

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIER ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences De La Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre :44/D3C/2018

N° de série :02/BA/2018



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Option : Physio-toxicologie Cellulaire

Présentée et soutenue par :
LAIB Samira

Intitulée :

Le rôle de *Thymelaea microphylla* dans l'amélioration du stress oxydant et du taux de la métallothionéine induits par le cadmium dans le rein chez le rat.

Soutenue le : 10 Mai 2018

Devant le jury :

Président :	Pr. ZAMA Djamila	Université des frères Mentouri Constantine 1
Directeur :	Pr. LALAOUI Korichi	Université des frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. DAHAMNA Saliha	Université Ferhat Abbas Sétif 1
	Pr. CHERIF Abdennor	Université Badji Mokhtar Annaba

Dédicace

Je dédie ce travail

A l'âme de mon père, que Dieu lui accorde sa miséricorde et qu'il lui accueille dans son vaste Paradis et à ma chère mère pour leur aide moral et affectif durant toutes les années de mes études. Que Dieu la préserve et lui accorde santé et bonheur. Qu'ils trouvent dans ce mémoire le fruit de mes années d'études et le témoignage de mes reconnaissances et de mon amour.

A mon mari Youssef à qui j'exprime mon amour éternel. Ses encouragements et sa disponibilité m'ont été précieux pour accomplir ce travail.

A ma chère fille Lina Alaa qui a supporté mon absence. Qu'elle trouve dans ce travail l'expression de mon attachement et mon profond amour.

A mes sœurs Nedjma et Nassira, mon frère Ali pour leur amour, respect et soutien.

A ma belle-mère, mes belles-sœurs et beaux-frères, pour leur amour et respect.

Avec toute mon affection

REMERCIEMENTS

Pour cette heureuse occasion, nos sincères remerciements s'adressent à priori à Allah qui nous protège à tout moment de notre vie et qui nous a donné la force et la patience pour réussir à nos études.

A **Mr. LALAOUI, K**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine, d'avoir accepté la direction de mes travaux et pour sa générosité scientifique. Qu'il veuille trouver ici les expressions de considération et de gratitude.

A **Mme ZAMA Djamila**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine, d'avoir accepté de présider le jury de ce travail, je vous en suis très reconnaissante et j'espère être à la hauteur de votre confiance.

Aux membres de jury, **Mme DAHAMNA Saliha et Mr Abdelnnor CHERIF**, d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissante et j'espère être à la hauteur de votre confiance.

A **Mme AMEDDAH, S**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine, pour sa simplicité, son attention, sa prudence et sa générosité scientifique. Qu'elle veuille trouver ici les expressions de considération et de gratitude.

A **Mr. MENAD, A**, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Mentouri de Constantine, pour son aide, ses conseils précieux et sa prudence. Qu'il veuille trouver ici les expressions de considération et de gratitude.

A tous ce qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des figures

Figure 1 Les transporteurs du cadmium.....	9
Figure 2 Les voies du trafic du Cd dans le corps des mammifères.....	9
Figure 3 Les effets toxiques du cadmium dans le tubule proximal.....	14
Figure 4 Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium.....	20
Figure 5 L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO.....	22
Figure 6 Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd.....	23
Figure 7 Représentation schématique de la structure d'une métallothionéine dans le cas du piégeage du cadmium.....	25
Figure 8 Représentation schématique du cycle redox de MT.....	29
Figure 9 Image représentative de la plante <i>Thymelaea microphylla</i>	37
Figure 10 Protocole de l'extraction de <i>Thymelaea microphylla</i>	41
Figure 11 L'effet chélateur de DPPH [•] de EBTM et les standards.....	48
Figure 12 L'effet chélateur de OH [•] de EBTM et les standards.....	49
Figure 13 L'effet de EBTM sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.....	50
Figure 14 L'effet de EBTM sur le taux de la métallothionéine, induit par le CdCl ₂	53
Figure 15 Photomicrographie de l'analyse histopathologique du cortex rénal des rats.....	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols.....	33
Tableau 2 : Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre <i>Thymelaea</i>	39
Tableau 3 : Masse et rendement des extraits de <i>Thymelaea.microphylla</i>	42
Tableau 4 : L'effet protecteur de l'EBTM sur le dysfonctionnement rénal induit par le cadmium chez le rat (BUN et créatinine).....	51
Tableau 5 : L'effet de l'EBTM (200mg/Kg) sur le dysfonctionnement rénal induit par CdCl ₂ (Na ⁺ , K ⁺ GGT).....	51
Tableau 6 : L'effet protecteur de l'EBTM sur le stress oxydant induit par le cadmium chez le rat.....	52
Tableau 7 : L'effet de l'EBTM sur les paramètres de l'inflammation induite par le CdCl ₂ chez le rat.....	54

Liste des abréviations

Cd	Le cadmium
MT	La métallothionéine
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène
ADN	L'acide désoxyribonucléique
CdCl₂	Le chlorure de cadmium
Cu	Le cuivre
Hg	Le mercure
Ag	L'argent
ATP	L'adénosine triphosphate
Na	Le sodium
K	Le potassium
GSH	Le glutathion réduit
ARN	L'acide ribonucléique
ARNm	L'ARN messenger
ARNr	L'ARN polymérase
CdO	L'oxyde de cadmium
SH	Les groupements sulfhydryles
α1-MG	α 1-microglobuline
β2-MG	β 2-microglobuline
PTH	L'hormone parathyroïdienne
CO	L'oxyde de carbone
NAG	la N-acétylglucosaminase
Kim-1	Kidney injury molecule-1
IP3	Phosphoinositide-binding protein
XPA	Xeroderma pigmentosum group A enzyme
hOGG1	la 8-oxoguanine DNA glycosylase de type I
8-OHdG	8-hydroxydésoxyguanosine
ERO	Les espèces réactives de l'oxygène

CAT	La catalase
Gpx	La glutathion peroxydase
SOD	La superoxyde dismutase
Zn	Le zinc
GIF	Neuronal growth inhibitory factor
Cys	La cystéine
Pb	Le plomb
CPG	La chromatographie en phase gazeuse
CLHP	La chromatographie liquide haute performance
DTNB	5,5'-Dithiobis (2- nitrobenzoic acide)
ELISA	enzyme linked immunoassays
RIA	radio immunoassays
HIV	Le virus de l'immunodéficience humaine
EtOH	L'éthanol
CHCl₃	L'éther de pétrole
AcOEt	L'acétate d'éthyle
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
EBTM	L'extrait butanolique de <i>Thymelaea microphylla</i>
DPPH	diphényl picryl-hydrazyl
Abc	Absorbance du témoin
Abs	Absorbance de l'échantillon
OH·	Le radical hydroxyle
EDTA	L'acide éthylène diamine tétra-acétique
FeCl₃	Le chlorure de fer (III)
H₂O₂	Le peroxyde d'hydrogène
TCA	L'acide trichloroacétique
TBA	L'acide thiobarbiturique
PBS	Le tampon phosphate
BUN	Blood nitrogen urea
GGT	Gamma- glutamyltranspeptidase

NaCl	Le chlorure de sodium
KCl	Le chlorure de potassium
MDA	Le malondialdéhyde
O₂⁻	L'anion superoxyde
GST	Le glutathion S- transférase
CDNB	2,4-dinitrochlorobenzène
HCl	L'acide chlorique
MPO	La myéloperoxydase
NO	Le monoxyde de nitrogène
HOCl	L'acide hypochloreux
NO₂⁻	Le nitrite
NO₃⁻	Le nitrate
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
DFG	Le débit de filtration glomérulaire
TBARS	Les espèces réagissant avec l'acide thiobarbiturique

Table de matières

1. Introduction.....	1
2. Synthèse bibliographique.....	3
2.1.Le cadmium.....	3
2.1.1. Les métaux lourds.....	3
2.1.2. Les effets cellulaires des métaux lourds.....	3
2.1.3. L'élément cadmium.....	5
2.1.4. Métabolisme du cadmium.....	6
2.1.5. La toxicité du cadmium et les organes cibles.....	10
2.2.La néphrotoxicité du cadmium.....	13
2.2.1. Les effets tubulaires du cadmium.....	13
2.2.2. Les effets glomérulaires du cadmium.....	14
2.2.3. Biomarqueurs de la néphrotoxicité du cadmium.....	15
2.2.4. Mécanismes de la néphrotoxicité du cadmium.....	16
2.3.Rôle antioxydant de la métallothionéine (MT).....	24
2.3.1. Nomenclature et structure des MTs.....	24
2.3.2. Caractéristiques des métallothionéines.....	25
2.3.3. Induction des MTs.....	27
2.3.4. Rôles des MTs.....	28
2.3.5. Fixation des métaux sur les MTs.....	28
2.3.6. Dégradation des MTs.....	30
2.3.7. Les MTs comme biomarqueur.....	30
2.3.8. Les différentes méthodes de dosage des MTs.....	30
2.4.L'activité antioxydante des polyphénols.....	33
2.4.1. Classes des polyphénols.....	33
2.4.2. Propriétés biologiques des polyphénols.....	33
2.4.3. L'espèce <i>T. Microphylla</i>	36
3. Matériels et méthodes.....	40
3.1.Matériel végétal.....	40
3.2.Traitement des Animaux.....	42
3.3.Etude expérimentale.....	42

3.3.1. Etude in vitro.....	42
3.3.2. Estimation biochimique des paramètres de la fonction rénale.....	44
3.3.3. Estimation du stress oxydatif rénal et de la métallothionéine et les paramètres de l'inflammation.....	44
3.3.4. Études histopathologiques	46
3.4.Analyse statistique.....	46
4. Résultats.....	48
4.1.L'activité antioxydante.....	48
4.1.1. L'effet chélateur de DPPH.....	48
4.1.2. Effet chélateur du radical hydroxyle.....	49
4.2.L'activité antiinflammatoire.....	49
4.3.Les marqueurs de la fonction rénale.....	50
4.4.Stress oxydatif rénal et niveau de métallothionéine.....	51
4.5.Niveaux de MPO et de NO rénaux.....	54
4.6.Examen histopathologique.....	54
5. Discussion.....	56
6. Conclusion et perspectives.....	62
7. Références bibliographiques.....	63

INTRODUCTION

1. Introduction

Le cadmium (Cd) est un toxique environnemental grave et un polluant émanant de sources industrielles et agricoles (Satarug *et al.*, 2010), par exemple, la nourriture, l'eau, la fumée de cigarette et de certaines industries telles que la galvanoplastie, les plastiques, les couleurs de peinture et les batteries (Jarup *et al.*, 1998). L'exposition au Cd peut induire des lésions rénales tubulaires, l'ostéoporose (Jarup, 2002 ; Nordberg, 2004; Akesson *et al.*, 2006), un dysfonctionnement hépatique (El-Demeddash *et al.*, 2004;WHO, 2006) et différents types de cancer dans des organes tels que la vessie, le pancréas, le sein, les reins, les poumons et la prostate (Jarup, 2003; Satarug *et al.*, 2003; Waalkes, 2003; Satarug *et al.*, 2004; Nawrot *et al.*, 2006). Le Cd est principalement retenu dans le rein (demi-vie 10-30 ans) et le rein est un organe cible important après une exposition chronique au Cd (Jarup et Akesson, 2009).

Après exposition et absorption dans la circulation sanguine, le cadmium est d'abord lié à l'albumine dans le plasma sanguin, suivi de son absorption par les cellules sanguines (Scott et Bradwell, 1983). Le cadmium lié à l'albumine dans le plasma est ensuite transporté vers le foie, où le complexe subit une dégradation avec la libération de Cd, qui à son tour induit la synthèse de la métallothionéine (MT). La MT induite par le cadmium (Cd-MT) se lie ensuite à elle et transporte le métal vers les reins pour l'excrétion (Jin *et al.*, 1998). En raison de leur faible poids moléculaire, les complexes Cd-MT sont filtrés librement au niveau du glomérule et sont ensuite incorporés dans les cellules tubulaires proximales rénales (Murakami *et al.*, 1983).

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont rapporté que le stress oxydatif est un mécanisme important de toxicité du Cd (Chang *et al.*, 2013). Il pourrait prendre part aux lésions rénales tubulaires proximales précoces, qui peuvent induire un défaut de transport général dans le tubule proximal (Jacquillet *et al.*, 2006). Dans des conditions ordinaires, les systèmes de défense anti-oxydants cellulaires diminuent les perturbations provoquées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). En outre, les ROS sont physiologiquement avantageux en quantités contrôlées: ils jouent un rôle important dans la régulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires comme activateurs de la transduction du signal (Leonard *et al.*, 2004 ; Magder, 2006). Lorsque sa production augmente à un degré qui détruit les enzymes et les biomolécules antioxydantes, le stress oxydatif est induit (Mates, 2000) causant des dommages à l'ADN, aux protéines ou aux mitochondries qui va provoquer la peroxydation lipidique et même la mort cellulaire apoptotique (Mates, 2000 ; Valko *et al.*, 2004 ; Halliwell et Gutteridge, 2006 ; Magder,

2006). Le Cd, qui n'est pas un métal redox actif, peut indirectement être impliqué dans la production de radicaux libres. On pense que le Cd peut jouer le rôle de métaux actifs redox tels que le fer et le cuivre, qui participent à la génération de radicaux libres via la réaction de Fenton (Valko *et al.*, 2006). La production de ROS induite par le Cd peut également être due à une déplétion dans les capteurs de radicaux intracellulaires endogènes tels que le GSH, auquel elle se lie avec une forte affinité (Ercal *et al.*, 2001; Thevenod, 2003). En outre, une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution des taux de GSH ont été observées dans le foie et le rein (El-Maraghy *et al.*, 2001).

Récemment, un grand intérêt a été porté aux effets protecteurs des antioxydants naturels dans les systèmes biologiques contre les métaux lourds toxiques. Il a été rapporté que des composés chélatants tels que le versenate de calcium disodique, le dimercaprol et l'acide mésomercaptosuccinique (Protrowski *et al.*, 1974) ont été utilisés pour le traitement de la toxicité au cadmium. La co-administration d'antioxydants N-acétylcystéine ou vitamine E prévient la peroxydation lipidique induite par le Cd et protège les animaux de la toxicité hépatique et rénale du Cd (Shaikh *et al.*, 1999). Flavonoïdes contenus dans les fruits, légumes, noix, graines, feuilles, fleurs et écorces de plantes (Middleton *et al.*, 2000) étaient l'un des groupes antioxydants naturels les plus nombreux et les plus répandus.

