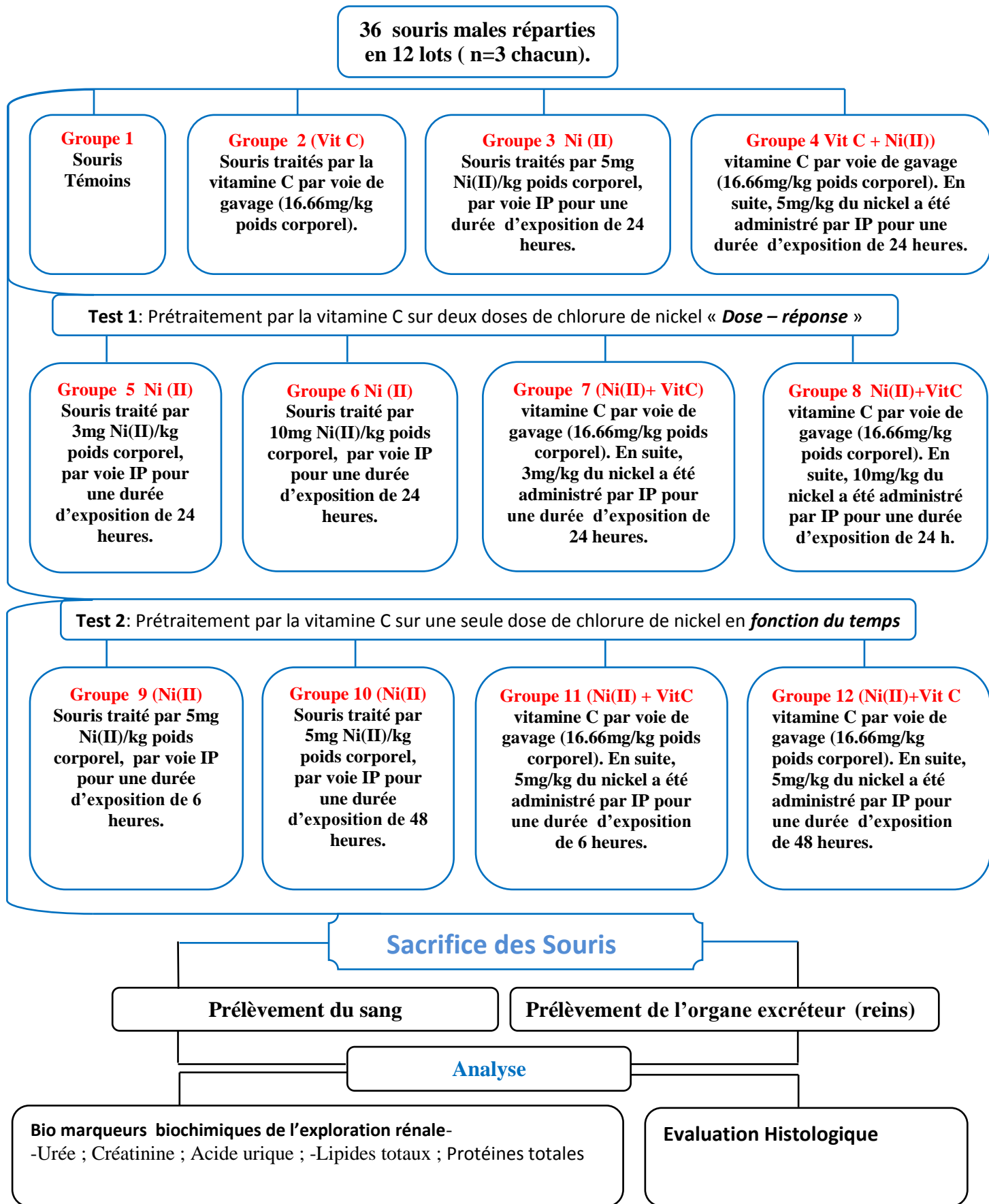


Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

2.2. Prélèvement des échantillons

Le sacrifice des animaux a toujours été effectuée dans la matinée afin d'éviter les variations dues au rythme circadien. Les prélèvements sanguins ont été faits après décapitation rapide, le sang artérioveineux a été recueilli sans anticoagulant puis centrifugé. Le sérum résultant a été utilisé immédiatement pour les dosages des bio-marqueurs biochimiques de l'exploration rénale.

2.3. Prélèvement des organes

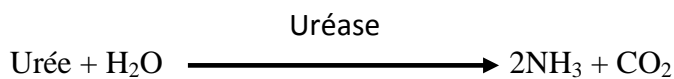
Après la dissection, les reins sont prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, puis pesés. Les reins de chaque animale sont conservés dans une solution de formaldéhyde de 60%, jusqu'au moment de faire les coupes histologiques.

2.4. Dosage des paramètres biochimiques

Dans notre étude, tous les paramètres biochimiques de l'exploration rénale ont été évalués par la méthode colorimétrique enzymatique et non-enzymatique en utilisant les Kits biochimiques (*SpinReact, Girona Spain*). La lecture de l'absorbance optique est faite à l'aide d'un spectrophotomètre (*JENWAY 6105*). Le dosage des paramètres a été effectué dans le laboratoire d'analyse médicale d'Ibn-Toumi, M'Sila, et ceci sous notre surveillance personnelle.

2.4.1. Dosage de l'urée

L'urée ou carbamide (DCI) est un composé organique de formule chimique $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. La technique utilisée pour la détermination du taux de l'urée est la méthode colorimétrique enzymatique, utilisant l'uréase selon la réaction suivante:



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

2.4.2. Dosage de la créatinine

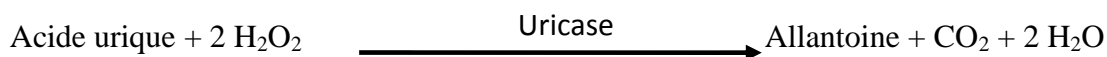
La créatinine (du grec *kreas* : viande) est un produit de dégradation du phosphate de créatine dans le muscle. La créatine se déshydrate spontanément dans nos cellules musculaires et son produit de déshydratation est la créatinine. Celle-ci sera éliminée par l'urine.

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

2.4.3. Dosage de l'acide urique

L'acide urique est un composé chimique de formule brute $C_5H_4N_4O_3$. C'est une molécule quasiment insoluble dans l'eau résultant de la dégradation et de l'excrétion des purines (principalement la guanine et l'adénine) chez l'homme.

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



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

2.4.4. Dosage des lipides totaux

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

2.4.5. Dosage des protéines totales

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



2.5. Évaluation histologique

Nous avons réalisé les coupes histologiques des reins à la servie d'anatomie pathologique d'un clinique privé (P^r BENAROUDJ, M'Sila) suivant la technique classique de **Houlot (1984)**:

- L'organe de rein de chaque animal est retiré de formaldéhyde et est coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 Cm^2 et une épaisseur proche de 1.5mm.
- Les prélèvements réalisés sont alors mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

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

Réalisation des blocs: Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils "dits à inclusion " refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) sont possibles grâce à des appareils spéciaux appelés " Microtomes ". Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixés sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

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

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

2.6. Exploration statistique des résultats

Les résultats expérimentaux sont exprimés sous forme de moyenne arithmétique, accompagnée de l'erreur standard ($M \pm SEM$). La comparaison entre les moyennes est réalisée à l'aide du test F de Fisher. La significativité des résultats est estimée par une analyse de variance (ANOVA). Les résultats ont analysé par le logiciel de statistique « **GraphPad Prism 6.03** ».

Chapitre 3

Résultats

1. Effet des traitements sur les paramètres physiologiques

1.1. Effet sur l'évolution de poids corporel des souris

Les résultats montrent que le poids corporel des souris traités et témoins varient semblablement pendant les sept (7) jours du chaque traitement. En suite, il commence de se varier différemment en comparaison avec le lot témoin (**figures 04, 05, 06 et 07**).

En comparant au groupe témoin, le poids corporel des souris a diminué clairement, mais pas significativement (ns : $P > 0.05$) par le 5mg et 10mg du chlorure de nickel/ kg poids corporel pour un temps d'exposition de 24 heures et 48 heures (**figures 05, 07**). Par ailleurs, le traitement par la vitamine C seule montre une évolution du poids corporel comparable à celle observée chez les souris témoins. Alors, les souris prétraitées par la vitamine C suivie par une administration intra péritonéale du chlorure de nickel pour une durée d'exposition varie de 6h, 24h et 48h présentent un peu d'effet sur le paramètre pondéral de l'animal par rapport au groupe de Ni(II) seul et au témoin.

Cependant, la croissance pondérale diminue légèrement (ns : $P > 0.05$) chez les souris traités par 3mg Ni(II)/ kg poids corporel, les prétraités par la vitamine C suivie par un traitement IP du nickel au temps d'exposition de 24 heures et les traités par 5mg Ni(II)/kg poids corporel pendant 6 heures, en comparaison au groupe de témoin (**figures 06, 07**).

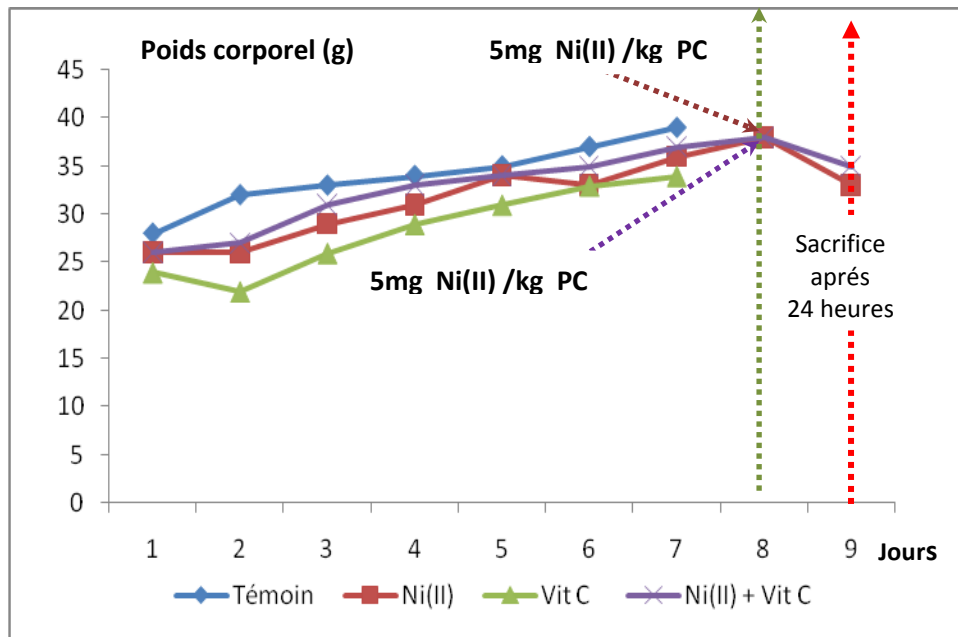


Figure 04 : Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant 7jours, les souris traités en 8^{ème} jour par 5mg Ni(II)/kg PC (IP) et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8^{ème} jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (en 9^{ème} jours).

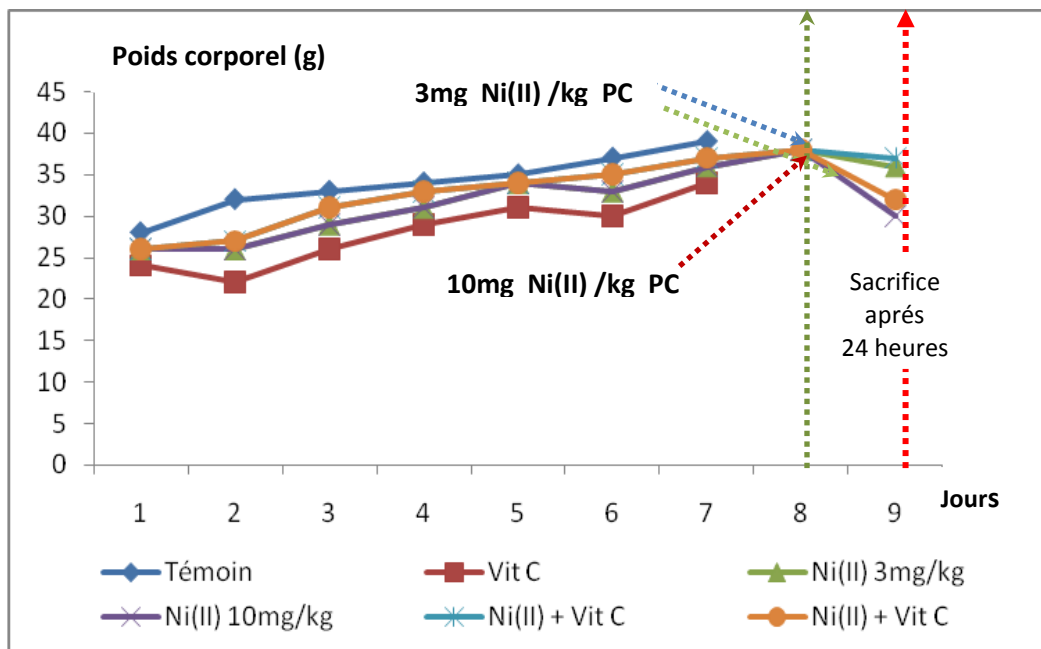


Figure 05 : Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant sept jours, les souris traités en 8^{ème} jour par (IP) du 3mg et 10mg Ni(II)/kg PC (IP) et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8^{ème} jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 3mg et 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 24 heures (en 9^{ème} jours).

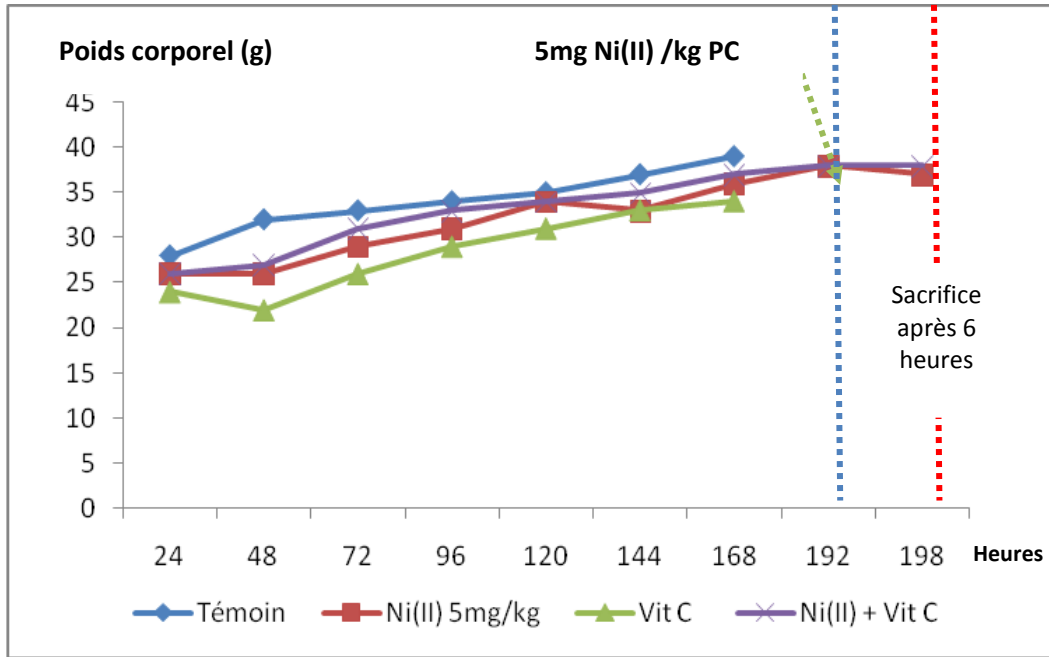


Figure 06 : Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC) pendant 7 jours, les souris traités en 8^{ème} jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8^{ème} jour par une administration intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 6 heures (en 198^{ème} heures).

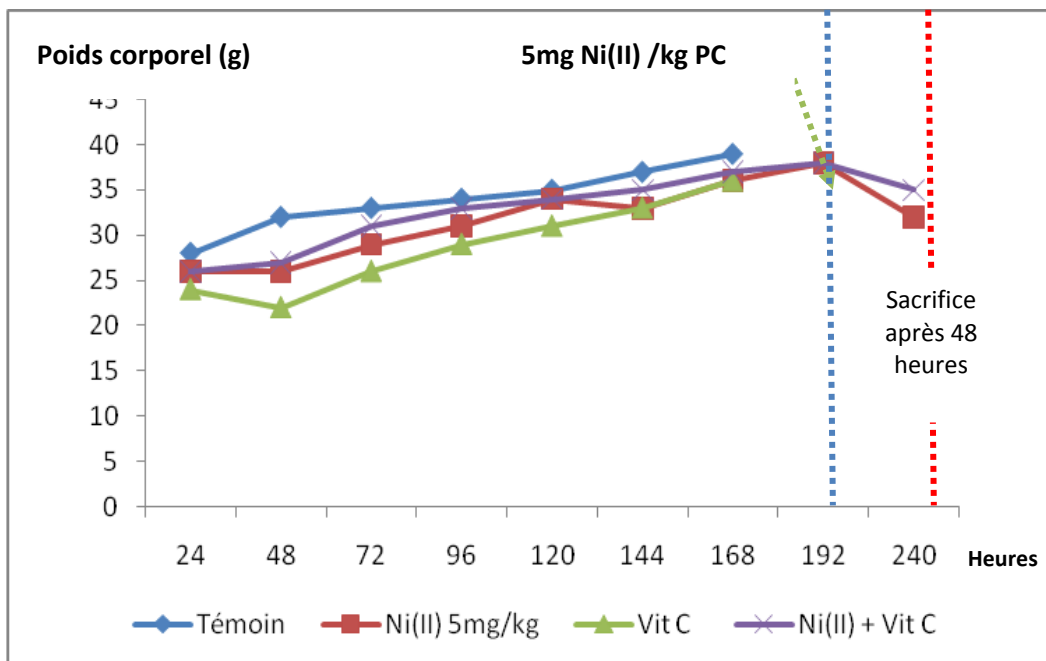


Figure 07 : Evolution du poids corporel chez les souris témoins, les traités par 16,66mg de la vitamine C/ kg de poids corporel (PC), les souris traités en 8^{ème} jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC et les souris prétraités par la vitamine C pendant 7 jours suivie en 8^{ème} jour par injection intrapéritonéale (IP) du 5mg Ni(II)/kg PC. En suite, les souris sont sacrifiées après 48 heures (en 240^{ème} heures).

1.2. Effet sur le poids absolu et relatif des reins

Les résultats illustrés dans le tableau 03 indiquent une variation claire des poids absolus et relatifs des reins chez les souris traitées au nickel par rapport aux témoins.

Chez les souris traitées par 3 mg/kg (24 heures), 5 mg/kg (6 heures), 5 mg/kg (24 heures), 5 mg/kg (48 heures), et 10 mg/kg (24 heures) du chlorure de nickel, le poids absolu des reins augmente par 13%, 4%, 22%, 36% et 54% respectivement en comparaison avec le témoin.

De plus, le poids relatif des reins augmente chez les souris traitées par 3 mg/kg (24 heures), 5 mg/kg (6 heures), 5 mg/kg (24 heures), 5 mg/kg (48 heures), et 10 mg/kg (24 heures) du chlorure de nickel par 27%, 11%, 34%, 54.09% et 91.8 respectivement par rapport aux souris témoins.

Cependant, le traitement par la vitamine C ne montre aucun changement remarquable dans les valeurs de poids absolu et relatif en comparaison avec le groupe témoin. Alors, les traitements combinés (Vit C + 3mg Ni(II)/kg PC, Vit C + 5mg Ni(II)/kg PC 6h, Vit C + 5mg Ni(II)/kg PC 24h, Vit C + 5mg Ni(II)/kg PC 48h et Vit C + 10mg Ni(II)/kg PC) comparés au lot témoin montrent respectivement une légère augmentation de poids absolu des reins; (1.11%; 3.39%; 1.50%; 1.90%; 4.17%) et de poids relatif des reins (3.27%; 11%; 3.22% ; 8.19%).

Cependant, tout les valeurs indiqués ci-dessous sont statistiquement non significative ($P > 0.05$).

Tableau 03 : Effets des traitements sur le poids absolu et relatif des reins.

(%) Groupes	Poids absolu des reins (g)	Poids relatif des reins
	M ±SEM	M ± SEM
Témoin	0,22 ± 0,02	0.61 ± 0,02
Vit C (16.66mg/kg PC)	0,24 ± 0,01	0.77± 0,05
Ni(II) (3mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24 heures	0,26 ± 0,01	0.78± 0,01
Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 6 heures	0,27 ± 0,03	0.68 ± 0,11
Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24heures	0,27 ± 0,042	0.82 ± 0,07
Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 48heures	0,30 ± 0,02	0.94 ± 0,03
Ni(II) (10mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24heures	0,34 ± 0,04	1.17 ± 0,03
Vit C + Ni(II) (3mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24 heures	0,22 ± 0,01	0.63± 0,05
Vit C + Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 6 heures	0,23 ± 0,01	0.76± 0,02
Vit C + Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24heures	0,22 ± 0,03	0.66± 0,04
Vit C + Ni(II) (5mg/kg PC) avec Temps d'exposition 48heures	0,22 ± 0,00	0.63± 0,07
Vit C + Ni(II) (10mg/kg PC) avec Temps d'exposition 24heures	0,31 ± 0,05	0.86± 0,11

Résultats statistique**1. Poids absolu des reins :**

Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

Vit C + Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

2. Poids relatif des reins

Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

Vit C + Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

2. Effet des traitements sur les bio-marqueurs biochimiques de l'exploration rénale en fonction des différentes doses de nickel.

Nous constatons d'après les figures 08 et 09 que les concentrations sériques des biomarqueurs rénales (urée, acide urique et créatinine) augmentent clairement entre les souris témoins et les traités par 3mg et 10mg du nickel/poids corporel pour une durée d'exposition 24h. Ces variations sont: 10%, 26.66% et 50% pour l'urée, 2%, 29.26% et 82.2% pour la créatinine et 8%, 11% et 31.15% respectivement pour l'acide urique. Cependant, aucune variation significative n'a été enregistrée entre les groupes et le groupe témoin.

Chez les souris prétraités par la vitamine C suivie par une injection intrapéritonéale du 3 mg/kg, 5 mg/kg, et 10 mg/kg du chlorure de nickel pour une durée d'exposition de 24 heures, les paramètres biochimiques mentionnés ci-dessous montrent une légère augmentation en comparaison avec les souris témoins; 1.71%, 13.12% et 40% pour l'urée, 9.92%, 11.45% et 29% pour la créatinine, 1.65%, 5.43% et 16.86% pour l'acide urique respectivement en comparaison avec le groupe témoin.

Cependant, tout les valeurs indiqués ci-dessous sont statistiquement non significative ($P > 0.05$).