Le genre *Thymelaea* qui appartient à la famille des thymelaeaceae comprend environ 30 espèces d'arbustes à feuilles persistantes. *T. microphylla* Coss. Et Dur. est une espèce médicinale endémique de l'Algérie et très commune dans les pâturages arides et désertiques (Galicia-Herbada, 2006). La décoction de feuilles est utilisée en médecine populaire pour traiter les abcès, les maladies de la peau et les douleurs abdominales ainsi que pour les propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires et antidiabétiques (Boukef, 1986; Benhammou *et al.*, 2009). Seules quelques données sur l'activité antioxydante des extraits de *T. microphylla*, (Boukef, 1986 ; Djeridane *et al.*, 2010 ; Ladjel *et al.*, 2011) ainsi que sur sa composition chimique, sont disponibles (Mekhelfi *et al.*, 2014 ; Kerbeb *et al.*, 2015).

La présente étude a été réalisée pour évaluer le potentiel antioxydant et néphroprotecteur de l'extrait n-butanolique de *T. microphylla* (EBTM) contre les dommages oxydatifs induits par le cadmium dans le tissu rénal.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

2. Synthèse bibliographique

2.1. Le cadmium

2.1.1. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques. Ils peuvent être sous forme ionique ou adsorbés sur les particules minérales ou organiques. Leur disponibilité change très fortement avec les paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et le pH. La spéciation d'un métal dans le milieu marin représente un problème fondamental car sa biodisponibilité et par conséquent sa toxicité dépend de sa forme chimique. Ainsi à une salinité de 35 ‰, la majeure partie du chlorure de cadmium se transforme en un complexe neutre $[CdCl_2]^0$ (Viarengo, 1989).

2.1.2. Les effets cellulaires des métaux lourds

a) Effet sur la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique représente la première barrière pour le passage des métaux au niveau de la cellule. Il a été démontré qu'en se liant aux protéines cytoplasmiques et aux phospholipides, les métaux engendrent une altération de leurs structures ainsi que de leurs fonctions (Evtushenko *et al.*, 1986). L'un des effets le plus important des cations métalliques tel que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg) et l'argent (Ag) est l'inhibition de l'activité des ATPases Na-K dépendantes (Bouquegneau et Gilles, 1979).

Les métaux lourds peuvent aussi altérer la structure de la membrane cellulaire en stimulant par exemple la peroxydation lipidique et en épuisant le contenu cellulaire en glutathion (GSH) nécessaire pour la protection contre le stress oxydatif (Dianzani et Ugazio, 1978).

b) Effet sur le noyau

Une fois dans la cellule, les métaux vont rapidement s'accumuler dans le noyau (Bryan et Hidalgo, 1976). A ce niveau, ils vont stimuler la synthèse d'ARNm codant pour les métallothionéines (MTs), inhiber l'activité de l'ARN polymérase I et II responsables de la synthèse de l'ARNr et l'ARNm respectivement, altérer la structure et le métabolisme de l'ADN et causer des anomalies au niveau des chromosomes (Viarengo *et al.* 1982).

c) Effet sur le système vacuolaire lysosomal

L'exposition au Cu ou au Cd engendre une déstabilisation au niveau des membranes des lysosomes, organites cellulaires assurant le catabolisme des macromolécules, suivi d'une augmentation du catabolisme protéique (Glaumann et Ballard, 1987). En effet, il a été démontré qu'une contamination des moules par le cuivre engendre une activation des enzymes lysosomales protéolytiques (mytilidases) au niveau de la glande digestive (Viarengo, 1989). Il semble donc qu'une exposition des invertébrés à de faibles concentrations de métaux lourds a pour conséquence le catabolisme des macromolécules telles que les protéines. Ce qui peut être confirmé par l'augmentation de l'activité du β -glucuronidase au niveau des cellules de la glande digestive des moules contaminées par le cuivre. Cependant une contamination par des concentrations importantes de métaux peut amener à une inhibition des protéases lysosomales et par conséquent une augmentation de la demi-vie des protéines peut être observée (Moore et Viarengo, 1989).

Les métaux lourds altèrent donc la physiologie de ces organites par deux voies en déstabilisant les membranes des lysosomes primaires et secondaires et en augmentant le taux d'activité des lysosomes et en bloquant l'activité des enzymes hydrolytiques et en inhibant le processus catabolique cellulaire, lorsque les concentrations en métaux sont élevées (Viarengo, 1989).

d) Effets sur les mitochondries

La capacité des mitochondries à accumuler les métaux lourds a été démontrée (George, 1972). Cette accumulation a pour conséquence la perturbation de la fonction mitochondriale en altérant les membranes mitochondriales par la voie de la peroxydation lipidique et en augmentant la perméabilité aux polypeptides ce qui entraîne une perturbation au niveau du gradient protonique responsable de la synthèse d'ATP (Viarengo, 1989). Les métaux peuvent agir également, sur l'activité des enzymes mitochondriales tel que l'inhibition d'isocitrate dehydrogenase nécessaire pour la synthèse de l'ATP (Viarengo, 1989).

e) Effet sur le réticulum endoplasmique

Il a été démontré que les métaux lourds altèrent la distribution des ribosomes entre le cytosol et le réticulum endoplasmique. Au niveau des cellules saines, très peu de ribosomes libres sont présents dans le cytosol, la plupart se présentent sous la forme de polyribosomes ou attachés au réticulum endoplasmique (Viarengo, 1989). Une exposition au cadmium provoque une augmentation du nombre des ribosomes libres et une diminution du nombre des polyribosomes ce qui amène à une diminution de la synthèse protéique.

Les métaux lourds affectent, également les activités enzymatiques du réticulum endoplasmique. Parmi ces enzymes on peut citer : la phosphatase alcaline, les oxygénases et la benzopyrène hydroxylase (Viarengo, 1989).

2.1.3. L'élément cadmium

Le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celle du zinc. Il fond à 320,9°C et bout à 767°C. Lors de l'ébullition du cadmium, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques. Sa densité est de 8650 kg/m³. Il est ductile (résistant à l'étirement), malléable et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux (Adriano, 1986).

Les propriétés chimiques du cadmium sont semblables à celles du zinc. Il s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre CdO. La masse molaire atomique du cadmium est de 112,4 g/mol (Adriano, 1986).

Le cadmium est principalement un sous-produit de l'industrie métallurgique du zinc, sous forme de sulfure de cadmium en association avec du sulfure de zinc, mais également du plomb, du cuivre ou des phosphates, aussi bien lors de l'extraction, que de la fonte ou du raffinage de ces minerais (ICA, 2008).

Environ 80 % du cadmium est utilisé sous forme de cadmium métallique, comme électrode négative, notamment des batteries d'accumulateurs rechargeables Ni-Cd ou de piles électriques alcalines. Environ 10 % du cadmium est utilisé comme pigments de couleur rouge foncée et jaune de peintures, de verres, d'émaux ou de matières plastiques. Ces pigments à base de cadmium sont extrêmement résistants à hautes températures. Le cadmium est également déposé par des procédés électrolytiques ou par trempage (cadmiage) sur des métaux afin de leur conférer un revêtement anticorrosion. Le cadmium peut être utilisé pour réduire les points de fusion de certains alliages, notamment dans des baguettes de soudure ou de brasure, dans la fabrication de roulements à billes, de câbles électriques, de cellules photoélectriques et de semi-conducteurs. Il est également présent comme stabilisateur dans certains polymères, comme le polychlorure de vinyle, afin de leur conférer une plus grande résistance à la chaleur et aux rayonnements ultraviolets. Il est présent à l'état d'impuretés dans certains engrais phosphatés, dans certains métaux ferreux ou non ferreux, lors de la combustion de matières organiques d'origine fossile (pétrole, gaz, charbon...) et dans les boues des usines de traitement des eaux usées et d'incinération.

2.1.4. La toxicocinétique du cadmium

Les deux principales sources d'exposition au cadmium de la population générale sont l'alimentation et le tabagisme. Le cadmium est présent de façon importante dans certains aliments, comme les fruits de mer, les abats, certaines céréales (riz, blé ...), les champignons et les légumes et, dans une moindre mesure, dans le poisson, les fruits et la viande (WHO, 2004 ; ATSDR, 2008 ; EURAR, 2008). Les apports moyens journaliers sont d'environ 10 à 35 g chez l'adulte non-fumeur (Satarug *et al.*, 2000; WHO, 2004 ; ATSDR, 2008 ; EURAR, 2008). Le tabagisme constitue un apport important de cadmium. Chaque cigarette contient environ 1g de Cd dont environ 10% est inhalé avec une absorption pulmonaire de 50% (Sinha *et al.*, 2008 ; Roy *et al.*, 2009 ; Verdugo *et al.*, 2016). L'apport de cadmium dans l'eau de boisson est en général inférieur à 0,1g/l (WHO, 2004). En milieu professionnel, les situations d'exposition sont constituées surtout par l'exposition à des vapeurs ou des fumées contenant du cadmium, notamment lors de travaux de soudure et de la fabrication de pigments, d'accumulateurs ou lors du découpage d'alliages au cadmium.

Les fumées et les vapeurs de cadmium sont principalement absorbés par voie respiratoire. De façon générale, le site de déposition et la sévérité de l'atteinte pulmonaire dépendent principalement des caractéristiques physicochimiques des particules de cadmium (spéciation, granulométrie, degré d'hydrosolubilité...), de sa concentration atmosphérique et de la dose inhalée (Schwartz, 1987 ; Do Pico, 1995 ; Schwartz et Blaski, 2000). Les particules fines de grande taille (diamètre aérodynamique > 5 nm) se déposent préférentiellement au niveau des voies aériennes supérieures et celles de plus petite taille (< 5 nm) dans le poumon profond, dans les bronchioles et les alvéoles. En revanche, les nanoparticules inhalées (< 100 nm) ont des mouvements de diffusion dus aux mouvements thermiques des molécules inhalées et exhalées au contact de celles-ci. Cette propriété affecte le comportement de déposition classiquement observé avec un aérosol de particules de taille micrométrique, conduisant ainsi à une déposition massique moins importante au niveau alvéolaire et plus importante au niveau du nasopharynx et de l'arbre trachéobronchique (Oberdorster *et al.*, 2005). L'absorption par voie respiratoire est variable (10 à 30 % pour les poussières d'oxyde de cadmium et 25 à 50 % pour les fumées d'oxyde de cadmium). L'absorption par voie digestive est faible (environ 5 %) et est facilitée par la carence martiale (Anderson *et al.*, 2004) et par des régimes carencés en fer, en calcium et en zinc (Olson *et al.*, 2002 ; Reeves et Chaney, 2002 ; Reeves et Chaney, 2004 ; ATSDR, 2008 ; EURAR, 2008) et diminuée par des régimes riches en fibres (Anderson *et al.*, 2004). Il est important de noter que le cadmium fixé à des protéines est mal absorbé. L'âge semble être

également un facteur important. En effet, un âge inférieur à 40 ans est significativement associé à une augmentation de l'absorption digestive de cadmium (Horiguchi *et al.*, 2004). L'absorption par voie cutanée est, quant à elle, négligeable (Wester *et al.*, 1992).

Après la phase d'absorption, le cadmium présent dans le compartiment sanguin est principalement (environ 95 %) intraérythrocytaire lié à l'hémoglobine (Carlson et Friberg, 1957 ; Nordberg *et al.*, 1971). Le cadmium plasmatique est lié à des protéines de haut poids moléculaire, essentiellement l'albumine (Nordberg et Nordberg, 1987). La demi-vie sanguine du cadmium est d'environ 100 jours (Jarup *et al.*, 1983). Le cadmium est rapidement distribué dans le foie où il induit la synthèse d'une protéine de transport de faible poids moléculaire, riche en groupement sulfhydryles (SH) : la métallothionéine (MT) pour laquelle il a une grande affinité. La synthèse protéique de MT est également stimulée par d'autres métaux comme le zinc, le mercure ou le bismuth (Rodilla *et al.*, 1998). La formation de complexes Cd-MT neutralise les effets toxiques du cadmium. Le complexe Cd-MT est ensuite redistribué dans tous les organes, notamment dans les reins (Nordberg et Nordberg, 1987). Le complexe Cd-MT est alors excrété après la filtration glomérulaire, contrairement au complexe Cd-albumine qui ne traverse pas la barrière glomérulaire du fait de son haut poids moléculaire. La quasi-totalité du complexe Cd-MT est ensuite réabsorbé par pinocytose dans les cellules tubulaires contournées proximales. Dans les cellules tubulaires, la MT est alors détruite par des enzymes lysosomales, libérant ainsi des ions Cd^{2+} dans le cytoplasme. Le Cd^{2+} cytoplasmique est alors à nouveau lié à une nouvelle MT synthétisée dans le cytoplasme. Lorsque les capacités de production de MT sont dépassées, le cadmium exerce alors des effets toxiques tubulaires rénaux, expliquant pourquoi la concentration rénale de cadmium est toujours plus importante dans le cortex rénal que dans la médullaire rénale. Le cadmium est une substance toxique cumulative. En effet, la demi-vie biologique du cadmium est particulièrement longue, puisqu'elle est d'environ 20 à 40 ans (Nordberg *et al.*, 1985).

Environ 50 à 80% du cadmium absorbé s'accumule dans le foie et les reins, où le taux d'accumulation dépend de la voie d'administration; une exposition non orale (inhalation, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intraveineuse) au cadmium entraîne initialement une accumulation hépatique, suivie d'une diminution et d'un déplacement vers les reins, tandis qu'une exposition orale au cadmium entraîne une accumulation dans les reins et le foie (Ohta et Cherian, 1991 ; Ohta *et al.*, 2000).

La métallothionéine joue un rôle considérable dans le transport du cadmium accumulé dans le foie vers les reins (Webb, 1979 ; Kägi, 1991). Le cadmium qui est importé dans les cellules, hépatocytaires, induit la synthèse de la métallothionéine, à laquelle plus de 80% du cadmium

se lie. Les complexes de cadmium-métallothionéine sont libérés dans la circulation sanguine, réabsorbés par les tubules proximaux et s'accumulent dans les cellules rénales (Nordberg *et al.*, 1975 ; Klaassen *et al.*, 1999).

Les ions du cadmium libérés lors de la dégradation du cadmium-métallothionéine par les lysosomes induisent la synthèse de la protéine métallothionéine, à laquelle ils se lient à nouveau, et s'accumulent dans les cellules rénales dans un état moins toxique (Nordberg *et al.*, 1975 ; Klaassen *et al.*, 1999).

L'organe cible de l'accumulation de cadmium dépend également de la durée d'exposition; la plus grande partie du cadmium s'accumule dans le foie après une exposition à court terme, mais dans les reins lors d'une exposition à long terme (WHO, 1992).

Par conséquent, la quantité de cadmium dans les reins humains augmente avec l'âge, car les reins sont la voie d'excrétion du cadmium (Yoshida *et al.*, 1998). L'exposition à long terme au cadmium endommage les reins et provoque un dysfonctionnement tubulaire rénal qui est caractérisé par une excrétion urinaire accrue de protéines de faible poids moléculaire telles que l' α 1-microglobuline (α 1-MG) et la β 2-MG (Kjellstrom *et al.*, 1977 ; Nogawa *et al.*, 1984).

Le Cd est principalement éliminé par l'urine. La quantité de Cd excrétée quotidiennement dans l'urine est très faible, représentant environ 0,005-0,01% de la charge corporelle totale (Bernard, 2008).

Une très faible partie du cadmium est excrétée par voie biliaire (après conjugaison avec du glutathion), salivaire, fécale et sudorale.

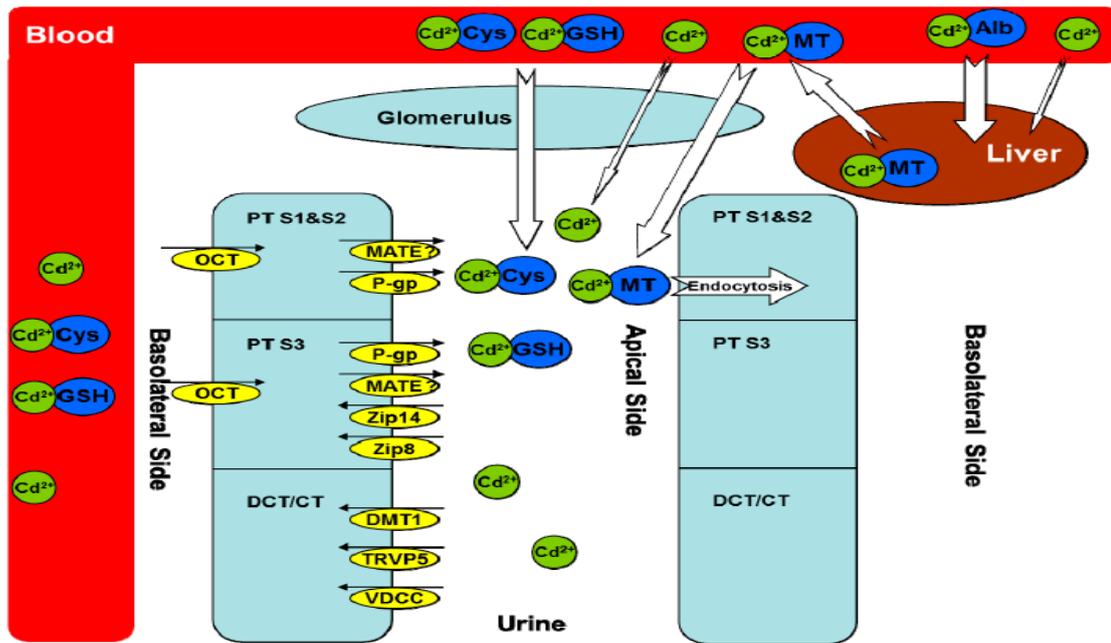


Figure 1. Les transporteurs du cadmium. (Yang and Shu, 2015)

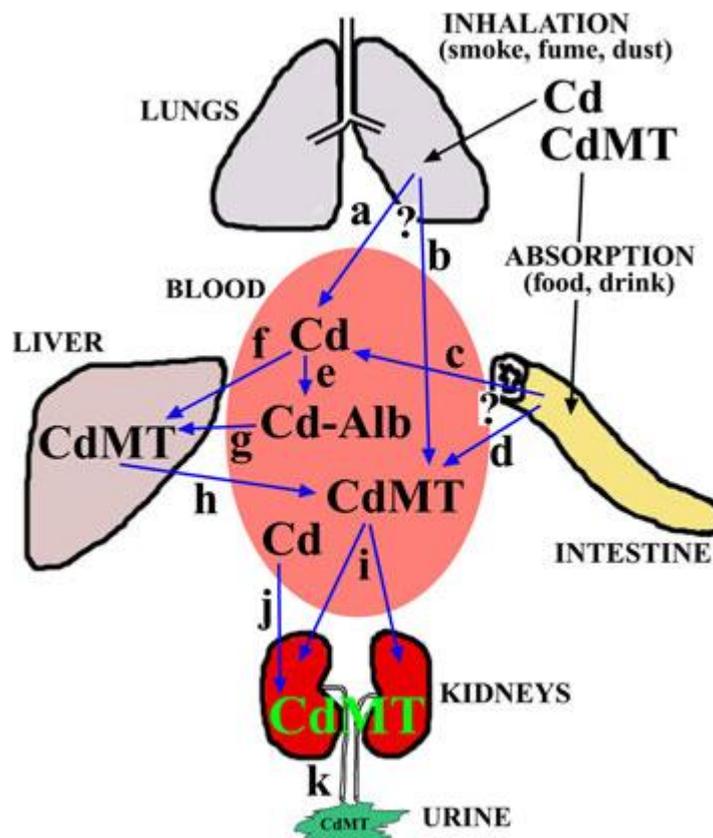


Figure 2 : Les voies du trafic Cd dans le corps des mammifères. (Sabolic *et al.*, 2010)

2.1.5. La toxicodynamique du cadmium et les organes cibles

a) Atteinte osseuse

L'intoxication chronique au cadmium est à l'origine d'une ostéomalacie et parfois d'une ostéoporose diffuse (ATSDR, 2008 ; EURAR, 2008). La toxicité osseuse du cadmium serait le fait, d'une part, de la fuite rénale phospho-calcique et, d'autre part, de la perturbation par le cadmium du métabolisme de la 1,25 OH-vitamine D3 aboutissant à une diminution de l'absorption digestive du calcium, de la calcitonine aboutissant à une diminution de résorption osseuse et de la PTH aboutissant à une augmentation de résorption osseuse.

Dans les années soixante, une maladie osseuse endémique dénommée, maladie « Itai-Itai » (« j'ai mal, j'ai mal ! » en japonais) a été rapportée chez des femmes ménopausées non exposées professionnellement au cadmium vivant près du fleuve Jinzu au Japon (Kjellstrom, 1992). Le riz et l'eau de boisson étaient contaminés par du cadmium provenant d'une mine de cadmium située en amont. L'apport quotidien en cadmium des riverains de la rivière Jinzu était dans les années soixante de 600 µg. Celui-ci a diminué tout au long des années soixante-dix atteignant moins de 100 µg, avec une décroissance estimée entre 0,3 à 0,6 µg/jour (Ikeda *et al.*, 2004). Leur cadmiurie moyenne était de 30 µg/g de créatinine. La maladie « Itai-Itai » associe une ostéomalacie douloureuse avec une déminéralisation osseuse prédominant au niveau du bassin et du col du fémur avec des fissurations osseuses, « stries de Looser-Milkman », et des fractures spontanées.

Une étude de cohorte belge chez 294 femmes âgées d'environ 49 ans en moyenne a montré récemment qu'en absence de dysfonction tubulaire rénale, la résorption osseuse est en fonction de l'exposition environnementale au cadmium, avec une augmentation de la calciurie et une modification de la sécrétion de certaines hormones calciotropes. Les auteurs suggèrent un effet ostéotoxique direct du cadmium (Schutte *et al.*, 2008).

b) Atteinte respiratoire

L'inhalation d'aérosols particulaires de cadmium peut être à l'origine d'une irritation importante des voies respiratoires. Il a été décrit dans la littérature des cas de rhinite chronique, d'hyposmie voire d'anosmie (Rose *et al.*, 1992). Des cas de bronchopneumopathie chronique obstructive et d'emphysème pulmonaire ont été également rapportés (Davison *et al.*, 1988). L'étude a estimé qu'une légère diminution du coefficient de transfert du CO pourrait être

observée chez un travailleur exposé pendant une vie professionnelle entière aux fumées d'oxyde de cadmium à une concentration atmosphérique supérieure à 50 µg/m³ (Davison *et al.*, 1988).

Le contenu en cadmium du tabac est élevé à cause des propriétés de la plante *Nicotiana* qui peut accumuler le Cd en se préservant de ses effets délétères. Environ 10% de l'oxyde de Cd inhalé se dépose dans les alvéoles pulmonaires ce qui conduit aux fibroses interstitielles, aux emphysèmes (Hart *et al.* 2001) et aux adénocarcinomes pulmonaires (Waalkes 2003). Les mécanismes provoquant ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais la capacité du Cd à produire un stress oxydant semble importante dans le processus de cancérogenèse. 30 à 40% du Cd passe dans la circulation sanguine par un mécanisme non élucidé à ce jour. Les fumeurs ont une concentration sanguine de Cd de 4 à 5 fois plus élevée que les non-fumeurs et il s'accumule 2 à 3 fois plus de Cd dans les reins (Satarug and Moore 2004).

c) Reprotoxicité

Des études expérimentales chez l'animal ont montré que le cadmium produit des atteintes testiculaires et diminue la fertilité chez les mâles. A fortes doses, le cadmium produit des effets foetotoxiques et tératogènes chez plusieurs espèces de rongeurs. De tels effets n'ont pas été observés chez l'Homme (ATSDR, 2008 ; EURAR, 2008). En effet, peu d'études sont disponibles chez l'homme. Selon les rapports, il n'y a pas d'études épidémiologiques montrant clairement une association entre l'exposition au cadmium et les effets sur la fertilité ou sur les organes sexuels. Cependant, une étude très récente non randomisée, chez 341 sujets masculins de couples non fertiles a montré une association entre l'augmentation de la concentration de cadmium dans le liquide séminal et l'infertilité masculine dans des groupes de sujets fumeurs ou non-fumeurs. Les auteurs suggèrent que le cadmium pourrait avoir un rôle dans la réduction de la qualité du sperme (Wu *et al.*, 2008).

d) Toxicité hépatique et rénale

Le cadmium est un des toxiques professionnels et environnementaux les plus dangereux. Chez des travailleurs exposés comme dans la région du comté de Kalmar en Suède, en Belgique ou dans le bassin du Jinzu au Japon, des effets néphrotoxiques élevés sont observés (Satarug and Moore 2004). 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 Cd inhibe 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 (Barbier *et al.*, 2004).

Le Cd absorbé via la voie gastro-intestinale ou pulmonaire peut aboutir au foie grâce à la circulation sanguine et complexé à diverses protéines comme l'albumine. Dans le foie, le Cd peut se conjuguer au glutathion (GSH) ou aux métallothionéines (MTs). Les complexes Cd-GSH et Cd-MTs formés arrivent ensuite au niveau des tubules proximaux où ils sont excrétés et réabsorbés par endocytose (Barbier *et al.*, 2005). Les complexes réabsorbés sont dégradés par les lysosomes libérant du cadmium susceptible d'interagir avec d'autres composants cellulaires et de les endommager si le métal n'est pas repris en charge.

2.2. La néphrotoxicité du cadmium

2.2.1. Les effets tubulaires du cadmium

A l'état normal, les cellules épithéliales tubulaires sont attachées les unes aux autres et à la membrane basale / matrice extracellulaire à travers des complexes de jonctions spécialisés. Avec le temps, le tubule proximal commence à accumuler du cadmium qui finit par affecter la fonction des cellules épithéliales. Ces effets précoces semblent impliquer un léger stress oxydatif, une perturbation des cascades de signalisation cellulaire et des altérations de l'adhésion cellulaire. Ces effets, à leur tour, déclenchent des réponses autophagiques dans les cellules. Si le niveau de blessure est faible, la réponse autophagique peut être suffisante pour réparer les dommages. Cependant, si la lésion est plus sévère, une apoptose et / ou une mort cellulaire autophagique peuvent survenir. Ceci déclenche à son tour la transformation épithéliale en mésenchyme des cellules survivantes et une réponse de réparation proliférative. Si la lésion des cellules est répandue et grave, les processus de réparation sont inadéquats, ce qui entraîne une nécrose des cellules du tubule proximal. (Molitoris et Marrs, 1999)