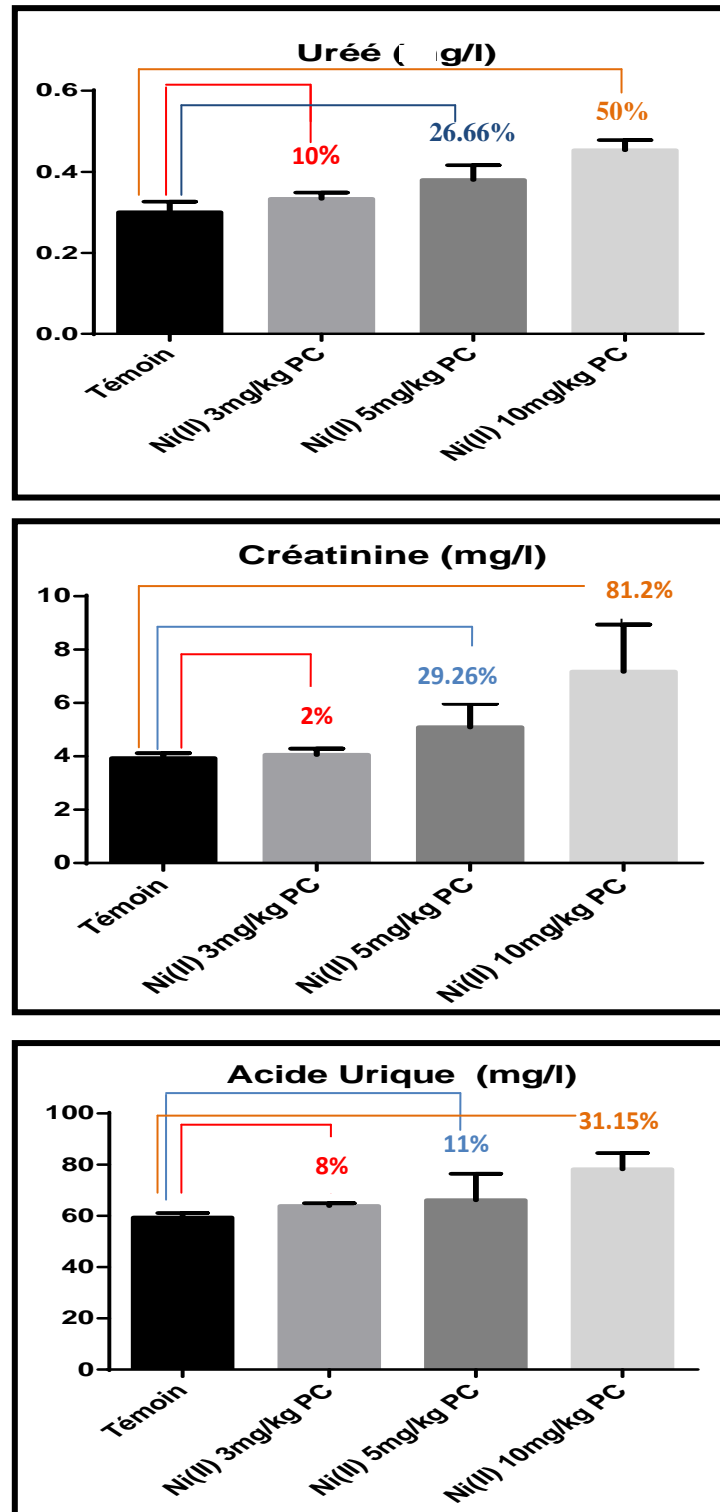


Figure 08 : Variation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique entre les souris témoins et les souris traitées par 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ Kg de poids corporel de l'animal par voie intrapéritonéale et pour une durée d'exposition de 24 heures.

Résultats statistique

Urée, créatinine et Acide urique :

Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

Vit C + Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

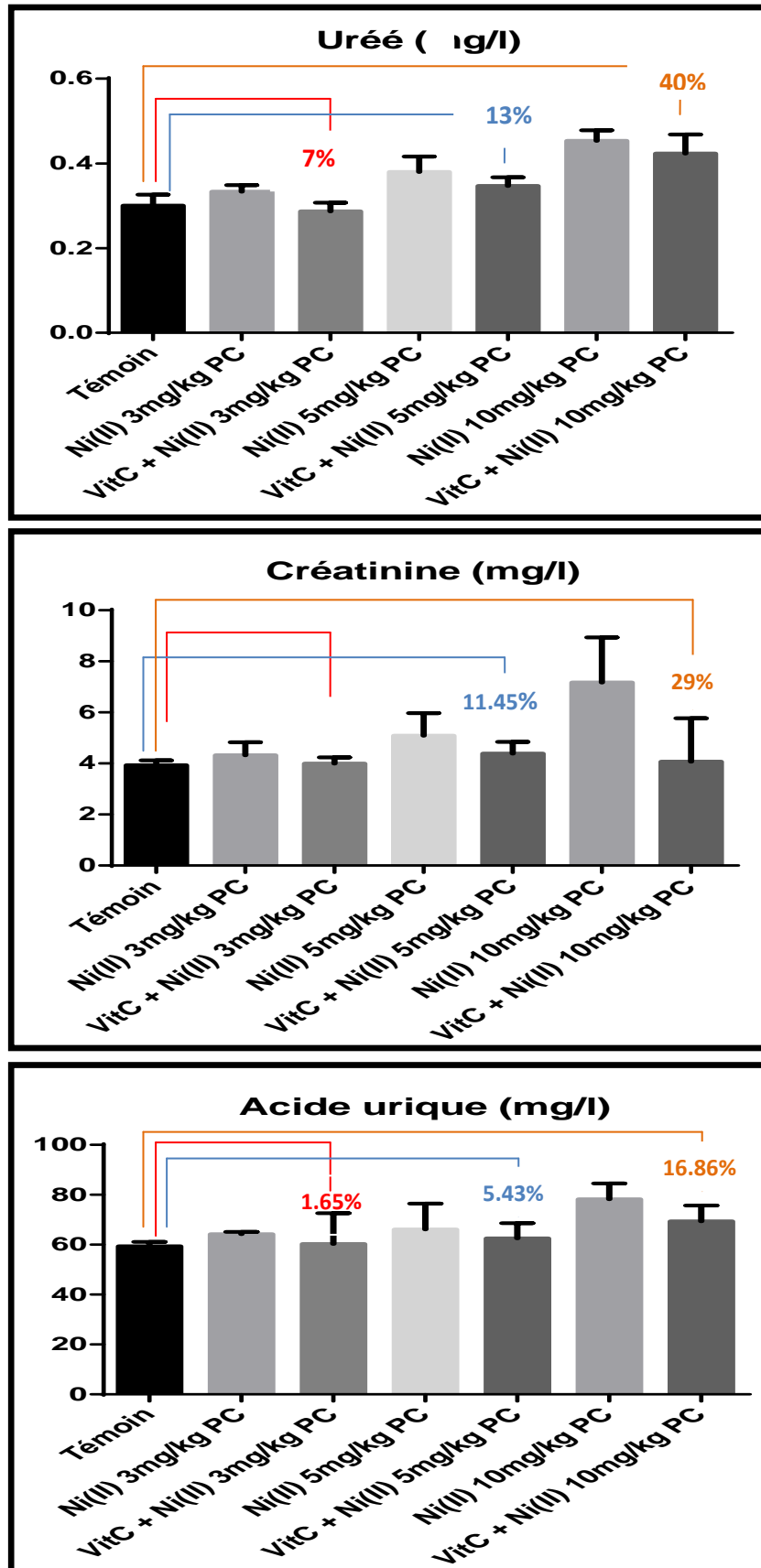


Figure 09 : Effet du prétraitement par la vitamine C sur la variation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique après injection intra-péritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg depoids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.

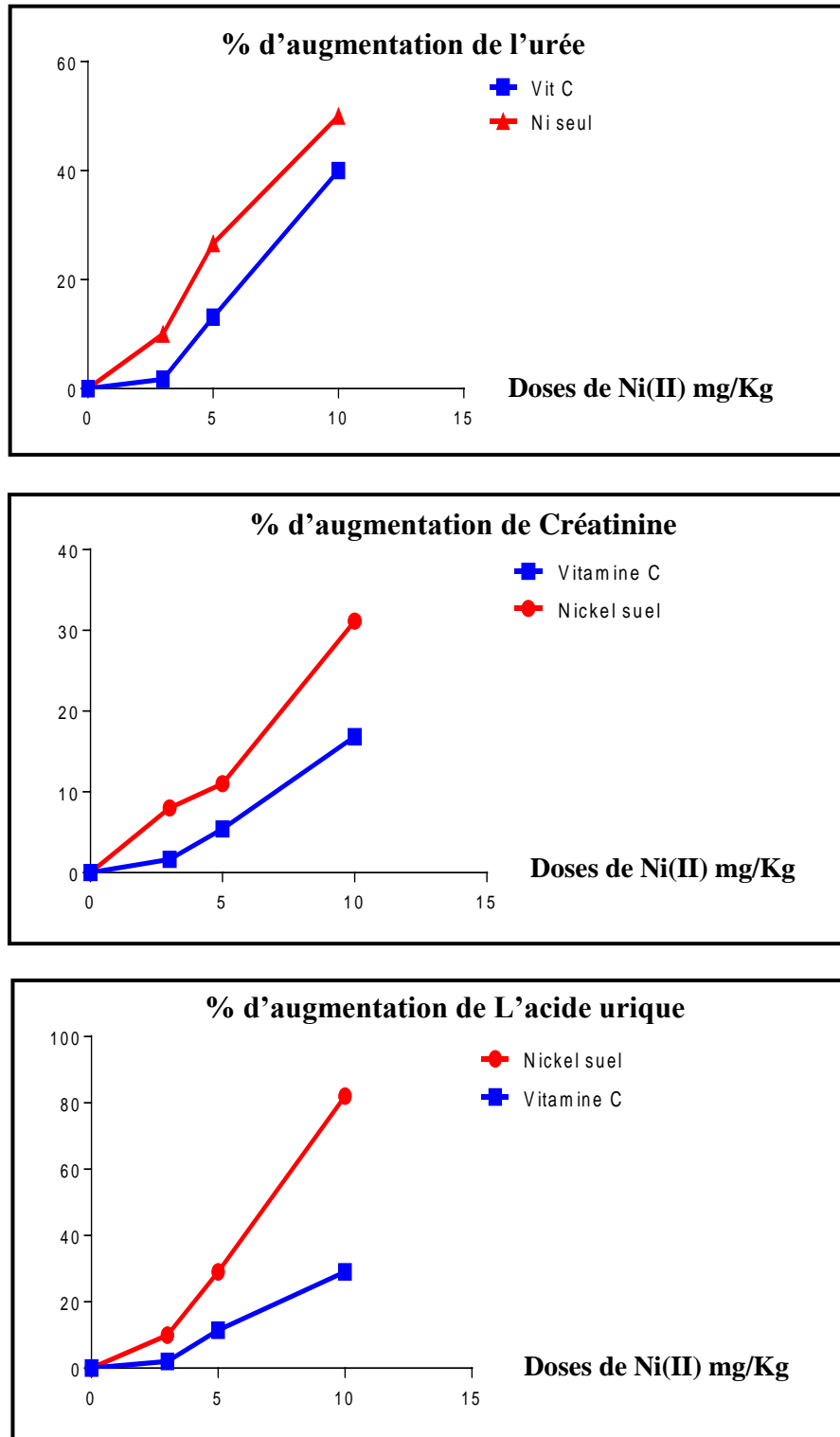


Figure 10: Pourcentage d'augmentation des concentrations sériques de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.

3. Effet des traitements sur le taux des lipides totaux et des protéines totales.

Nous constatons d'après la figure 10 que les concentrations sériques des lipides totaux et des protéines totales augmentent clairement entre les souris témoins et les traités par 3mg/kg, 5mg/kg, et 10mg/kg. Ces variations sont: 16%, 11.9% et 26.66% pour les lipides totaux, et 24%, 17.9% et 37.9% pour les protéines totales. Cependant, aucune variation significative n'a été enregistrée entre les groupes et le groupe témoin.

Chez les souris prétraités par la vitamine C suivie par une injection intrapéritonéale du 3 mg/kg, 5mg/kg et 10 mg/kg du chlorure de nickel, les paramètres biochimiques mentionnés ci-dessus montrent une légère augmentation en comparaison avec les souris témoins; 6.19%, 9.87% et 13.3% respectivement pour les lipides totaux, et 2.45%, 10.29% et 15.6% pour les protéines totales .

Cependant, tout les valeurs indiqués ci-dessous sont statistiquement non significative ($P > 0.05$).