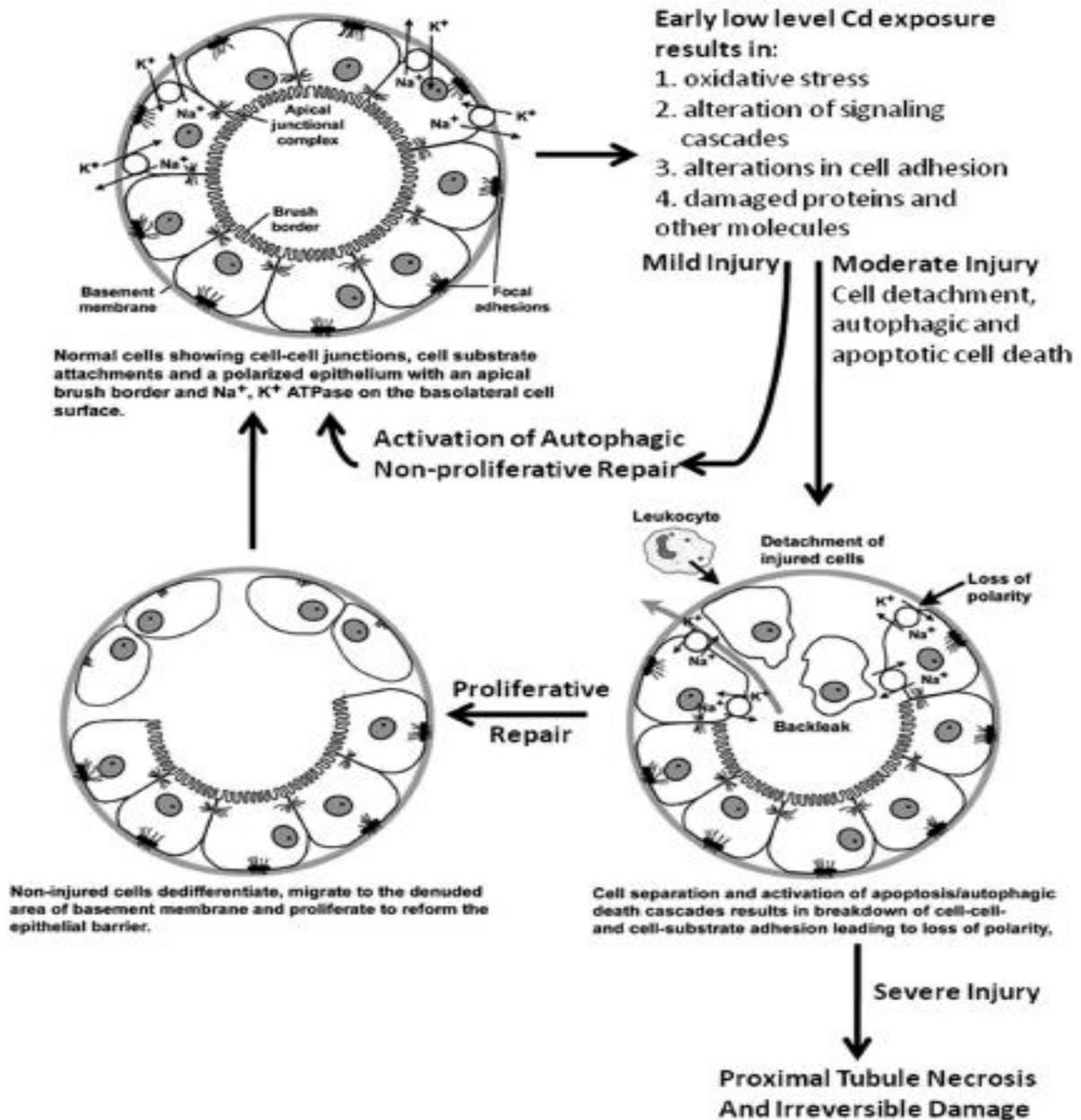


Figure 3 Les effets toxiques du cadmium dans le tubule proximal (Prozialeck et Edwards, 2012)

2.2.2. Les effets glomérulaires du cadmium

Alors que le tubule proximal est la principale cible des lésions rénales induites par le cadmium, il existe des preuves que le cadmium, en particulier à des niveaux d'exposition plus élevés, peut également affecter les glomérules (Xiao *et al.*, 2009). Les modifications des marqueurs classiques du dysfonctionnement glomérulaire, comme le sérum ou la créatinine urinaire, ne sont généralement pas observées au début ou à la fin des lésions rénales induites par le cadmium (Prozialeck et Edwards, 2007 ; Prozialeck *et al.*, 2009a). Cependant, plusieurs

chercheurs ont rapporté des associations entre l'exposition au cadmium et les altérations (augmentation ou diminution) de la clairance de la créatinine (Mueller *et al.*, 1998 ; Bernard, 2004 ; Navas-Acien *et al.*, 2009). Certaines études ont également montré une augmentation de l'excrétion urinaire d'albumine au cours des premiers stades de la toxicité du cadmium (Mueller, 1993 ; Mueller *et al.*, 1998 ; Haswell-Elkins *et al.*, 2008), classiquement interprété comme un marqueur de lésion glomérulaire. Navas- Acien *et al.*, (2009) ont rapporté des altérations significatives de la filtration glomérulaire et de l'albuminurie chez des sujets exposés au cadmium et au plomb. À l'heure actuelle, les contributions relatives et la relation de la lésion glomérulaire et de la lésion tubulaire proximale à ces augmentations signalées dans l'excrétion urinaire d'albumine restent peu claires.

2.2.3. Biomarqueurs de la toxicité rénale du cadmium

Une partie majeure du cadmium dans le corps est liée à des métallothionéines, (Hamer, 1986). Le complexe cadmium-métallothionéine est distribué dans divers tissus (Ohta et Cherian, 1991). Chez l'homme, les plus grandes quantités de cadmium sont déposées dans les reins et le foie (Jarup *et al.*, 1998). Le cadmium urinaire en tant que biomarqueur de l'exposition au cadmium a été utilisé dans plusieurs grandes études épidémiologiques dans le monde (Jarup, 2002), notamment la troisième enquête nationale sur la santé et l'examen III (NHANES III) (Paschal *et al.*, 2000). Contrairement au taux de cadmium dans l'urine, les concentrations de cadmium dans le sang reflètent à la fois l'exposition récente et à long terme au Cd (Jarup *et al.*, 1998). Par exemple, une augmentation rapide du cadmium sanguin a été observée chez les travailleurs plusieurs semaines après le contact avec le métal (Kjellstrom et Nordberg, 1978 ; Lauwerys *et al.*, 1979). Après la cessation de l'exposition, les concentrations sanguines de cadmium ont été diminuées pendant plusieurs mois (Jarup *et al.*, 1983), mais elles n'ont pas été baissées au niveau avant l'exposition (Jarup *et al.*, 1997).

L'excrétion urinaire accrue de protéines de faible poids moléculaire, comme la β 2-microglobuline, la N-acétylglucosaminase (NAG), la protéine liant le rétinol et la α 1-microglobuline, est reconnue comme marqueur des lésions tubulaires précoces (Jarup, 2002). Trois grandes études transversales, CadmiBel, NHANESIII, Osteoporosis et Cadmium as Risk (OSCAR) ont montré une augmentation dose-dépendante de la dysfonction des tubules rénaux à des taux plus élevés de cadmium dans l'urine et le sang (Buchet *et al.*, 1990 ; Paschal *et al.*, 2000 ; Jarup, 2002).

2.2.4. Mécanismes de la néphrotoxicité du cadmium

Le rein semble être l'organe le plus touché par les méfaits du cadmium (Barbier *et al.*, 2005). Le cadmium atteint le rein sous la forme de complexe cadmium-métallothionéines. Ce complexe est filtré dans le glomérule et est réabsorbé plus tard par le tubule proximal. La quantité de cadmium dans les cellules tubulaires augmente, en provoquant des perturbations des métabolismes phosphorés et calciques, des dommages tubulaires et glomérulaires, une protéinurie et une haute excrétion de calcium induisant un grand risque d'avoir des calculs rénaux (Svartengren *et al.*, 1986)

a) Rôle de la nécrose, l'apoptose et l'autophagie

Indépendamment des mécanismes d'absorption impliqués, il est clair qu'avec le temps, le cadmium peut s'accumuler dans les cellules épithéliales du tube proximal. De point de vue traditionnel, lorsque les concentrations tissulaires de cadmium dépassent une concentration critique d'environ 150 µg / g de tissu, les défenses intracellulaires telles que la métallothionéine et le glutathion sont débordées et les cellules subissent des altérations et commencent à mourir (Gobe et Crane, 2010; Prozialeck et Edwards, 2010). Une question très fondamentale qui n'a été abordée que depuis 10 à 15 ans concernant les rôles relatifs des mécanismes apoptotiques, nécrotiques et autophagiques dans la mort cellulaire des tubes proximaux induite par le cadmium. Ceci est un problème important car même si les trois voies peuvent entraîner la mort cellulaire, chacune des voies implique sa propre séquence unique d'événements physiopathologiques (Galluzzi *et al.*, 2007).

L'apoptose (ou mort cellulaire de type I) est caractérisée par une dépolarisation mitochondriale, une activation de la caspase, une fragmentation de l'ADN et un rétrécissement cellulaire, suivies d'une fragmentation de la cellule en petits corps apoptotiques revêtus de membrane.

La nécrose (mort cellulaire de type III) est caractérisée par le gonflement des mitochondries et d'autres organites, la dégradation de la membrane cellulaire et la fuite du contenu cytosolique dans le milieu externe.

L'autophagie est la moins connue de ces voies dites de «mort cellulaire». L'autophagie est un processus programmé qui implique la phagocytose interne des protéines endommagées et des éléments cytosoliques dans des vésicules à double membrane appelées autophagosomes, qui sont à leur tour dégradées par les lysosomes. Alors que de faibles niveaux d'autophagie peuvent

en fait représenter un mécanisme de réparation / survie pour préserver la fonction cellulaire, des niveaux persistants ou élevés d'autophagie peuvent déclencher la mort cellulaire.

Les voies biochimiques menant à la mort cellulaire autophagique peuvent se chevaucher, dans une certaine mesure, avec celles menant à la mort par apoptose. Il a été reconnu depuis longtemps que des doses élevées de cadmium néphrotoxiques peuvent provoquer une nécrose des tubules proximaux. Cependant, il a également été apparent que les manifestations précoces de la dysfonction tubulaire proximale induite par le cadmium se produisent bien avant le début de la nécrose.

Dans les années 1990, plusieurs chercheurs (Hamada *et al.*, 1991 ; Tanimoto *et al.*, 1993 ; Yan *et al.*, 1997 ; Tanimoto *et al.*, 1999) ont publié des résultats montrant que les premiers stades de la néphrotoxicité du cadmium étaient associés à une augmentation du nombre des cellules apoptotiques dans le tubule proximal. Dans chacune de ces études, il n'y avait pas de signe significatif de lésion nécrotique au moment de l'observation de l'apoptose. Les études de Tanimoto *et al.* (1993) étaient particulièrement remarquables parce que les auteurs ont également identifié des cellules tubulaires proximales qui semblaient proliférer dans le cadre de la réponse à la lésion apoptotique. Dans une étude récente utilisant un modèle intrapéritonéal aigu (seulement 5 jours) d'exposition au cadmium chez le rat, Chargui *et al.*, (2011) ont identifié l'activation d'une variété de processus autophagiques dans le tubule proximal survenue à un moment où il n'y avait aucune preuve d'apoptose ou de dysfonctionnement général des tubules proximaux. Ces études suggèrent également que le cadmium produit des effets toxiques précoces au sein des cellules qui conduisent à l'activation d'un processus de réparation, en l'occurrence l'autophagie. Plusieurs aspects de ces études méritent une attention particulière. Tout d'abord, dans toutes les études dans lesquelles des cellules apoptotiques ont été identifiées, le début de la mort cellulaire apoptotique a semblé coïncider avec le début du dysfonctionnement tubulaire proximal, comme en témoigne la polyurie et / ou la protéinurie. Cependant, il est également remarquable que, dans chacune de ces études, le nombre de cellules tubulaires proximales qui subissaient réellement l'apoptose était assez faible (c'est-à-dire bien inférieur à 5%).

La grande majorité des cellules tubulaires proximales étaient largement non affectées par le cadmium et / ou semblaient se différencier et proliférer dans le cadre du processus de réparation. Le fait que seul un faible pourcentage de cellules rénales soit affecté par le cadmium pourrait grandement compliquer les efforts pour identifier les mécanismes biochimiques à l'origine des effets, car il peut être techniquement difficile d'identifier des changements

biochimiques possibles induits par le cadmium dans quelques cellules sont situés dans une mer de cellules qui ne sont pas affectées par le cadmium. Cependant, il est également apparent que le cadmium cause une sorte de blessure qui déclenche ce faible niveau d'apoptose. Dans ce contexte, les études de Prozialeck *et al.* (2009a) et Chargui *et al.* (2011) sont particulièrement significatifs en ce qu'ils montrent clairement que le cadmium produit des effets détectables, tels que la régulation positive de Kim-1 et l'induction de l'autophagie dans les cellules tubulaires proximales avant qu'il n'y ait des signes d'apoptose ou de dysfonctionnement tubulaire proximal.

La question clé qui reste à résoudre: Comment le cadmium cause-t-il la lésion initiale des cellules tubulaires proximales? Les études menées au cours des 10 dernières années ont donné lieu à quelques réflexions. En général, ces études ont impliqué trois mécanismes de réponse précoce possibles dans le tubule proximal. Il s'agit de la rupture de l'adhérence cellulaire médiée par la cadhérine, de la modulation des cascades de signalisation intracellulaires et de l'induction de la comburante oxydative.

b) Cadmium et signaux intracellulaires de calcium

Le cadmium peut altérer l'homéostasie du calcium qui est un système universel et un messager intracellulaire versatile (Berridge *et al.*, 2000). Une intoxication au cadmium peut augmenter les taux de calcium via la protéine G couplée aux facteurs de liaisons de métaux (Faurkov and Bjerregaard, 2002). L'activation de la phospholipase C et la production de l'IP3 (Phosphoinositide-binding protein) par hydrolyse de la phosphatidylinositol s'ensuivent (Faurkov and Bjerregaard, 2002 ; Misra *et al.*, 2002). Cette cascade de signalisation induite par le Cd, déclenche la libération du calcium de ses compartiments de stockage. Par conséquent, en dépit de son action inhibitrice sur de nombreux types de canaux calciques et les pompes (Kiss and Osipenko, 1994), le cadmium peut induire une augmentation des concentrations cellulaires de calcium et ce dernier peut engendrer l'apoptose. Un autre mécanisme par lequel le cadmium interfère avec l'homéostasie calcique est lié à sa capacité à moduler les récepteurs extracellulaires de calcium (Chang and Shoback, 2004). Ainsi, le Cd peut profondément affecter les fonctions des cellules exprimant ce système de détection de calcium extracellulaire. Le cadmium peut également réguler les signaux calciques en exerçant des effets opposés sur le contrôle interne de calcium, par la promotion de l'efflux de calcium du réticulum endoplasmique (Palade *et al.*, 1989) ou en inhibant la réticulum sarcoplasmique calcium-ATPase (Beyersmann and Hechtenberg, 1997).

c) Cadmium et inhibition de la réparation de l'ADN et le cancer

La carcinogénicité du Cd peut être expliquée par sa capacité à induire les ERO et les dommages de l'ADN. Par ailleurs le Cd peut agir par son interférence avec les facteurs de réparation de l'ADN (Filipic and Hei, 2004 ; Filipic *et al.*, 2006). Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sont de la famille des protéines à doigts de zinc et l'effet inhibiteur du Cd est lié au remplacement du zinc (Hartwig, 2001). Buchko *et al.*, (2000) ont utilisé une méthode spectrochimique pour étudier l'effet du Cd sur la structure de la protéine XPA impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN pendant la réparation par excision de nucléotides. Les recherches ont démontré que le Cd pouvait se lier aux groupements thiols des cystéines de XPA. Le complexe s'établit entre le Cd et les quatre cystéines de la région doigt de zinc de XPA. Par conséquent XPA ne peut plus se fixer à l'ADN (Asmuss *et al.*, 2000 ; Buchko *et al.*, 2000 ; Waisberg *et al.*, 2003 ; Kopera *et al.*, 2004).

L'exposition au Cd inhibe et modifie certaines protéines de la réparation par excision de base telle que la 8-oxoguanine DNA glycosylase de type I de l'homme (hOGG1). Cette enzyme permet la réparation de la 8-OHdG. Plusieurs études ont démontré que le Cd réprime les gènes hOGG1 (Potts *et al.*, 2003 ; Bertin and Averbeck, 2006). Le Cd peut également inhiber la synthèse de l'ADN (Cao *et al.*, 2007). Toutes ces actions d'inhibition sont une contribution indirecte du Cd aux effets mutagènes et/ou à la carcinogénicité (Giaginis *et al.*, 2006).

La lutte contre le cancer est l'axe de recherche biomédical le plus important des dernières années. Il existe plusieurs types de mécanismes impliqués dans la cancérogenèse Cd-induite. L'exposition au Cd a été associée aux cancers de poumons, de la prostate, du pancréas, du foie et des reins (Verougstraete *et al.*, 2002 ; Waisberg *et al.*, 2003 ; Nawrot *et al.*, 2006). Il a été classé comme cancérigène de type I par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC). Les mécanismes de cancérisation sont principalement indirects. Plusieurs études ont montré que le Cd ne peut se lier à l'ADN que dans des expériences *in vitro*. *In vivo*, le Cd a une affinité beaucoup plus grande pour d'autres molécules comme les métallothionéines (Goering *et al.*, 1993; Klaassen *et al.*, 1999; Waalkes, 2003). Les ERO générés par le Cd interviennent non seulement dans toutes les phases du développement d'un cancer mais aussi dans l'induction de certains proto-oncogènes. D'autre part, l'exposition aux ERO favorise les dommages des bases de l'ADN dont la guanine oxydée en 8-OHdG (Blumberg and Block, 1994 ; Bjelakovic *et al.*, 2004a, b).

L'anion superoxyde et le système xanthine/xanthine oxydase qui le produit sont des promoteurs de la transformation néoplasique des cellules initiées. De nombreux polluants,

incriminés dans la cancérogenèse, génèrent des ERO (Pryor, 1992) ; y compris le Cd (Filipic *et al.*, 2006) (figure 4).

Le Cd peut non seulement induire le stress oxydant mais aussi la production indirecte des lésions en interférant avec les systèmes de réparation de l'ADN pour amplifier le niveau des mutations dues à des agents génotoxiques. Le Cd peut également favoriser la croissance de tumeurs par l'inhibition de la méthylation de l'ADN (Dainiak and Tan, 1995).

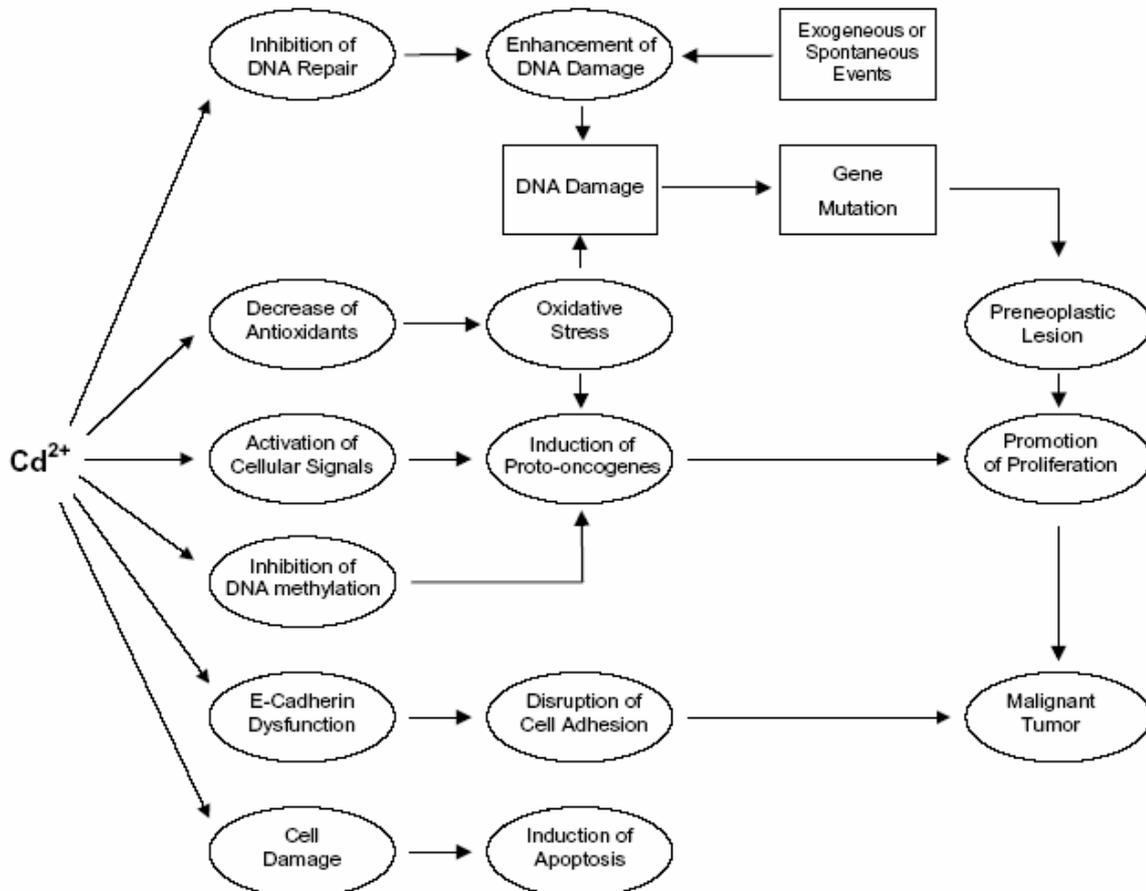


Figure 4 Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium (Waisberg *et al.*, 2003).

d) Induction de stress oxydatif

La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique) fait partie du métabolisme normal de la cellule. La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie et les lysosomes génèrent ces espèces de manière constitutive (Nohl *et al.*, 2003). Par contre, lors d'une contamination par le cadmium, il se crée un déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants (Stohs et Bagchi, 1995; Ikediobi *et al.*, 2004). Le cadmium n'étant pas un métal de Fenton, il induit de

façon indirecte la production de ROS et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants. En effet le cadmium peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (glutathion) ou de l'activité d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase) (Leonard *et al.*, 2004). Un autre mécanisme possible est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à la suite de leur déplacement par le cadmium de métalloprotéines. A l'inverse du cadmium, ces deux métaux peuvent causer un stress oxydant direct par la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996). La complexité des effets du cadmium s'illustre ici par le fait que la génération de ROS peut d'une part avoir des effets néfastes directs sur le bon fonctionnement de la cellule et d'autre part être considérée comme un mécanisme de riposte où les ROS sont des messagers secondaires. En effet, l'augmentation de la quantité de ROS lors d'une contamination par du cadmium peut influencer l'expression de nombreux gènes dont ceux de facteurs de transcription (Haddad, 2002). Comme conséquence néfaste du cadmium et du stress oxydant sur la cellule, on peut évoquer ici les atteintes à l'ADN. En effet, la génotoxicité observée en présence de cadmium est étroitement liée au stress oxydant. Le cadmium, faiblement mutagène (Waalkes et Misra, 1996), peut inhiber la réparation de lésions de l'ADN formées spontanément ou suite à des réactions oxydatives en interférant avec des enzymes antioxydantes par exemple en se substituant au zinc de certaines protéines à doigt de zinc impliquées dans la réparation de l'ADN (Hartwig, 2001 ; Hartwig et Schwerdtle, 2002). Suivant la localisation et le nombre des lésions de l'ADN le cadmium peut induire la formation de cellules tumorales, l'apparition d'un cancer, et même la mort cellulaire programmée appelée apoptose (Waisberg *et al.*, 2003).

Les effets toxiques du Cd 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 Cd semblent inhiber les enzymes de stress comme la SOD (Stohs and Bagchi, 1995), la CAT et la GPx (Szuster- Ciesielska *et al.*, 2000). Par contre des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes (Potts *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003) 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. L'autre possibilité expliquant l'augmentation des ERO en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des SODs (Filipic *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc (Predki and Sarkar, 1994 ; Aramini *et al.*, 1995) peuvent se traduire par une démétallation des protéines, une

altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs), une interférence dans la signalisation dépendante du calcium. L'impact du Cd sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyles, superoxyde, ou le peroxyde d'hydrogène (O'Brien and Salacinski, 1998; Galan *et al.*, 2001; Stohs *et al.*, 2001; Waisberg *et al.*, 2003 ; Fotakis *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006) (figures 5 et 6). Les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) (Figueiredo-Pereira *et al.*, 1998; Youngs *et al.*, 2000 ; Ercal *et al.*, 2001; Hengstler *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2006 ; Lopez *et al.*, 2006 ; Hansen *et al.*, 2007). Gichner *et al.*, (2004) ont démontré qu'avec des faibles concentrations de Cd, les lésions induites sur l'ADN sont liées préférentiellement aux mécanismes indirects. Certains auteurs ont démontré que le Cd peut interférer avec la chaîne respiratoire de la mitochondrie et induire la formation des ERO. En effet, il s'intercale entre la semi-ubiquinone et le cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire. La semi-ubiquinone devient instable et transfère un électron à la molécule d'oxygène pour former l'anion superoxyde (Wang *et al.*, 2004).

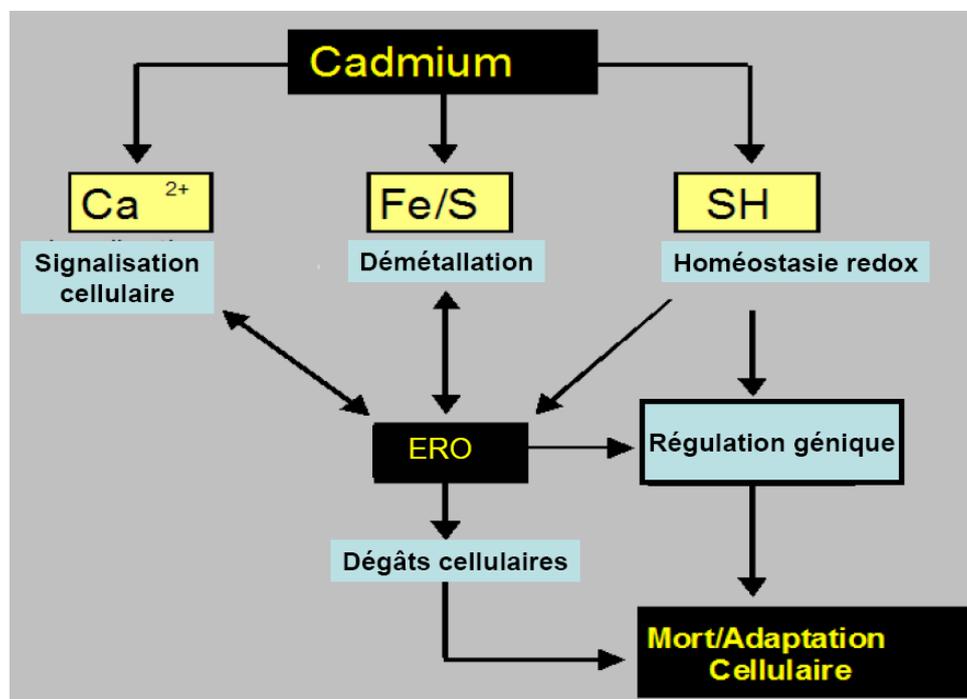


Figure 5. L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO.

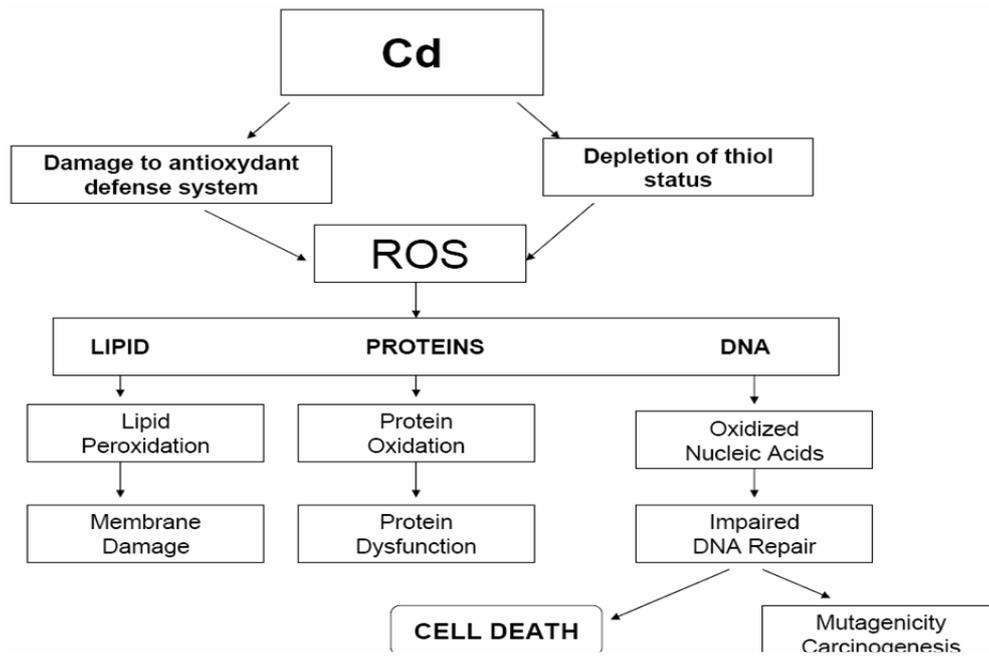


Figure 6. Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd (Bonfont-Rousselot, 1994; Ercal *et al.*, 2001)

2.3. Rôle antioxydant de la métallothionéine (MT)

De nombreuses protéines possèdent dans leur structure propre ou fixent sur certains de leurs sites actifs des ions métalliques et sont donc rassemblées, par commodité de langage, sous le terme de métalloprotéines. A l'intérieur de ce groupe de protéines, une distinction est faite entre celles qui possèdent une activité enzymatique (les métalloenzymes) et celles qui n'en possèdent pas. A ces dernières appartiennent les métallothionéines (MTs), qui sont des dérivés métalliques d'une protéine riche en soufre, la thionéine. Il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à des doses sublétales de certains métaux tels que le cadmium, le zinc et le cuivre, il y avait induction de la synthèse de thionéine qui par liaison avec un métal forme la métallothionéine. Les liaisons soufre/métal chez ces protéines sont formées préférentiellement par la coordination tétraédrique d'un ion métallique par les groupements thiols de cystéines régulièrement espacées le long de la structure primaire de la protéine. Les ions métalliques présents dans la structure de ces protéines représentent plus de 20% de la masse molaire totale. De plus les métallothionéines sont restées les seules protéines capables de fixer le cadmium à l'état natif. La relation étroite qui lie les métaux lourds, et en particulier le Cd, aux MTs a conduit à envisager leur utilisation en tant que biomarqueur d'exposition à ces métaux chez plusieurs espèces (Amiard, 1997; Hamza-Chaffai *et al.*, 1997; Viarengo *et al.*, 1999) incluant l'humain (Ganguly *et al.*, 1996; Lu *et al.* 2001) et les mammifères marins (Das *et al.*, 2000 ; Bourdineaud *et al.*, 2006).