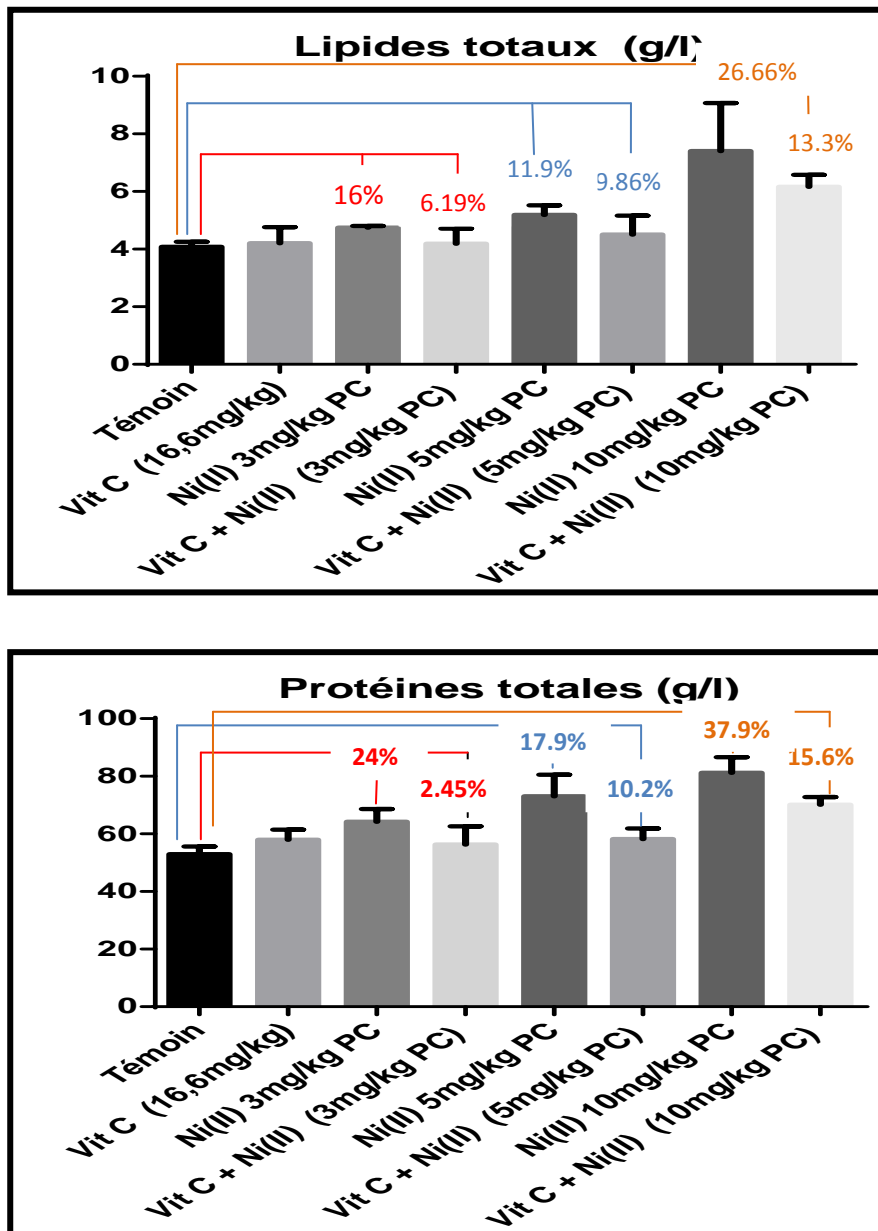


Figure 11 : Effet du prétraitement par la vitamine C sur la variation des concentrations sériques des lipides totaux et protéines totales après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ Kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.

Résultats statistique

Lipides totaux et protéines totales:

Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

Vit C + Ni(II) vs Témoin ns (P> 0.05).

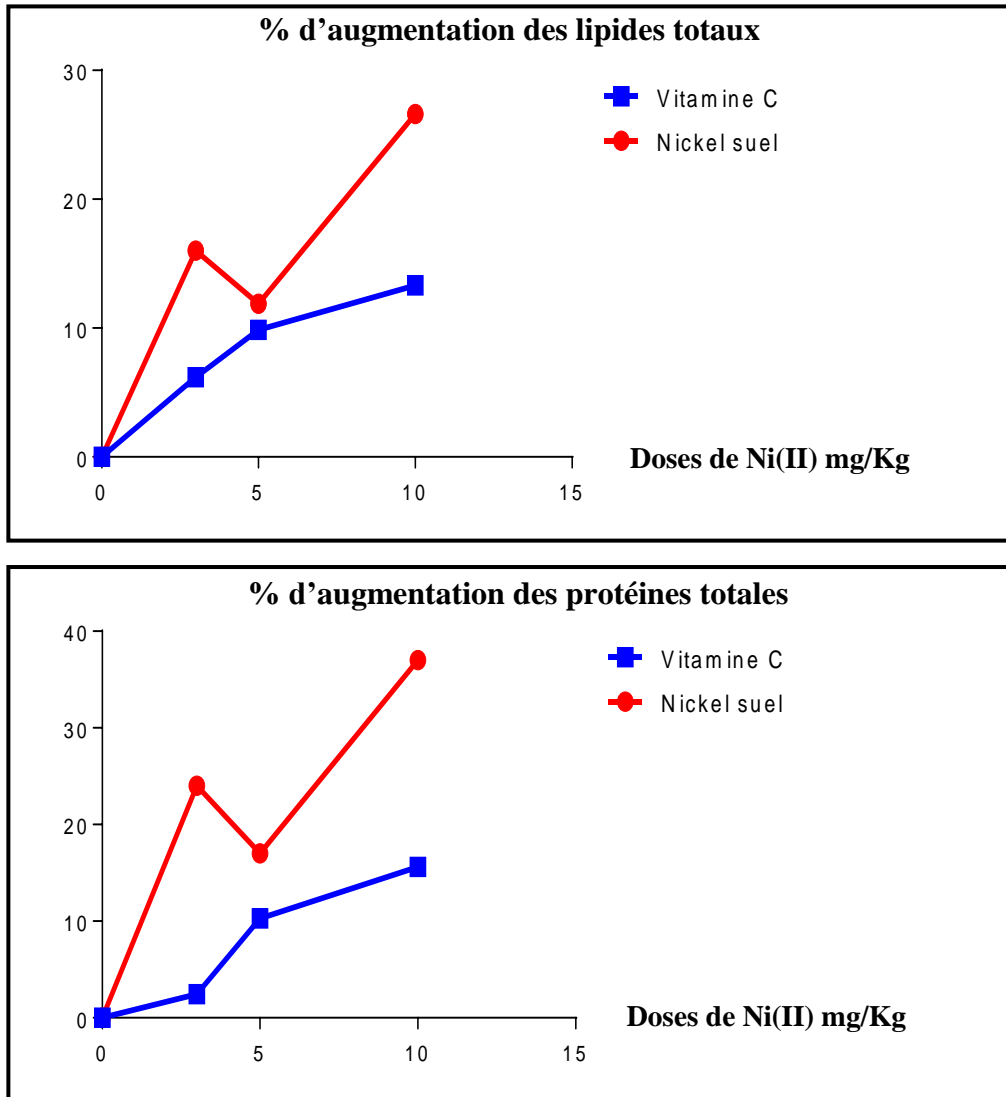


Figure 12: Pourcentage d'augmentation des concentrations sériques des lipides totaux et protéines totales après injection intrapéritonéale du 3mg, 5mg et 10 mg de chlorure de nickel/ kg de poids corporel de l'animal pour une durée d'exposition de 24 heures.

4. Effet des traitements sur les bio-marqueurs biochimiques de l'exploration rénale en fonction de différente durée d'exposition.

D'après les résultats illustrés dans la figure (11), la concentration sérique de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique augmentent clairement entre 6 h et 24h d'exposition au chlorure de nickel à raison de 5mg/kg PC. Cependant, les concentrations sériques des paramètres étudiés montrent une chute remarquable entre 24h et 48h d'exposition.

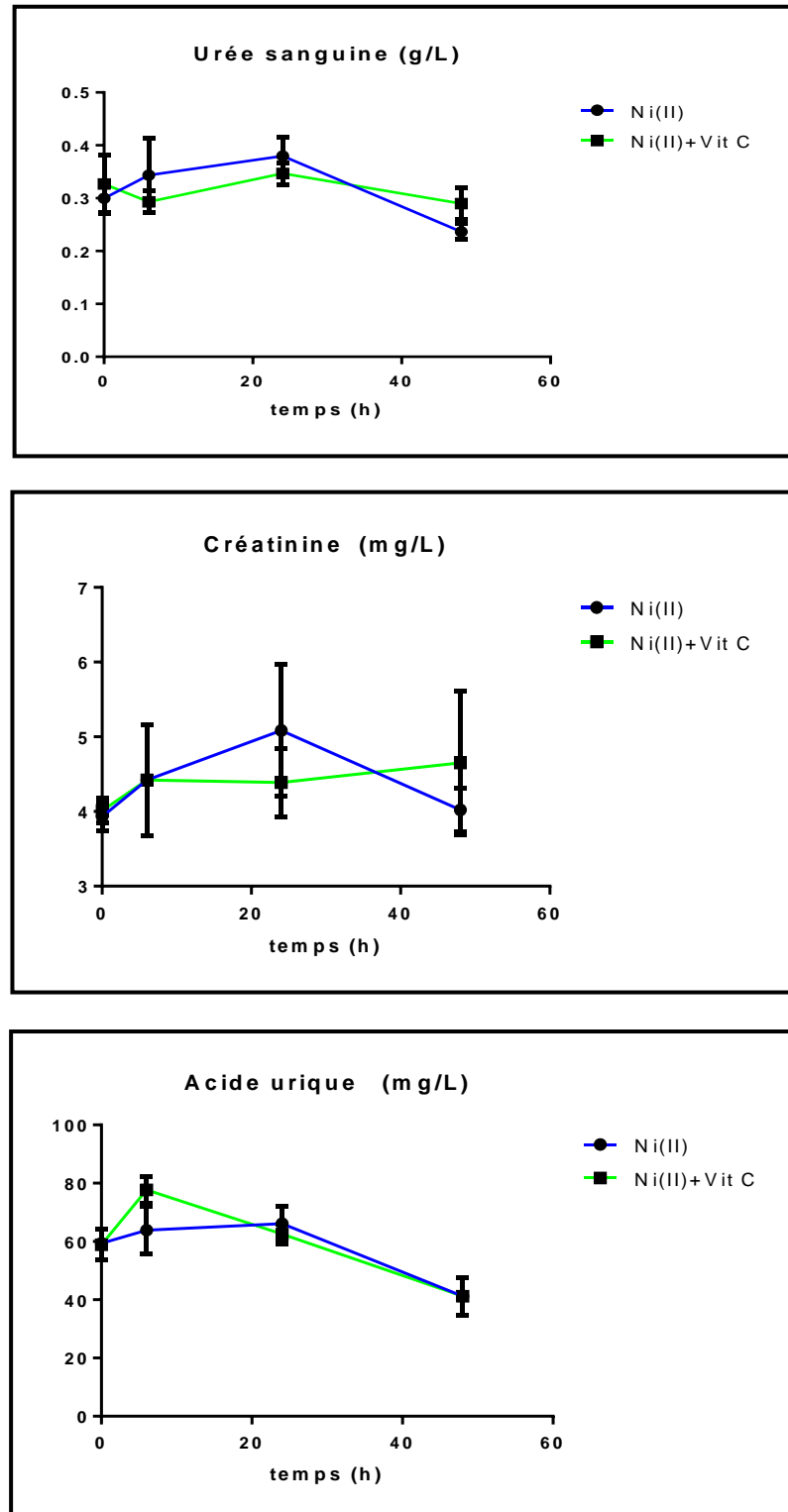


Figure 13 : Effet du chlorure de nickel administré par voie intrapéritonéale en raison de 5mg/kg de poids corporel en fonction de différentes durée d'exposition (6 h, 24 h et 48h) sur les paramètres biochimiques de la fonction rénale. Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm SEM$

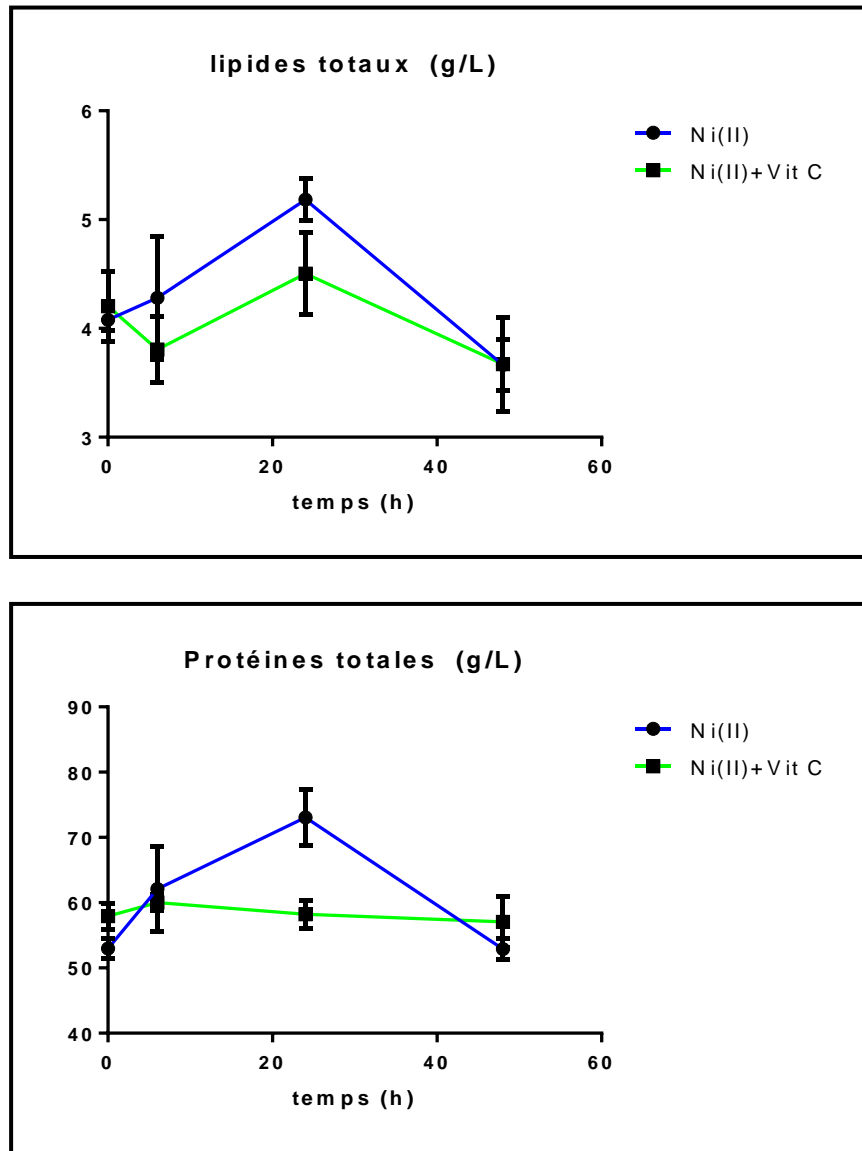


Figure 14 : Effet du chlorure de nickel administré par voie intrapéritonéale en raison de 5mg/kg de poids corporel en fonction de différentes durée d'exposition (6 h, 24 h et 48h) sur les protéines totales et les lipides totaux . Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm SEM$

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

5.1. Evaluation histo-pathologiques en fonction de la dose.

L'histologie du cortex rénal des souris du lot témoin a montré la présence de glomérules uniformes avec membrane bien définie (**Fig 12 A**).

Chez le lot traité par la vitamine C seul, l'histologie du cortex rénale montre qu'il a une structure presque normale (**fig. 12 B**).

L'architecture du cortex rénal chez les souris du lot contaminé au nickel était sévèrement altérée où la plus part des glomérules sont nécrosés. Ces altérations tissulaires sont en dose-dépendante avec le nickel (**fig. 12 C, D et E**).

Pour les lots prétraités par la vitamine C suivie par une administration intra péritonéal du nickel, les glomérules paraient plus grands et non arrondis (dilatés). Malgré ces altérations notées chez les derniers lots, l'architecture du cortex rénal reste plus intacte que celle observée chez le lot contaminé par le nickel (**Fig. 12 F, G, H**).

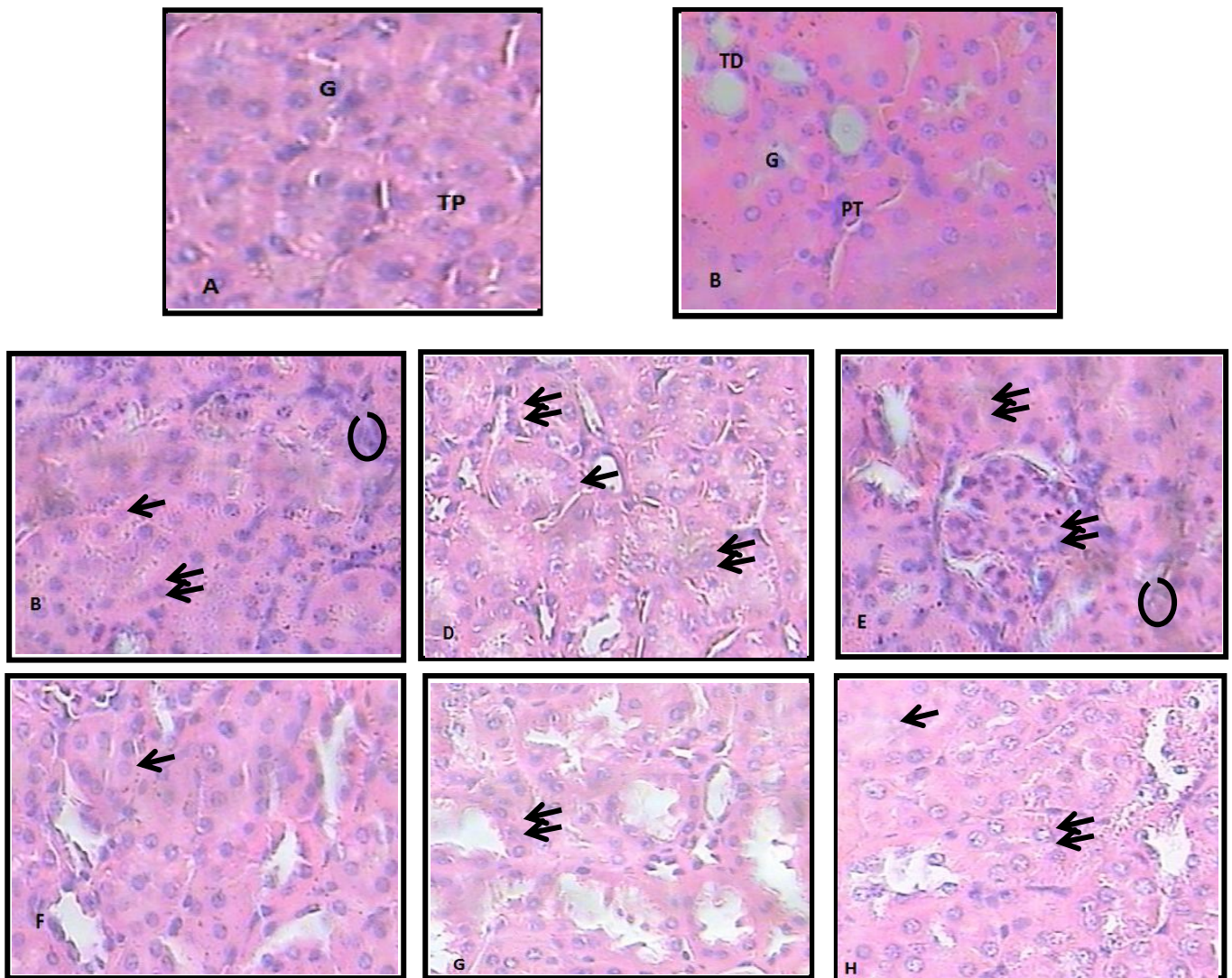


Figure 15 : Coupes histologiques des reins des souris témoin (A), les traités par la vitamine C (16.66mg/kg) (B), les traités par le chlorure de nickel aux différentes doses 3mg/kg (C), 5mg/kg (D) et 10mg/kg (E) et les prétraités par la vitamine C suivie par une injection intra-péritonéale de nickel; Vit C + Ni(II) 3mg/kg (F), Vit C + Ni(II) 5mg/kg (G) et Vit C + Ni(II) 10mg/kg (H). Gr: x40.

G : Glomérule de structure normale

TD : Tube distal.

TP: Tube proximale

↔ : Altération glomérulaire et nécrose tubulaire

→ : Hyalinisation des tubes proximaux

○ : Accumulation des acides gras

5.2. Evaluation histo-pathologiques en fonction de durée d'exposition.

D'après l'évaluation histo-pathologiques des souris traités par 5mg Ni(II)/kg PC pour différentes durées d'expositions (6h, 24h et 48h) et les prétraités par la vitamine C avec le nickel dans les mêmes conditions expérimentales (dose et temps), nous constatons des altérations glomérulaires, hyalinisation de certaines tubes proximaux et nécrose tubulaire chez les souris traités au 5mg Ni(II)/kg PC (24h et 48h) (**fig. 13 J et fig. 14K**). Cependant, ces altérations tissulaires sont moins importantes pour les souris traités au 5mg Ni(II)/kg (6h). Nous remarquons quelques cas de nécrose tubulaire avec l'accumulation des acides gras autour des glomérules (**fig.13 I**). Le prétraitement par la vitamine C suivie par une injection de 5mgNi(II)/kg PC (6h, 24h et 48h) montre une amélioration dans l'architecture tissulaire, et ceci est expliqué par la diminution de nécrose tubulaire et de l'altération glomérulaire avec la présence de quelques foyer hémorragiques entre les tubes proximaux (**fig.13L, 13M et 13N**).

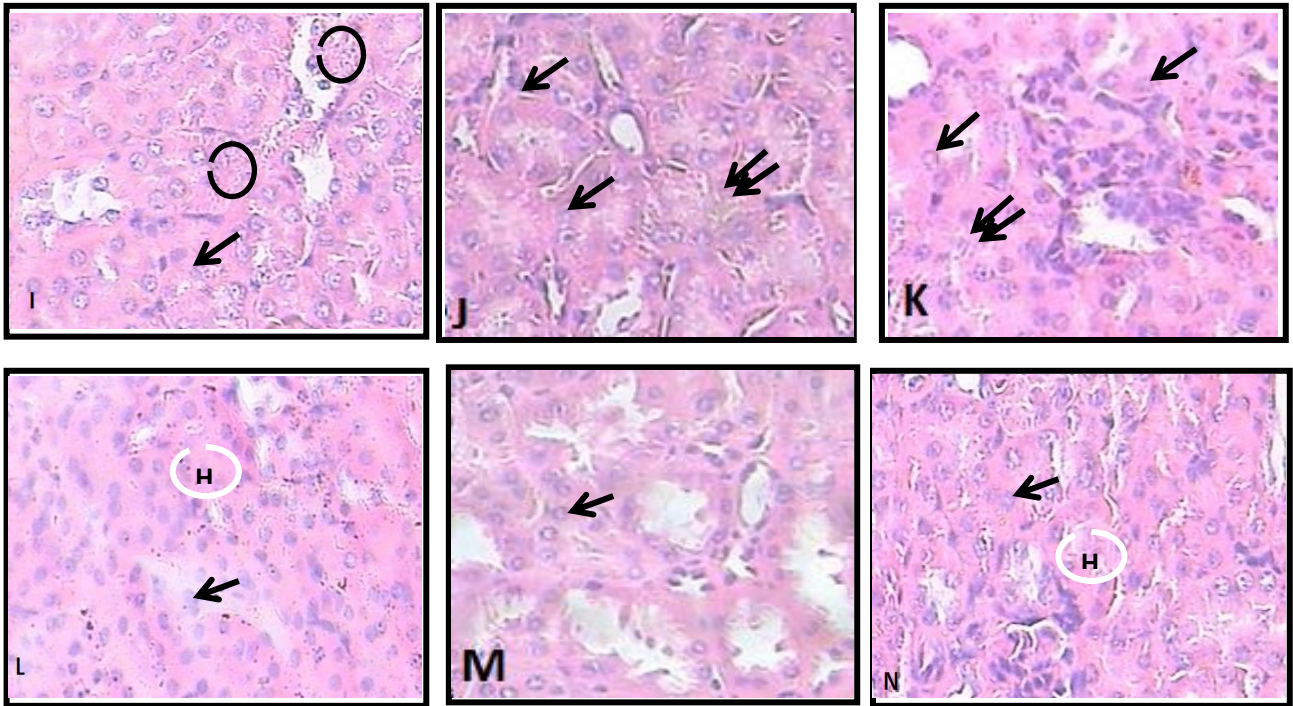


Figure 16 : Coupes histologiques des reins des souris traités par le chlorure de chlorure de nickel à raison de 5mg/kg aux différentes durée d'exposition ; 6h, 24h et 48h (I, J, K), et les prétraités par la vitamine C suivie par une injection intra péritonéal de nickel; Vit C + Ni(II) 5mg/kg 6 h, 24h et 48h (L, M, N) Gr: x40.