2.3.1. Nomenclature et structure des MTs

Les MTs ne contenant qu'un seul métal possèdent des termes spécifiques tels que cadmium-métallothionéines ou zinc-métallothionéines. L'utilisation d'un indice permet de spécifier le contenu molaire en métal : Zn₇-métallothionéine ou Cd₇-métallothionéine. Les MTs peuvent comporter plusieurs métaux et dans ce cas on peut les nommer Cd,Zn-métallothionéine ou Cd,Zn-thionéine et même utiliser un indice pour exprimer la proportion de chaque métal : Cd_{5,3},Zn_{1,7}-métallothionéine ou Cd_{5,3},Zn_{1,7}-thionéine lorsque la protéine contient 5 ou 3 moles de cadmium et 1 ou 7 moles de zinc par mole de métallothionéine. Quand le contenu exact en métal n'est pas connu, on se limite au terme métallothionéine.

Chez les vertébrés, les tissus contiennent deux isoformes désignées par MT-I et MT-II, en raison de leur différence de temps d'éluion par chromatographie d'échange d'ions. Entre ces deux isoformes, seul un acide aminé est différent.

La MT-III est présente dans le cerveau ainsi que dans certains organes du système reproducteur mâle tels que les testicules et l'épididyme (Masters *et al.*, 1994; Moffatt and Seguin

1998 ; Dufresne and Cyr 1999;) et diffère de la MT-I par deux insertions, une thréonine après le quatrième acide aminé, et six acides aminés à l'extrémité carboxyterminale (Palmiter *et al.*, 1992). Cette MT-III, nommée GIF (neuronal growth inhibitory factor), est particulière. La GIF est une protéine non inductible (Palmiter *et al.*, 1992), dont les fonctions physiologiques sont différentes des autres MTs. En effet, des expériences *in vivo* sur des souris surexprimant la GIF ont montré que ces animaux transgéniques mourraient en raison d'une atrophie pancréatique (Quaife *et al.*, 1994).

La MT-IV comporte un glutamate après la position quatre et n'est exprimée que dans les épithéliums squameux différenciés (Quaife *et al.*, 1994).

Les MTs, chez les mammifères, sont formées d'une seule chaîne polypeptidique de 61 acides aminés comportant à l'extrémité aminoterminal un résidu N-acétylméthionine et un résidu alanine à l'extrémité carboxyterminale. Les cystéines sont disposées en motifs polypeptidiques hautement conservés au cours de l'évolution, soit Cys-Cys soit Cys-X-Cys.

Ces motifs sont régulièrement distribués au long de la séquence polypeptidique de la protéine.

Des études d'échange d'ions entre Zn₇-MT et une Cd₇-MT ont distingué une redistribution de ces métaux entre les deux types de MT pour former 2 MTs mixtes, cela étant dû à la fixation préférentielle du cadmium sur le domaine α et du zinc sur le domaine β . Cette réaction d'échange d'ions démontre que la liaison des métaux aux MTs est réversible et rapide.

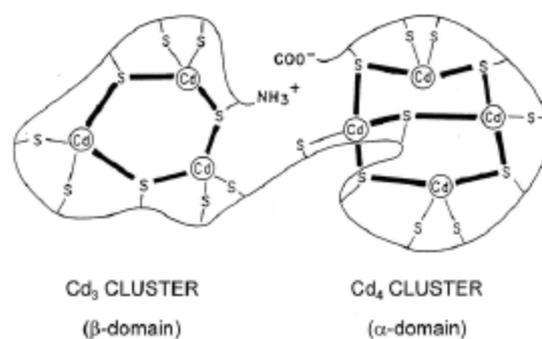


Figure 7. Représentation schématique de la structure d'une métallothionéine dans le cas du piégeage du cadmium (Klaassen *et al.*, 1999)

2.3.2. Caractéristiques des métallothionéines

Les organismes sont capables de s'acclimater à certains contaminants en deçà d'un seuil de concentration sur une période de temps. Selon le type de contaminant, l'animal devient soit plus tolérant soit plus vulnérable dépendant du mode d'action du toxique et des mécanismes de détoxification propres à l'animal (Sprague, 1985). Les poissons présentent un certain degré de

tolérance suite à une exposition aux métaux lourds. Les mécanismes de tolérance aux métaux lourds se classent en deux catégories :

- 1- l'exclusion cellulaire.
- 2- les modifications intracellulaires.

L'exclusion cellulaire caractérise d'avantage les algues et les plantes aquatiques. L'induction des modifications intracellulaires semble mieux représenter les poissons et se rattache aux trois mécanismes de détoxification suivant :

- a. l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse du métal en produit plus soluble et plus acide.
- b. l'incorporation du métal dans des macromolécules à forte affinité métallique telle la métallothionéine.
- c. la séquestration du toxique dans des tissus ou des organelles qui en rendent l'accès difficile aux tissus plus vulnérables (Leland et Kuwabara, 1985).

Nous retenons ici le mécanisme d'incorporation du métal dans des macromolécules à fortes affinité pour les métaux, par exemple la métallothionéine, car elle présente des caractéristiques physiologiques et biochimiques spécifiques dans la défense de l'organisme contre les toxiques inorganiques. L'acquisition de la tolérance aux métaux lourds peut résulter en une augmentation de la synthèse de la métallothionéine, plus particulièrement lorsqu'il y a exposition aux métaux divalents comme le cadmium, le mercure, le cuivre et le zinc.

Les caractéristiques physico-chimiques de la métallothionéine sont:

- il s'agit d'une protéine de faible poids moléculaire : 6 500 à 11 000 daltons dépendant des systèmes et des types d'analyse (Hunziker et Kagi, 1984).
- Cette protéine contient environ 50% de résidus cystéiniques et possède une grande affinité à une grande quantité de métaux divalents (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb).
- Elle ne contient aucun acide aminé aromatique ni de lien disulphide.
- Cette protéine est aussi capable de lier 7 cations métalliques; ces cations sont liés aux groupes thiols ou sulphydriles en proportion de 3 thiolates pour 1 ion de métal. Il s'agit ici d'une moyenne globale.
- De plus, elle présente une structure tétraédrique (Weser et Rupp, 1979)
- Elle est thermostable.

- On signale sa présence comme protéine intracellulaire et son absence dans le liquide extracellulaire.
- Sa localisation se situe dans le cytoplasme et dans le noyau (Cherian et Goyer, 1978; Engel et Roesijadi, 1987).
- Comme caractéristique spectrale, elle possède un pic d'absorption maximale autour de 250 nm (Aylett, 1979).

Cette protéine se retrouve généralement emmagasinée comme constituant soluble dans le cytoplasme des cellules hépatiques et rénales; et en proportion plus faible dans d'autres tissus tel le muscle (Leland et Kuwabara, 1985).

2.3.3. L'induction des métallothionéines

Les gènes codant pour les MTs pouvant être induits par la présence de métaux (Roesijadi, 1994 ; Mason et Jenkins, 1995 ; Pelletier *et al.*, 2004), la synthèse et la concentration de ces protéines est censée augmenter lors d'une contamination métallique. Ainsi, la détection et le dosage des MTs sont souvent considérés comme des biomarqueurs d'exposition métallique (Cosson et Amiard, 2000; Geffard *et al.*, 2002 a, b ; Pinel-Alloul *et al.*, 2004 ; Berthet *et al.*, 2005; Geffard *et al.*, 2005 ; Amiard *et al.*, 2006) et font l'objet d'une attention particulière dans les programmes de surveillance (Mathiessen, 2000). Malheureusement, une telle utilisation des MTs reste sujette à controverse. En effet, même si le niveau d'expression des MTs est généralement dose dépendant et augmente avec une hausse de la concentration métallique, à partir d'un certain seuil de concentration métallique, cette corrélation ne serait plus aussi claire (Cheung *et al.*, 2004). De plus, quelques données de la littérature révèlent que certaines espèces exposées à de fortes pollutions métalliques n'ont pas réagi par un taux accru de MTs dans certains de leurs organes (Pedersen et Lundebye, 1996 ; Berthet *et al.*, 2003). Enfin, comme certains facteurs (agents oxydants, antibiotiques, hormones, xénobiotiques organiques aromatiques) sont également capables d'induire les MTs (Cousins, 1985 ; Onasaka *et al.*, 1987; Palmiter, 1998), la contamination métallique ne peut être exclusivement identifiée par une hausse de la concentration de ces protéines chez les organismes.

2.3.4. Rôles des métallothionéines

Les MTs sont connues pour jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en métaux essentiels. Cette régulation passe par le stockage de ces métaux traces qui permet de constituer une réserve intracellulaire facilement mobilisable pour les besoins enzymatiques et les exigences métaboliques (Viarengo and Nott, 1993; Roesijadi, 1996; Mao *et al.*, 2012). Lorsque les concentrations en métaux traces essentiels sont trop élevées ou lors de la présence de métaux traces non-essentiels, les MTs peuvent aussi jouer un rôle de détoxification (Mason et Jenkins, 1995; Klaassen *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Fraysse *et al.*, 2006). En effet, les MTs sont capables de séquestrer ces métaux et de les rendre non disponibles, ce qui les empêche d'exercer leur toxicité (Roesijadi et Fellingham, 1987; Palmiter, 1998). Cependant, la tolérance de l'organisme au métal *via* ce système de détoxification est limitée à la disponibilité des liaisons thiols présentes sur les MTs et de nombreuses études ont suggéré que le débordement cellulaire est à l'origine des effets toxiques des métaux (George et Olsson, 1994; Geffard *et al.*, 2002a). Il faut noter que lorsque des métaux non-essentiels se trouvent dans une cellule, ils entrent en compétition avec les métaux essentiels pour se lier sur les MTs intracellulaires. L'affinité de la liaison *in vitro* serait plus grande avec les métaux non-essentiels et le rôle de détoxification étant privilégié par rapport à celui du maintien homéostatique (Vasak, 1991; Amiard *et al.*, 2006). D'autres rôles des MTs existent, comme ceux de protection contre les radiations ionisantes (Cai *et al.*, 1999) ou plus généralement contre le stress oxydant (Viarengo *et al.*, 2000; Cavaletto *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2002; Rodriguez-Ortega *et al.*, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006).

2.3.5. Fixation des métaux sur les MTs

Les métallothionéines fixent le cuivre, le zinc et le cadmium. L'affinité mutuelle des sulfures et des métaux de transition fait que la liaison de ces métaux à la MT est thermodynamiquement stable. La forme zinc-MT est la plus prédominante sous conditions physiologiques (Kagi, 1991; Kang, 2006) mais en présence de cuivre, de cadmium ou des ERO générés, le zinc peut être déplacé (Shaw *et al.*, 1991a; Shaw *et al.*, 1991b). La libération du zinc s'accompagne de la formation du complexe MT-ponts disulfures (ou thionine ; forme oxydée de la protéine) qui à son tour peut être réduit par le ratio GSH/GSSG pour restaurer la capacité de la protéine à lier le zinc. Ce cycle redox de la MT joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des métaux physiologiques, la détoxification des métaux toxiques et la protection contre le stress oxydant (Maret, 1995 ; Maret, 2000 ; Feng *et al.*, 2006; Kang, 2006) (Figure 8). Les domaines α et β sont tous les deux impliqués dans la formation de ces ponts. Cependant le domaine α est

le plus facilement oxydé (Feng *et al.*, 2006). Le cadmium et le zinc se fixent comme : 7 atomes de Cd ou de zinc par molécule de MT. Le complexe formé par chaque métal est tétravalent et stable, chaque atome métallique étant relié à quatre atomes de soufre. La fixation des différents atomes de cadmium ne se fait pas au hasard mais semble se faire de façon préférentielle sur le domaine α (domaine C-terminal). Ce n'est que lorsque ce domaine α est saturé que la fixation se fait sur le domaine β (Ejnik *et al.*, 2002 ; Duncan *et al.*, 2006) (Figure 7). Cet ordre de fixation est dit coopératif et séquentiel. Le cuivre se fixe différemment à la protéine. L'interaction entre le cuivre et les MTs est particulière car le cuivre à la différence des deux autres métaux, ne se fixe que sous sa forme de cuivre cuivreux (Cu^+) et jamais, dans les conditions physiologiques, sous la forme d'ion cuivrique (Cu^{2+}). D'autre part, la liaison entre la protéine et les atomes de cuivre ne se fait plus que par une liaison bivalente entre le cuivre et deux atomes de soufre, ce qui permet à 10 atomes de cuivre de se fixer sur la protéine. Nielson *et al.*, (1985) ; Nielson et Winge (1983, 1984, 1985) ont été les premiers à proposer un mode de fixation du cuivre : à partir de l'apoprotéine, le cuivre commence par se fixer sur le domaine β avant de se fixer sur le domaine α . Le potentiel d'oxydoréduction du cuivre fait qu'en présence d'oxygène, la liaison entre le cuivre et la protéine s'oxyde et il y a libération du cuivre avec formation de ponts disulfures intracaténaux ou entre deux molécules de MT, ceci par suite de l'oxydation du cuivre Cu^+ en Cu^{2+} . Les affinités relatives de chaque ion métallique lourd pour la MT diffèrent. En effet, la constante de stabilité pour le cuivre est 100 fois plus élevée que pour le cadmium et 1000 fois plus élevée que pour le zinc. De façon générale, on utilisera la représentation suivante : $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ (Klaassen and Lehman-McKeeman, 1989 ; Dabrio *et al.*, 2002).

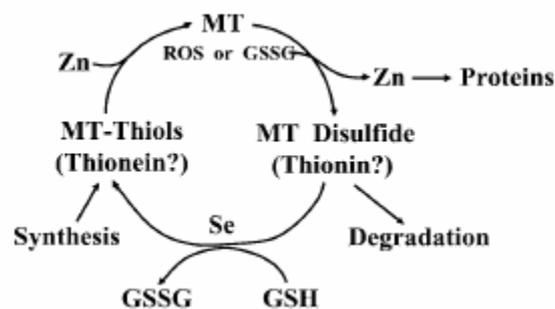


Figure 8. Le cycle redox de MT (Kang, 2006).

2.3.6. Dégradation des métallothionéines

Plusieurs études ont montré que les lysosomes étaient impliqués dans la dégradation des métallothionéines mais le rôle du cytosol ne peut être exclu (Steinebach et Wolterbeek, 1992). Curtis et ses collaborateurs (1994) ont montré une dégradation plus importante au niveau des lysosomes qu'au niveau du cytosol, ceci est probablement dû au pH qui est nettement plus faible au niveau des lysosomes par rapport à celui du cytoplasme et au grand nombre d'enzymes tel que les cathepsines présentes dans les lysosomes. En présence de ces protéases et du pH acide, les métallothionéines ont tendance à libérer les ions métalliques qui les protégeaient contre la dégradation (Curtis *et al.*, 1994). Cette protection varie en fonction de la nature du métal associé. En effet, la demi-vie biologique pour la Cd-thionéine et la Hg-thionéine est beaucoup plus longue que pour la Zn-thionéine.

La Cu-MT résiste à la dégradation lysosomale et des agrégats insolubles de Cu-MT se forment dans les lysosomes (Amiard et Cosson, 1997). Les métaux accumulés au niveau du système lysosomal sont stockés sous forme non toxique et excrétés par des vésicules d'exocytose contenant des granules où sont précipités les métaux (Viarengo *et al.*, 1981 ; Viarengo *et al.*, 1989).

2.3.7. Les métallothionéines comme biomarqueur

L'induction de MTs est une réponse biologique à une exposition métallique dans l'environnement, cette caractéristique est typique de biomarqueurs tels qu'ils sont définis par Lagadic et ses collaborateurs (1997) : un biomarqueur est une modification d'un paramètre observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. La synthèse de MTs suite à une contamination par les métaux (Ag, Cd, Cu, Hg, etc.) a été démontrée chez plusieurs espèces (annélides, mollusques, crustacés, les poissons, etc.), ce qui suggère la possibilité d'utiliser les MTs comme biomarqueur d'exposition métallique (Amiard *et al.*, 2006).

2.3.8. Les différentes méthodes de dosage des MTs

Pour estimer le taux des MTs contenu dans les tissus des organismes, différentes méthodes peuvent être proposées :

- **La chromatographie :**

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature physique des phases (mobile et stationnaire). Parmi ces méthodes, les plus courantes sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Lagadic *et al.*, 1998).

- La méthode de saturation métallique :

L'affinité d'agglomération des métaux avec les thionéines suit l'ordre suivant : Hg>Cu>Cd>Zn. Ainsi l'échange avec Hg²⁰³ et le Cd¹⁰⁹ radioactifs peut être utilisé pour l'estimation des MTs (Hamer, 1986).

- La polarographie :

La polarographie à impulsion différentielle est une technique de voltampérométrie permettant la quantification des groupements SH présents dans un électrolyte spécifique (Olafson et Sim, 1979). La voltampérométrie est basée sur la détection d'une variation d'intensité du courant électrique qui survient dans un électrolyte quand un composé est réduit ou oxydé. Lors du dosage des MTs par voltampérométrie, c'est le signal correspondant à la réduction des groupements SH qui sera mesurée.

- La colorimétrie

Les métallothionéines sont des protéines exceptionnellement riches en cystéines et par conséquent en groupements thiol (SH). En présence du DTNB {5,5'-Dithiobis (2- nitrobenzoic acide)}, l'apparition de la coloration jaune est proportionnelle à la teneur en groupements SH contenu dans les MTs (Viarengo et al. 1997).

- Essais immunologiques (ELISA, RIA)

ELISA : enzyme linked immunoassays

RIA: radio immunoassays.

L'utilisation des anticorps est la méthode la plus sensible pour la quantification des MTs.

L'avantage de ces méthodes est de pouvoir travailler avec un grand nombre d'échantillons durant un temps relativement court.

Les inconvénients sont :

- L'accès à de bonnes qualités d'anticorps est limité.
- La spécificité des anticorps (spécificité liée à l'espèce) (Cosson et Amiard, 1998).

- La détermination des ARNm codant pour la MT :

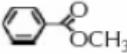
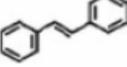
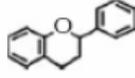
Il s'agit d'une méthode de dosage indirecte qui consiste à mettre en évidence l'induction du gène MT. La détermination de la teneur en ARNm reflète directement la teneur en MT qui est le produit de la traduction de ces ARNm. Pour cela, il faut disposer d'une sonde nucléique (simple brin marqué) qui puisse se lier (hybridation par complémentarité) avec les ARNm et former un brin double. Cette technique, nettement plus sensible que les précédentes, permet de détecter des réponses au niveau cellulaire (Cosson et Amiard, 1998)

2.4. L'activité antioxydante des polyphénols

2.4.1. Classes des polyphénols

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones (Tableau 1). Ces molécules sont généralement trouvés conjuguées aux sucres et les acides organiques.

Tableau 1 : Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006)

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénonnes	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide p-hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide p-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

2.4.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt *et al.*, 2001).

- Les effets bénéfiques **des polyphénols** intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2004).
- En ce qui concerne **les flavonoïdes**, ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.*, 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.*, 2004).
- **Les anthocyanes** sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (Hennebelle *et al.*, 2004). Présente comme des couleurs brillant dans les

fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (Zhang *et al.*, 2005).

- **Les tanins** sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung *et al.*, 1998). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (Hennebelle *et al.*, 2004). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman *et al.*, 2006), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* (Yoshida *et al.*, 1999).
- Les **coumarines** sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson *et al.*, 1996).
- Les **acides phénols et ces dérivés** sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle *et al.*, 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuse du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Kawada *et al.*, 2001 in Rangkadilok *et al.*, 2007). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (Lee *et al.*, 2005).
- Certaines **quinones**, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protozoaires, antivirales,

antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (Bruneton, 1993 ; Hennebelle *et al.*, 2004).

2.4.3. L'espèce *Thymelaea microphylla*

- **Description botanique de l'espèce *Thymelaea microphylla***

Thymelaea microphylla est une espèce endémique à l'Afrique du Nord, est connue localement sous le nom "Methnane", très rameuse, poussant sous forme petits buissons qui ne dépasse pas 1 mètre, à rameaux allongés, dressés et d'une coloration blanchâtres-soyeux (Figure 9). Les feuilles sont très petites et espacées et les fleurs sont blanc-jaunâtres, en glomérules tels que les fleurs mâles à calice cylindrique de 4 à 6 mm et les fleurs femelles de 3 à 4 mm sur des pieds différents (Borris *et al.*, 1988). Cette espèce est très commune des Hauts-plateaux et des régions désertiques de l'Algérie.

- **Position systématique (Gilg, E., 1984 ; A.P.G., 1998)**

Règne	PLANTAE
Embranchement	Spermatophytae
Sous-embranchement	Angiospermae
Classe	Eudicotyledonae
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Malvales
Famille	Thymelaeaceae
Sous-famille	Thymelaeoideae
Tribu	Gnidieae
Genre-Espèce	<i>Thymelaea microphylla</i>

Noms vernaculaires : Methnane, el Abiod (Quezel et Santa, 1963) ou metnen dans le sud de l'Oranais, Tiout et environs, ou metnân dans l'Oriental marocain et methnène en Tunisie (Aît Youssef, 2006).



Figure 9 Image représentative de la plante *Thymelaea microphylla*.

- **Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Thymelaea***

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Thymelaea* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle:

Des enquêtes ethnobotaniques ont montré que *T. lythroides* est très utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine pour combattre différents maux : mal de la vessie et des reins, douleurs gastriques et intestinales, rhumatismes, migraines, conjonctivites, otites, certaines mycoses dermiques, traumatismes (Dohou, 2004). Il est traditionnellement utilisé en Tunisie comme antiseptique, anti-inflammatoire et pour le traitement de l'hypertension (Le Floch, 1983). Au Maroc, la partie aérienne de *T. hirsuta* est utilisée comme décoction dans le traitement du diabète (Ziyyat *et al.*, 1997). Par contre, en Algérie, *T. hirsuta* Endl. est recommandée par les

herboristes dans le traitement de maladies humaines (Leishmanicide, vermifuge, eczéma) dans la région de M'Sila (Boudjelal *et al.*, 2013). Suite à une étude ethnobotanique de Thyméléacées (*Thymelaea microphylla*) menée auprès des populations locales d'El-Mechria et Nâama, cette plante est utilisée contre certaines infections microbiennes. D'autres espèces appartiennent à la même famille sont largement employées pour ces propriétés diurétique, hypotensive et anti-inflammatoire (Djeridane *et al.*, 2006)

- **Quelques activités biologiques reconnues**

L'activité et l'effet biologique de quelques espèces du genre *Thymelaea* sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Thymelaea*

Espèces	Effet et Activité biologique	Références
<i>T. hirsuta</i>	Inhibition de l'activité enzymatique du produit oncogène comme approche pour la chimioprévention du cancer	(Abou-Karam <i>et al.</i> , 1998)
	Activité anti hyperglycémique	(Bnouham <i>et al.</i> , 2007)
	Effet anti mélanogénèse	(Kawano <i>et al.</i> , 2007)
	Activités antioxydantes et antitumorales	(Akrouit <i>et al.</i> , 2011)
	Effet antidiabétique et antihypertenseur	(Bnouham <i>et al.</i> , 2012)
	Activité antioxydante et antimicrobienne	(Trigui <i>et al.</i> , 2013)
	Activités antioxydantes	(Amari <i>et al.</i> , 2014)
	activité anti-inflammatoire et une inhibition de l'induction de l'arthrite adjuvante	(Azza et Oudghiri, 2015)
<i>T. microphylla</i>	Activités antioxydantes	(Kerbab <i>et al.</i> , 2015)
<i>T. lythroides</i>	Activité antifongique	(Dohou <i>et al.</i> , 2004)

**MATÉRIELS ET
MÉTHODES**

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériel végétal

- **Préparation de l'extrait butanolique**

T. microphylla a été récolté en Avril 2009 de Msila lors de la floraison et authentifié par les professeurs Nadra Khalfallah (université Constantine 1) et Mohamed Kaabache (université Sétif 1). Un spécimen de référence a été déposé à l'Herbarium de l'unité de recherche VARENBIOMOL de l'Université de Constantine 1.

Les parties aériennes de *T. microphylla* (2869 g) sont coupées en petits morceaux et mises à macération dans un mélange éthanol/ eau (80/20) pendant 24 à 72 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après concentration à une température n'excédant pas 35 °C, nous avons obtenu un résidu sirupeux. Ce dernier est dilué avec de l'eau distillée à raison de 600 ml pour 1kg de matière sèche. Après filtration, la phase aqueuse obtenue est épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole pour éliminer le chlorophylle, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les phases organiques obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau, puis filtrées et en fin concentrées à sec sous pression réduite et pesées. Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme suivant (figure 10) et le rendement des phases organiques sont donnés dans (le tableau 3)

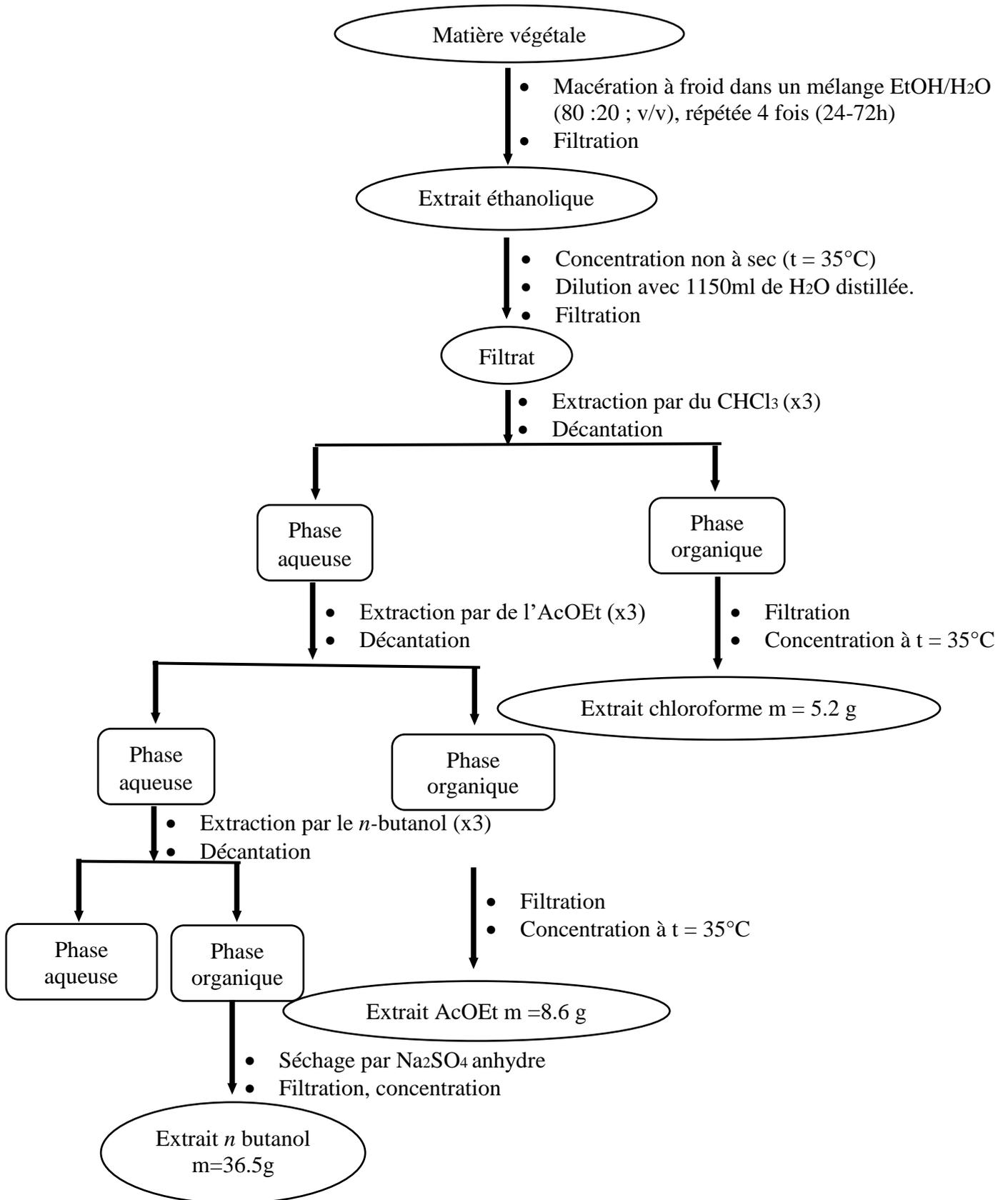


Figure 10 Protocole de l'extraction de *Thymelaea microphylla*

Tableau 3 Masse et rendement des extraits de *Thymelaea.microphylla*

Materiel vegetal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
2869 g	Chloroforme	5.2	0.18 %
	Acétate d'éthyle	8.6	0.29 %
	n-butanol	36.5	1.27

3.2. Traitement des Animaux

Des rats *Wistar Albinos* mâles adultes (120-200 g) ont été logés dans des cages en plastique à une température de 25 ° C avec une période d'obscurité et lumière égale (12 h /12h), avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont été divisés au hasard en quatre groupes de six rats dans chacun groupe:

Groupe témoin: Recevant 2 ml d'eau distillée par jour pendant 28 jours.