- ↗ : Altération glomérulaire et nécrose tubulaire
- : Hyalinisation des tubes proximaux
- : Accumulation des acides gras
- H : Foyer hémorragique

Chapitre 4
Discussion
Conclusion générale
Perspectives

- Discussion

De nombreuses études ont montré que la plupart des métaux lourds tel que le nickel, le vanadium, le plomb, le cadmium, l'arsenic, le cobalt et autres sont considérés comme des véritables agents toxiques, perturbant certains systèmes enzymatiques et également les activités métaboliques chez l'homme et l'animale (**Das and Saha, 2010**). Par ailleurs, la toxicité d'un métal pour un organisme peut être modifiée par l'exposition préalable, simultanée, ou consécutive à un autre métal. Les effets peuvent alors soit s'additionner ou s'amplifier, soit au contraire se combattre (**Viala, 1998**). De plus, les atteintes rénales dues aux métaux lourds sont directement liés à la nature, à la dose et à la durée d'exposition. Elle a été documenté que l'intoxication aiguë et chronique aux métaux lourds incluant le nickel sont capable d'induire le dysfonctionnement tubulaire et l'insuffisance rénale (**Pari and amudha, 2011**). A cet effet, nous avons prétraité les souris males par la vitamine C suivie par une administration des doses différentes du chlorure de nickel et au trois durées d'expositions différentes qui correspondent à la toxicité aiguë. Ici, nous vaudrons tester l'effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité du nickel. De plus, nous avons sélectionné les reins comme un organe cible à l'effet indésirable de xénobiotique étudié. Ceci est pour la que la plupart de documentations toxicologiques ont confirmé que les reins jouent un rôle important dans l'accumulation de certains métaux toxiques et l'élimination des leurs métabolites toxiques (**Dahdouh et al., 2014; Das et al., 2008**).

Dans nos conditions expérimentales, nous remarquons un déficit pondéral et une diminution de la consommation alimentaire chez les souris traités au Ni(II) par rapport aux témoins. Ceci est en accords avec les constatations de **Sidhu et al (2004) et Dahdouh et al (2013)**. Le poids pondéral des animaux présente un indice fondamental pour les études toxicologiques (**Yavasoglu et al., 2008**). En revanche, ces effets toxiques sur la physiologie de l'animale pour les lots prétraités à la vitamine C suivie par une administration des doses de Ni(II) sont moins importants à ceux enregistrés chez les souris traités au nickel seul et aux souris témoins. Nombreux travaux ont montré que les métaux lourds incluant le nickel sont capables d'induire des perturbations physiologiques et métaboliques chez l'homme et l'animale, en influençant sur l'absorption et le transport des éléments nutritifs (les acides aminées, le glucose et certains autres minéraux essentiels comme le zinc, le fer, le magnésium, etc.) et par conséquence, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments par l'organisme (**Hattiwale et al., 2013**). De plus, des études précédentes ont montré

que la perte du poids corporel peut être expliquée par une augmentation de catabolisme des lipides et des protéines de l'organisme sous l'effet toxique (Sidhu *et al.*, 2004). En ce qui concerne les poids de l'organe excréteur (reins), le Ni(II) a causé une augmentation claire des poids absolus et relatifs des reins en comparaison avec le lot témoin. Ceci est explicable, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire des reins et d'autre part, par l'accumulation intense de nickel dans cet organe cible (Vyskocil *et al.*, 2003; Permenter *et al.*, 2011). De plus, la cytotoxicité du Ni(II) est accompagnée par l'induction de la mort cellulaire par apoptose de certains lignées cellulaires (Wang *et al.*, 2012; Dahdouh *et al.*, 2014) et par conséquent, l'accumulation des composés lipidiques et principalement la céramide (composant de la membrane plasmique) chez les cellules apoptotiques (Dahdouh *et al.*, 2014). Alors, nos résultats pour les poids des reins peuvent être expliqués par l'accumulation de la céramide dans les cellules rénales mortes par apoptose.

L'analyse néphrotoxique de la toxicité aigue montre une augmentation claire des concentrations sériques de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine chez les souris traités par les trois doses de nickel pendant la durée d'exposition de 6h et 24h en comparaison avec les souris témoins. Ces paramètres biochimiques sont considérés comme des biomarqueurs de la dysfonction rénale et les dommages rénaux provoqués par ce métal. Particulièrement, l'urée et la créatinine ce sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Chakrabarti and Bai, 1999). 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. Alors, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine (Pari and Amudha, 2011). De plus, l'hyper uricémie est un marqueur de dysfonctionnement rénal et peut indirectement liée à l'inhibition de l'uricase par l'acide oxonique conduisant à l'hypertension et aux maladies vasculaires intra-rénales (Ashrafi *et al.*, 2012), ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, avec une baisse de la filtration glomérulaire. En accord avec nos résultats Pari and Amudha (2011), Tikare *et al* (2013). En effet, 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. De même, selon Tikare *et al* (2013). De plus, les changements morphologiques au niveau des glomérules et des tubes proximaux après 24h et 48h d'injection de nickel (5mg et 10mg Ni(II)/kg PC) montrent un bon indicateur de l'insuffisance rénale. Ceci confirme la mauvaise filtration glomérulaire des composés

protéiques et ainsi une élévation de leurs concentrations sériques (**Tanaka-Kagawa et al., 1998**). En revanche, les concentrations sériques des paramètres mentionnés montrent une chute remarquable après une durée d'exposition à 48h du nickel. Ce résultat est similaire à celle observée chez des souris traités par HgCl₂ (20 mmol/kg sous cutané). Alors, la diminution dans la concentration sérique de l'urée peut probablement être expliquée par la réabsorption lente et partielle de l'urée pour générer l'osmolarité de la concentration d'urine pour assurer une filtration même faible mais existe; c'est une sorte d'état de souffrance rénale et de la résistance plus ou moins long sous l'effet toxique (**Zhao et al., 2006; Tanaka-Kagawa et al., 1998**). Alors, elle est raisonnablement de dire que les doses du chlorure de nickel utilisées dans notre expérimentation ne sont pas suffisantes pour causer une destruction sévère de la structure rénale et de perturber complètement sa physiologie ?!!

Autre explication concernant la diminution de la concentration sérique de l'urée, de la créatinine et des protéines suggère que le manque quantitatif d'apport alimentaire et non par une insuffisance rénale est responsable à l'élévation de leurs concentrations sériques. Il semble donc que la réduction de la quantité des aliments ingérés réduise le catabolisme protéique et baisse par voie de conséquence les taux plasmatiques de la créatinine, de l'urée et des protéines. Ceci réalisée en présence du double stress, témoigne de l'activation de l'excrétion urinaire par augmentation du métabolisme général de l'organisme par le nickel (**Uthus and Paellot, 1996**).

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) (**Amudha and Pari, 2011**). 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, ce qui peut expliquer sa diminution après 48 h d'injection du 5mg Ni(II)/kg PC et ainsi confirme sa participation au système de défense antioxydant (**Becker et al., 1993; Patel et al., 2012**). La vitamine C a atténué l'effet oxydatif du Ni (II), conduisant à l'élévation de la concentration d'acide urique. Ce résultat est confirmé par nombreux chercheurs qui ont expliqué clairement le rôle antioxydant de la vitamine C (**Das and Saha, 2010 ; Antunes et al., 2000**).

Concernant l'effet sur le taux lipidique, le nickel a causé une augmentation significative de la concentration sérique des lipides totaux en comparaison avec les souris témoins. Cette augmentation peut être le résultat des dégradations intenses des tissus adipeux dans l'organisme (**Cempel and Janicka, 2002**). La chute des taux des lipides totaux après l'injection de 5mg Ni(II)/kg PC peut être explicable par l'utilisation des lipides dans la production d'énergie aux fonctions vitales de l'organisme sous la toxicité du nickel (**Sidhu et al., 2004**).

L'hyperprotéinémie enregistrée chez les souris traitées au nickel en comparaison avec le lot témoin est probablement expliqué par la cytolysse cellulaire par nécrose, conduisant à la libération des différents composants protéiques incluant les enzymes du foie dans le milieu extracellulaire, d'où l'élévation de leurs concentration dans le sang. D'une autre part, la diminution des taux des protéines sériques après 48h de l'injection de nickel est due à une diminution de la consommation alimentaire d'apport protéique (**Pari and Amudha, 2011**).

Concernant les atteintes tissulaires des reins, nous avons constaté des altérations et des changements de l'architecture tissulaire du rein clairement observées chez les souris traités au nickel en comparaison avec ceux des témoins. Ces effets histo-pathologiques sont en dose dépendante et en fonction du temps d'exposition manifestés généralement par nécrose glomérulaire et tubulaire. Cependant, l'observation histologique des reins a été restaurée à presque normal pour le prétraitement par la vitamine C, ce qu'explique clairement l'action protecteur de cette vitamine à réduire la menace des radicaux oxygénés, et par conséquence la réduction de changement pathologiques. Ce résultat est similaire à celle constatée par **Tikare et al (2013)** et **Amudha et Pari (2011)**.

- Conclusion générale

En conclusion, nos résultats montrent que l'intoxication aiguë du nickel en dose dépendante et au différentes durée d'exposition chez les souris males adultes provoque des effets néphrotoxiques et histo-pathologiques qu'on peut les résumés dans les points suivants :

- L'aspect physiologique montre que le nickel a induit un déficit pondéral avec une augmentation de poids relatif moyen des reins par rapport au lot témoin.
- La concentration sérique de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, des lipides totaux et des protéines totales montre une augmentation claire en dose dépendante et en fonction du temps du nickel.
- L'aspect histologique montre des modifications tissulaires remarquables des reins des souris traitées par le Ni (II) seul. Ces modifications histologiques sont caractérisées par l'appariation des nécroses glomérulaires et tubulaires. Notons que ces signes histopathologiques sont moins importants chez les lots prétraités par la vitamine C suivie d'une injection I.P du nickel après 6h, 24h et 48h en comparaison avec les souris traités au Ni(II) seul et les témoins.

- PERSPECTIVES

- ✓ Utiliser un effectif suffisant de l'animal durant le travail expérimental (*minimum 8 souris/lot*) pour mieux évaluer le test toxicologique et pour une bonne exploration statistique des résultats.
- ✓ Il serait intéressant de développer ces recherches d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur l'appréciation de la détoxification de l'organisme, à travers l'analyse de tous les éléments de la cascade enzymatique et non enzymatique du système de détoxification et d'antioxydant.
- ✓ Faire une étude parallèle sur l'effet hépato-protecteur de la vitamine C contre la toxicité du nickel.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Ajith TA, Abhishek G, Roshny D, Sudheesh NP (2009). Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* **61**(6), 565-71.

Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD (2000). Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res.* **41**, 405-11.

Anwar K, Kayden HJ, Hussain MM (2006). Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J Lipid Res.* **47**, 1261-73

Amudha K and Pari (2011). Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions.* **193**, 57–64

Atasayar S, Gürer-Orhan H, Orhan H, Gürel B, Girgin G, Ozgüneş H (2008). Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* **61**(1), 23-32.

Burtis,A. (1999). *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd edition. 45-56, New Y press

Chakrabarti SK, Bai JY (1999). Role of oxidative stress in nickel–chloride-induced cell injury in renal cortical slices, *Biochem. Pharmacol.* **28**, 1501–1510.

Chen CY, Huang YL, Lin TH (1998). Effects of vitamin A pretreatment on nickel-induced lipid peroxidation and concentration of essential metals in liver, kidney and lung of mice. *Arch Toxicol.* **72**(6), 381-6.

Cempel M and Janicka K. (2002). Distribution of nickel, zinc, and copper in rat Organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* **90** (1), 215–226.

Cramer K, Goyer R, Jagenburg R, Wilson MH (1974). Renal ultra structure, renal function and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure, *Brit. J. Industry Med.* **31**, 113–127.

Dahdouh F, Kechrid Z, Djebar MR (2013). Beneficial Effects of Vitamins (C + E) Supplementation against Nickel-induced Hepatotoxicity in Mice. *Adv. Biores.* **4**(2), 67-71.

Dahdouh F, Raane M, Thévenod F, Lee WK. (2014). Nickel-induced cell death and survival pathways in cultured renal proximal tubule cells: roles of reactive oxygen species, ceramide and ABCB1. *Arch Toxicol.* DOI 10.1007/s00204-014-1194-x.

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

Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008). Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res.* **128**, 117-131.

Das KK, Saha S (2010). L-ascorbic acid and a-tocopherol supplementation and antioxidant status in nickel or lead exposed rat brain tissue. *J Basic ClinPhysiolPharmacol* **21**(4), 325–346

D'Agostini F, Balansky RM, Camoirano A, De Flora S (2000). Interactions between N-acetylcysteine and ascorbic acid in modulating mutagenesis and carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* **88**(5), 702-7.

Dhir H, Agarwal K, Sharma A, Talukder G (1991). Modifying role of *Phyllanthus emblica* and ascorbic acid against nickel clastogenicity in mice, *Cancer letters*. **59**, 9-18

Ebuehi OA, Ogedegbe RA, Ebuehi MO (2012). Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead-induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. *Nig Q J Hosp Med* **22**(2), 85-90.

Fahmy MA, Hassan HA, Farghaly AA, Hassan EE.(2008). Studies on the genotoxic effect of beryllium chloride and the possible protective role of selenium/vitamins A, C and E. *Mutat Res.* **652**(2), 103-11.

Frei B (2004). Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. *J Nutr.* **134**, 3196S–3198S

Gerhad I, Runnebaum B (1992). Environmental pollutants and fertility disorders, Heavy metals and minerals, *Geburtshilfe Fnaunenheilkd* **52**, 383–396.

Gey KF (1998). Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors.* **7**, 113-174

Haber LT, Diamond GL, Zhao Q, Erdreich L and D Ourson ML(2000). Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Regul .Toxicol.Pharmacol.* **31**(2 Pt 1), 231-41.

Henderson RG, Cappellini D, Seilkop S, Bates H, Oller A(2012). Oral bioaccessibility testing and read-across hazard assessment of nickel compounds, *Reg Toxicol Pharmacol* ; in press, doi:10.1016/j.yrtph.2012.02.005.

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

Houlot R (1984). *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*, Ed Maloine, Pp 19- 21, 225 – 227.

Kaplan, A. (1984). Urea. *Clin. Chem. Toronto. Princeton.* pp 1257-1260, 437 and 418.

Kaplan, A et al (1984). Lipids. *Clin. Chem. Toronto. Princeton.* pp 918-919.

Kasprzak KS, Diwan BA, Kaczmarek MZ, Logsdon DL, Fivash MJ, Salnikow K (2011). Effects of ascorbic acid on carcinogenicity and acute toxicity of nickel subsulfide, and on tumor transplants growth in gulonolactone oxidase knock-out mice and wild-type C57BL mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **257**(1), 32-7.

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. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **258**, 367–375.

Lauwerys R(2000). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. 4 e édition. pp 155 – 158, 192 – 195.

Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y (1999). Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Journal of the American Medical Association* **281**, 1415-1423.

Pari L and Amudha K (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology* **650**, 364–370

Pfaller W, Gstraunthaler G (1998). Nephrotoxicity testing in vitro. What we know and what we need to know, *Environ. Health Perspect.* **106**, 559–569.

Li Y and Zamble DB (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chem. Rev.* 109:4617–4643.

Liang WJ, Johnson D, Jarvis SM (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* **18**, 87–95

Maniyar SA, Jargar JG, Das SN, Dhundasi SA, Das KK (2012). Alteration of chemical behavior of L-ascorbic acid in combination with nickel sulfate at different pH solutions in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **33**, 220-222.

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

-Nielsen FH, Yokoi K and Uthus EO (2002). The essential role of nickel affects physiological functions regulated by the cyclic-GMP signal transduction system. *Metal. Ions*. **7**, 29-33.

Rahman I, Biswas S K and Kode A (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology*. 533, 222-39

Rao MV, Chawla SL, Sharma SR. Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary (2009). *Food Chem Toxicol* **47**(6), 1368-71.

San Miguel SM, Opperman LA, Allen EP, Zielinski JE, Svoboda KKH (2013). Antioxidant combinations protect oral fibroblasts against metal-induced toxicity. *Archives of oral biology* **58**, 299 – 310.

Schaumlöffel D (2012). Nickel species: Analysis and toxic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **26**, 1– 6

-Sidhu P, Garg ML, Dhawan DK (2004). Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats *Chem. Biol. Interact.* **150**(2), 199-209.

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

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**:1–40.

Tikare S, Yendigeri S, Das GA, Salim A D and Das KK (2013). Protective effect of α -tocopherol against hematotoxicity, hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by nickel sulfate in male albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* **57**(3), 280–292.

Tanaka-Kagawa T, Suzuki M, Naganuma A, Yamanaka N And Imura N (1998). Strain Difference in Sensitivity of Mice to Renal Toxicity of Inorganic Mercury. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* **285** (1), 335-341.

Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA (1999). A family of mammalian Na⁺- dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature.* **399**, 70–75

Uthus EO, Paellot RA (1996). Dietary folate effects the response of rats to Ni deprivation, *Biol. Trace Element Res.* **52**,23–25.

Wandzilak TR, D'Andre SD, Davis PA, Williams HE (1994). Effect of high dose vitamin C on urinary oxalate levels. *Journal of Urology.* **151**, 834-837.

Wang YF, Shyu HW, Chang YC, Tseng WC, Huang YL, Lin KH, Chou MC, Liu HL, Chen CY (2012) Nickel (II)-induced cytotoxicity and apoptosis in human proximal tubule cells through a ROS- and mitochondria-mediated pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **259**(2), 177–186. doi:10.1016/j.taap.2011.12.022

Yavasoqlu A, Karaaslan MA, Uyaniqil Y, Sayim F, Ates U, Yavasoqlu NU (2008). Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Experimental and toxicologic pathology* .**60**(4-5),391-6. doi: 10.1016/j.etp.2008.04.001.

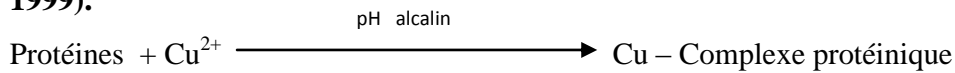
Zhao D, Bankir L, Qian L, Yang D, Yang B (2006). Urea and urine concentrating ability in mice lacking AQP1 and AQP3. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **29**(1), F429-F438 DOI: 10.1152/ajprenal.00011.

Annexes

❖ **Fiche technique « SpinReact, Girona Spain » pour dosage des protéines totales**

Principe

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



Réactifs utilisés

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

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire

	Blancs	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	---	20	---
Echantillon (µl)	---	---	20

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

Calcul de la concentration

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

❖ **Fiche technique « SpinReact, Girona Spain » pour dosage de l'urée**

Principe :

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



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

Échantillon : Sérum

Les réactifs utilisés

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

Mode opératoire

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

Préparation des réactifs

- Dissoudre un caché de réactif (B) dans la fiole de réactif (A).
- Agiter bien la solution R (A) + R (B) qui 'est stable pendant 4 semaine à une température de 2-8°C ou une semaine à une température ambiante.
- Mélanger et incuber les tubes à essais pendant 5min à 37°C.
- Ajouter pour chaque tube préparé 1 ml de réactif (D).
- Lire l'absorbance (A) de l'étalon et des échantillons à 580 nm.

Calcul :

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

❖ **Fiche technique « SpinReact, Girona Spain » pour dosage de la créatinine**

Principe :

La créatinine présente dans l'échantillon de sérum réagit avec le picrate en milieu alcalin, pour donner un complexe dans des périodes initiales courtes en évitant ainsi l'interférence d'autre composé.

Echantillon : Sérum

Réactives Utilisés

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

Mode opératoire

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

Préparation de réactif De Travail (RT)

- Mélanger des volumes égaux des réactifs (A) et (B)
- Agiter bien pendant 1 min, cette solution devient stable 2 mois à 2-8 °C.
- Préchauffer le réactif de travail et l'échantillon pendant quelques minutes à 37 C.
- Enregistrer l'absorbance (A) à 500 nm après 30 seconde (A1) et après 90 seconde (A2) de l'incubation.

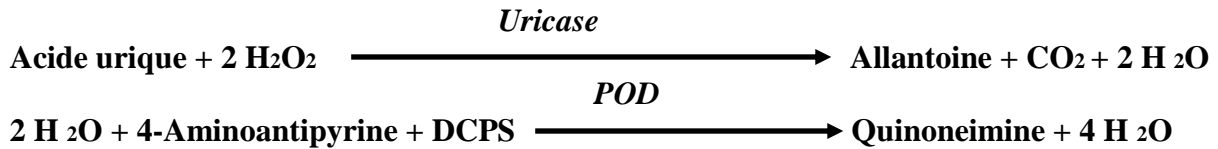
Calcul :

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

❖ **Fiche technique « SpinReact, Girona Spain » pour dosage de l'acide urique**

Principe

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



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

Réactifs utilisés

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

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire

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

- Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. --
- Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 520 nm.
- La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Calcul de la concentration

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

❖ **Fiche technique « SpinReact, Girona Spain » pour dosage des lipides totaux**

Principe

Les lipides insaturés réagissent avec l'acide sulfurique pour former des ions carbonium ensuite ces ions forment avec le phosphovanille un complexe rose.

Réactifs utilisés

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

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

Echantillon : Sérum

Mode opératoire :

	Blancs	Etalon	Echantillon
H ₂ SO ₄ (ml)	2.5	2.5	2.5
Etalon (µl)	---	100	----
Echantillon (µl)	----	----	100

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

2. Refroidir les tubes dans l'eau glacée.

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

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

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

La coloration est stable une heure.

Calcul de la concentration :

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

Annexes : Fiches Techniques des Dosages Biochimiques

		<i>Urée sanguine g/L</i>	<i>Créatinine Mg/L</i>	<i>Acide urique Mg/L</i>	<i>Lipides TTX g/L</i>	<i>Protéines TTX g/L</i>
Lot A	<i>temoins</i>	0.33	3.97	61.33	3.90	50.03
		0.29	3.72	58.11	4.24	53.71
		0.28	4.10	58.62	4.10	55.18
	<i>Traités par Vit C</i>	0.33	3.89	52.09	4.70	54.23
		0.38	3.95	69.18	4.31	61.17
		0.27	4.20	55.34	3.60	58.41
Lot B	<i>Traités par Ni 3mg/kg</i>	0.32	4.26	63.23	4.81	62.70
		0.35	3.80	65.12	4.69	69.18
		0.33	4.03	64.17	4.75	65.94
	<i>Traités par Ni 5mg/kg</i>	0.37	4.11	59.13	5.34	67.09
		0.35	5.32	61.33	5.41	70.68
		0.42	5.83	78.01	4.80	81.40
	<i>Traités par Ni 10mg/kg</i>	0.45	9.20	71.19	7.66	83.26
		0.48	6.35	83.51	8.93	85.34
		0.43	5.97	79.88	5.62	75.10
Lot C	<i>Vit C+Ni 3mg/kg</i>	0.27	4.16	59.13	3.81	61.23
		0.31	3.92	73.20	4.79	49.11
		0.28	4.89	48.53	3.96	58.42
	<i>Vit C+Ni 5mg/kg</i>	0.37	4.00	69.48	4.06	62.07
		0.33	4.27	59.77	5.26	57.81
		0.34	4.89	58.31	4.19	54.77
	<i>Vit C+Ni 10mg/kg</i>	0.47	5.27	73.84	5.70	73.12
		0.42	2.12	72.11	6.27	69.21
		0.38	4.82	62.17	6.51	68.10
Lot D	<i>5mg /kg Ni Sacrifice 6h</i>	0.35	3.61	55.22	4.34	56.51
		0.27	5.06	56.11	3.28	54.58
		0.41	4.59	80.18	5.22	75.23
	<i>5mg /kg Ni Sacrifice 48h</i>	0.24	4.25	44.22	3.69	53.49
		0.22	3.70	40.41	3.24	49.94
		0.25	4.12	38.92	4.06	55.28
Lot E	<i>Vit C+Ni Sacrifice 6h</i>	0.31	5.11	74.76	3.89	62.14
		0.30	3.64	71.44	3.25	57.99
		0.27	4.51	86.83	4.28	59.93
	<i>Vit C+Ni Sacrifice 48h</i>	0.32	4.23	33.21	4.02	53.02
		0.26	3.98	36.38	2.81	53.10
		0.29	5.75	54.02	4.18	65.02

Les résultats des dosages biochimiques de tous les groupes après sacrifice en fonction des doses de Ni (II) et en fonction de temps

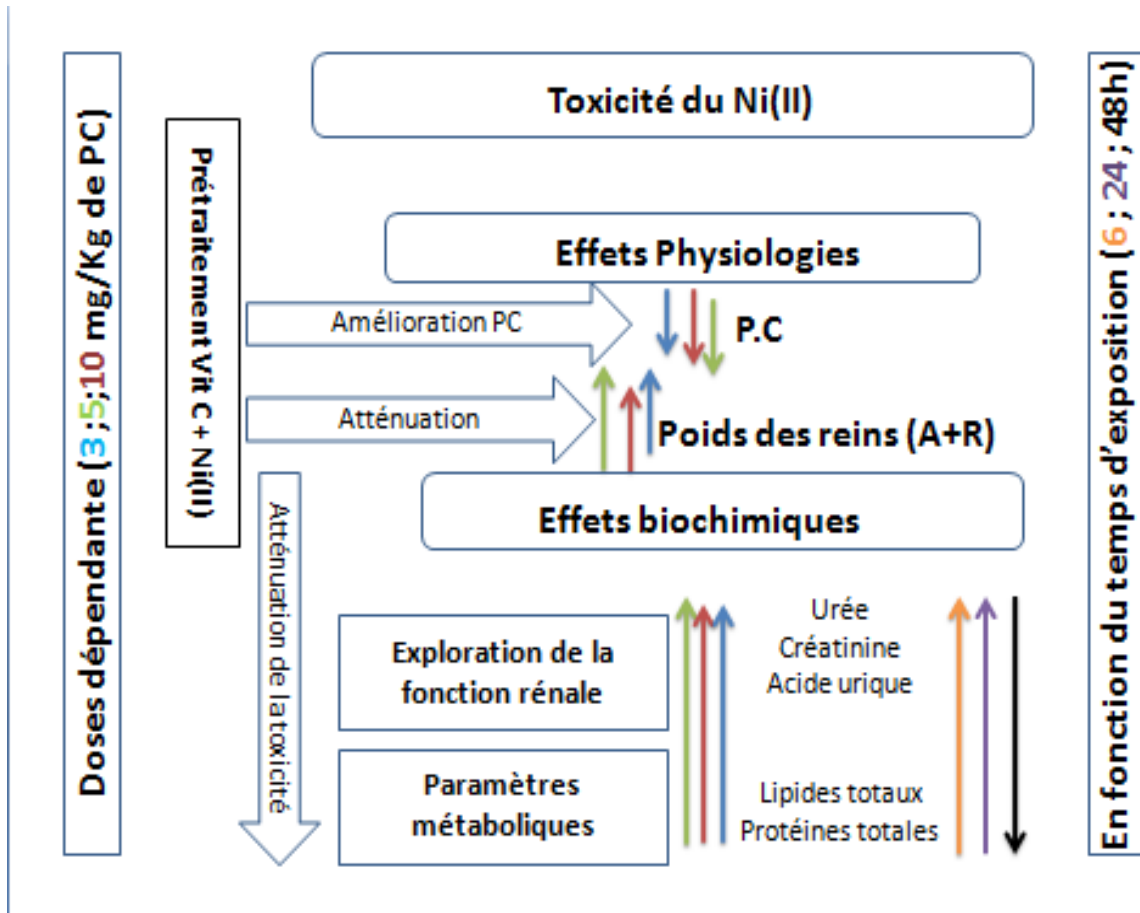


Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'évaluation biochimique de la néphrotoxicité aigue de Nickel en fonction de différentes doses administrées et différents temps d'exposition

Abstract

Exogenous antioxidant substances are considered to be helpful in attenuating toxic effects and carcinogenicity of heavy metals. Therefore, this study was devoted to evaluate whether pretreatment with vitamin C could attenuate nickel induced nephrotoxicity in dose response and time course in mice. In this investigation nickel chloride (5 mg/kg b.wt) was administered intraperitoneally for 24 hours to induce acute toxicity. Vitamin C (16.66mg/kg b. wt/per day) was administered by oral gavage to mice for 7 days. For Ni(II) + Vit C, mice were administered orally by vitamin C for 7 days. On the 8th day, NiCl₂ (5 mg Ni/kg b. wt.) was injected i.p. to Vit C- for 24 hours. In dose response, mice were treated with 3mg, 5mg and 10mg Ni(II)/kg b.wt for 24 hours. In time course, mice were injected with 5mg Ni(II)/kg b.wt for 6 hours, 24 hours and 48 hours. Pretreatment with vitamin C along with nickel chloride in dose dependant and time course was also studied in mice. Vitamin C pretreatment alone did not disturb kidney function. Nickel caused in dose and time dependent manner a significant decrease in final body weight along with significant increase in kidney-body weight ratio and the serum levels urea, creatinine, uric acid, total lipids and total proteins as compared to controls. The extent of kidney marker alterations in Vit C + Ni treated mice was attenuated when compared with nickel alone and to control treated mice. Pretreatment with Vit C reduced the increased biochemical markers in the kidney caused by Ni injection. We therefore conclude that the effect of Vit C pretreatment on Ni toxicity is more efficient in dose and time dependent.

Résumé

Les Substances antioxydantes exogènes sont utilisées pour atténuer les effets toxiques et cancérigènes de métaux lourds. Par conséquent, cette étude a été consacrée pour évaluer le prétraitement par la vitamine C et son pouvoir d'atténuer la néphrotoxicité de Nickel en dose-réponse et en fonction du temps d'exposition chez les souris. Dans cette enquête le chlorure de nickel (5 mg / kg de poids corporel) a été administré par voie intrapéritonéale pendant 24 heures pour induire une toxicité aiguë. La vitamine C (16.66mg/kg de poids corporel / par jour) a été administré par gavage aux souris pendant 7 jours. Pour Ni (II) + Vit C, les souris ont été administrés par voie orale de la vitamine C pendant 7 jours. En 8^{ème} jour, NiCl₂ (5 mg Ni / kg de poids corporel.) a été injectée ip pendant 24 heures. En dose - réponse , les souris ont été traitées avec 3 mg, 5 mg et 10 mg de Ni (II) / kg poids corporel pendant 24 heures. En fonction du temps, les souris ont été injectées avec 5 mg de Ni (II) / kg poids corporel à 6 heures, 24 heures et 48 heures. Le prétraitement avec la vitamine C avec le chlorure de nickel en dose-réponse et en fonction du temps a également été étudiée. Le prétraitement par la vitamine C seul ne perturbe pas la fonction rénale. Le nickel a provoqué en dose et au temps de manière dépendante une diminution significative de poids corporel final en même temps que l'augmentation significative du rapport de poids du corps et les reins, du taux sériques de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique, des lipides totaux et des protéines totales par rapport aux ceux enregistrés chez les souris témoins. L'ampleur de la modification des biomarqueurs biochimiques de fonction rénale chez les souris traitées Vit C + Ni a été atténuée en comparaison avec ceux traités au nickel seul et les témoins. Un prétraitement avec Vit C réduit l'augmentation des marqueurs biochimiques dans le rein causées par l'injection de nickel. Nous concluons donc que le prétraitement par la vitamine C a un effet bénéfique sur la toxicité de nickel en fonction de la dose et en fonction du temps.

المخلص

تعتبر المواد المضادة للإجهاد التأكسدي ذات المصدر الخأمرجي مفيدة في تخفيف حدة السمية وأمراض السرطان للمعادن الثقيلة ، لذلك أجريت هذه الدراسة على غرام معرفة إذا كانت المعالجة القبلية بالفيتامين C قادرة على تخفيف التسمم الكلوي للنikkel وذلك في تغيير نظام الجرعة مع الاستجابة الجسمية ، وتغيير مدة التعرض للمادة السامة . في هذه الدراسة 5ملغ من النikkel حققت في الجرعي تحت الفخذ لمدة 24 ساعة وذلك لإحداث التسمم الحاد . الفيتامين C (16,66 مغ/كغ وزن جسمي) أدخلت عن طريق الفم الفئران لمدة 7 أيام . للمعالجة ب(النikkel +فيتامين C) عولجت الفئران بفيتامين C عن طريق الفم لمدة سبع أيام وفي اليوم الثامن تلقت 5 مغ/كغ وزن جسمي من كلومبر النikkel عن طريق الحقن تحت الفخذ لمدة 24 ساعة . الدراسة السمية بتغيير جرعات النikkel واستجابة الفئران ، عولجت الفئران ب 3ملغ، 5ملغ، 10ملغ من النikkel /كغ وزن جسمي لمدة 24 ساعة . الدراسة السمية لتغيير مدة التعرض للمادة السامة ، عولجت الفئران ب 5ملغ/كغ وزن جسمي عن طريق الحقن تحت الفخذ لمدة 6 ساعات، 24 ساعة، و 48 ساعة . المعالجة القبلية بالفيتامين C لوحده لم تبين اضطرابات في الوظيفة الكلوية ، إضافة إلى ذلك أدى عنصر النikkel إلى انخفاض ملحوظ في الوزن الجسمي النهائي مع ارتفاع في نسبة الوزن الكلوي والوزن الجسمي والمستوى المصلي لمادة اليوريا ، الكرياتينين ، والحمض اليوريك والبروتينات والليبيدات الكلية وذلك وفقاً لتغيرات جرعات النikkel ومدة التعرض للمادة السامة . التأثير واسع المدى على المعايير الكلوية للفيتامين C و النikkel قد انخفضت على الفئران مقارنة مع الفئران المعالجة بالنikkel فقط ومع مجموعة السيطرة . المعالجة القبلية بالفيتامين C خفضت من حدة تأثير النikkel المؤدي إلى ارتفاع في تراكيز المعايير البيوكيميائية للكلية . و خلاصة لذلك ، المعالجة القبلية بالفيتامين C على سمية عنصر النikkel تعتبر جد فعالة وفقاً لتغيير الجرعات ومدة التعرض للمادة السامة