Groupe traité par CdCl₂: traité quotidiennement par gavage avec une dose de CdCl₂ (5 mg / kg / jour) pendant 28 jours.

Groupe traité par Vit E: recevant par voie orale et quotidienne Vit E (250 mg / kg / jour) et après 90 minutes CdCl₂ (5 mg / kg / jour) pendant 28 jours.

Groupe traité EBTM: Traité quotidiennement par voie orale avec un extrait EBTM (200 mg / kg / jour) et CdCl₂ (5 mg / kg / jour) pendant 28 jours.

Dans toutes les expériences, l'administration de CdCl₂ a été réalisée après 90 minutes.

3.3. Etude expérimentale

3.3.1. Etude *in vitro*

- L'activité antioxydante
 - L'effet chélateur de DPPH •

L'effet scavenger du radical *DPPH* a été réalisé pour étudier l'activité antiradicalaire d'extrait butanolique de *TM*, nous avons opté pour la méthode qui utilise le *DPPH* (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, Cette effet a été dosé en utilisant la

méthode du radical libre α , α -diphényl- β -picrylhydrazyl (DPPH) avec des modifications légères (Brand-Williams *et al.*, 1995). 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) a été ajouté à 1 ml des différentes concentrations de EBTM et laissé réagir à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance du mélange a été mesurée à 517 nm. Le trolox et l'acide ascorbique ont été utilisés comme références. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH selon l'équation suivante:

% Inhibition = $[(\text{Abs C} - \text{Abs S}) / \text{Abs C}] \times 100$ Où Abs C était l'absorbance du témoin, et Abs S était l'absorbance de l'extrait ou de l'étalon.

– Effet chélateur du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle correspond au radical libre HO \cdot le plus active parmi les espèces réactives de l'oxygène. L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles avec le EBTM a été mesurée selon une méthode modifiée (Halliwell *et al.*, 1987). Des solutions mères d'EDTA (1 mM), de FeCl₃ (10 M), d'acide ascorbique (1 mM), de H₂O₂ (10 mM) et de désoxyribose (10 mM) ont été préparées dans de l'eau distillée. L'essai a été effectué en ajoutant 0,1 ml d'EDTA, 0,01 ml de FeCl₃, 0,1 ml de H₂O₂, 0,36 ml de désoxyribose, 1,0 ml d'extrait de plante (50-400 $\mu\text{g} / \text{ml}$), 0,33 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7,4) et 0,1 ml d'acide ascorbique consécutivement. Le mélange a été ensuite incubé à 37 ° C pendant 1 heure. Un volume d'environ 1,0 ml du mélange incubé a été mélangé avec 1,0 ml de TCA à 10% et 1,0 ml de TBA à 0,5% pour développer le chromogène rose, mesuré à 532 nm. L'absorbance a été notée à 532 nm. L'effet chélateur a été calculé comme suit:

% OH \cdot capacité de piégeage = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$, où A₀ l'absorbance du témoin et A₁ l'absorbance de la fraction ou étalon (Trolox).

• L'activité anti-inflammatoire (œdème de la patte induit par la carragénine)

L'activité anti inflammatoire repose sur la diminution de l'œdème provoqué par l'administration de la carragénine.

L'activité anti-inflammatoire de EBTM sur l'œdème de la patte induit par la carragénine a été déterminée chez le rat (Yesilada *et al.*, 2002). Les rats ont été divisés en quatre groupes de 5, le groupe I a servi de témoin (véhicule reçu, PBS), le groupe II a servi de référence (recevant du diclofénac sodique par voie orale, 10 mg / kg) (Surana et Kumar, 2013), groupe III et IV

reçoivent par voie orale 100 et 200 mg / kg de EBTM respectivement. Soixante minutes plus tard, l'œdème de la patte a été induit en injectant 0,1 ml de carragénine à 1% dans le tissu sous-plantaire de la patte arrière gauche des rats. La progression de l'œdème (mm, après 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures) a été évaluée en mesurant l'œdème de la patte en utilisant un micromètre gradué combiné à un système de levier chargé constant. L'œdème a été exprimé comme l'augmentation de l'épaisseur de la patte (mm) en raison de l'effet inflammatoire. Le pourcentage d'inhibition de l'inflammation a été calculé à partir de la formule: % inhibition = $(D_0 - D_t) / D_0 \times 100$, où D_0 inflammation moyenne (œdème de la patte arrière) du groupe témoin de rats à un moment donné, D_t inflammation moyenne des rats traités (extrait ou diclofénac-sodium) en même temps.

3.3.2. Estimation biochimique des paramètres de la fonction rénale

Après les derniers traitements, les rats ont été jeûnés pendant la nuit. Des échantillons de sang ont été prélevés par ponction dans le plexus veineux recto-orbitaire et le plasma obtenu (centrifugation à 4000 tr / min, 15 minutes) a été soumis aux marqueurs de la fonction rénale (créatinine, BUN, GGT, sodium et potassium) en utilisant des méthodes enzymatiques.

3.3.3. Estimation du stress oxydatif rénal et de la métallothionéine et les paramètres de l'inflammation

- **Préparation d'homogénat rénal**

Après la décapitation cervicale, les reins enlevés ont été pesés et lavés avec une solution saline refroidie de chlorure de sodium (NaCl 0,9%). Le tissu rénal a été coupé et homogénéisé (10% p / v) dans du KCl (1,15%) et centrifugé (1000 tr / min, 15 min). Le surnageant résultant a été utilisé pour la peroxydation lipidique (estimation MDA).

- **Préparation de la fraction cytosolique**

La fraction cytosolique a été homogénéisée avec Tris EDTA pH 7,6 (Tris 50 mM + EDTA 0,1mM), puis le surnageant obtenu par centrifugation à 9600 tr / min pendant 45min a été congelé à -80°C.

- **Dosage des paramètres de stress**

L'étude de la peroxydation lipidique, est repose sur le dosage de malondialdéhyde (MDA est l'un des produits secondaires les plus connus de la peroxydation lipidique, et il est utilisé comme un marqueur de la lésion de la membrane cellulaire).

Le MDA, a été mesurée par la méthode basée sur la réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Okhawa *et al.*, 1979). Le niveau de glutathion réduit (GSH) était dosé par la méthode basée sur la réaction avec le réactif d'Ellman (400 mg d'acide dithionitrobenzoïque dans 100 ml de citrate de sodium à 1%) qui détermine la concentration de GSH en utilisant du 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) à 412 nm en utilisant un spectrophotomètre (Ellman, 1959). L'activité SOD a été déterminée en utilisant le pyrogallol comme substrat (Marklund, 1985). Cette méthode est basée sur l'oxydation du pyrogallol par l'anion superoxyde (O₂⁻) et sa dismutation par SOD. L'activité de la catalase (CAT) a été mesurée en mesurant la décomposition du peroxyde d'hydrogène à 240 nm (Aebi, 1974). L'activité de la glutathion S-transférase (GST) a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant le CDNB comme substrat (Habig *et al.*, 1974)

- **Quantification de la métallothionéine**

Les métallothionéines sont localisées dans la membrane de l'appareil de Golgi. Elles ont la capacité de lier les métaux lourds physiologiques (tels que zinc, cuivre, sélénium) et xénobiotiques (cadmium, mercure, argent, arsenic) à travers le groupe thiol de ses résidus cystéine, qui représentent près de 30% de ses acides aminés constitutifs

L'analyse de la MT a été réalisée dans le tissu rénal (Viarengo *et al.*, 1997). Il a été homogénéisé sur la glace dans une solution tampon (20 mM tris, 1,5 mM de phénylméthylsulfonyl, 10-5 mM de β-mercaptoéthanol et 0,5 M de sucrose) avec un rapport de 1: 3 (p / v). L'homogénat a été centrifugé à 25000 g pendant 60 min. à 4 ° C. L'addition de l'éthanol pur froid (1,05 mL à -20 ° C) et 80 µL de chloroforme à 1 mL de surnageant. Après centrifugation à 6000 g pendant 10 minutes à 4 ° C, 40 µl de HCl (37%) et 3 volumes d'échantillon d'éthanol ont été ajoutés. Après précipitation des protéines (les échantillons sont conservés à -20 ° C), ils ont été centrifugés à 6000 g pendant 10 min. Les culots ont été lavés dans un tampon homogénéisateur contenant 87% d'éthanol et 1% de chloroforme. Les échantillons ont à nouveau été centrifugés à 6000 g pendant 10 minutes à 4 ° C et le culot a été séché sous un courant d'azote gazeux pendant 10 minutes. Les culots secs ont été ajoutés à 150 µL de NaCl (0,25 M) et 150 µL de HCl (1 N) contenant 4 mM d'EDTA. Une solution de chlorure de sodium (2 M) contenant 43% de DTNB (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, réactif d'Ellman) a été mélangée avec un tampon de Na-phosphate (pH = 8) et ajoutée aux échantillons à température ambiante. A la fin, les échantillons ont été centrifugés à 3000 g

pendant 5 min. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 412 nm et la concentration de métallothionéine a été déterminée à l'aide de glutathion réduit comme étalon de référence.

- **Dosage de la myéloperoxydase (MPO) et de NO**

La MPO est un membre de la sous-famille XPO des peroxydases et produit de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de l'anion chlorure (Cl⁻), une activité qui va augmenter le taux des RL.

L'activité MPO a été mesurée suivant la méthode de Bradley *et al.*, 1982. Les échantillons ont été homogénéisés, congelés et décongelés, puis centrifugés à 1500 tr / min pendant 10 min à 4 ° C. L'activité de MPO a été mesurée avec une méthode colorimétrique à 450 nm en ajoutant 100 µl du surnageant à 1,9 ml de tampon phosphate à 10 mmol / l (pH 6,0) et 1 ml de chlorhydrate d'o-dianisidine à 1,5 mol / l contenant H₂O₂ (0,0005% p / v).

Le nitrite tissulaire (NO₂⁻) et le nitrate (NO₃⁻) ont été estimés comme un indice de production de NO, car l'estimation des niveaux de NO dans les échantillons biologiques est difficile. Ils ont été mesurés par la méthode basée sur la réaction de Griess (Cortas et Wakid, 1990). Les échantillons ont été déprotéinisés avec le réactif de Somogyi. Le nitrite total (nitrite + nitrate) a été mesuré après conversion (réduction) du nitrate en nitrite en utilisant un spectrophotomètre à 545 nm.

3.3.4. Études histopathologiques

Les reins obtenus à partir des rats (normaux et traités) ont été fixés dans du formol tamponné à 10% puis des coupes en paraffine ont été réalisées. Ces coupes d'environ 5µm d'épaisseur ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine (H & E) pour étudier l'histologie du rein des rats de l'expérimentation.

3.4. Analyse statistique

Pour les études *in vivo* (n = 7) les résultats sont exprimés comme valeurs de moyenne ± écart-type. Les expériences *in vitro* ont été réalisées en triplet et les résultats exprimés en moyenne ± écart-type. La valeur IC₅₀ (µg extrait / ml) est la concentration efficace 50% d'activité, a été calculée pour chaque dosage. L'évaluation statistique a été réalisée au moyen d'une analyse de

variance (ANOVA). Le niveau de signification entre les différents groupes a été évalué par le test t (Student test) et les valeurs ont été considérées comme hautement significatives à $P < 0,01$ et significatives à $P < 0,05$.

RÉSULTATS

4. Résultats

4.1. L'activité antioxydante

4.1.1. L'effet chélateur de DPPH

Les extraits butanoliques du *TM* a montré une augmentation progressive de l'activité de piégeage des radicaux DPPH d'une manière dépendant de la dose (figure 11), Ils ont révélé une capacité de piégeage des radicaux DPPH très élevée ($88,1 \pm 0,87$ - $88,6 \pm 0,87\%$) à la concentration comprise entre 600 - $800 \mu\text{g} / \text{ml}$. Ces résultats ont été comparés à ceux des standards de l'acide ascorbique et du trolox ($97,20 \pm 0,03\%$, $83,03 \pm 0,4 \%$) respectivement. Selon la valeur IC_{50} , l'effet chélateur des radicaux DPPH était avec l'ordre suivant (l'acide ascorbique: $6,41 \pm 0,61$ < trolox: $30,08 \pm 0,83$ < EBTM: $237,22 \pm 6,4$).

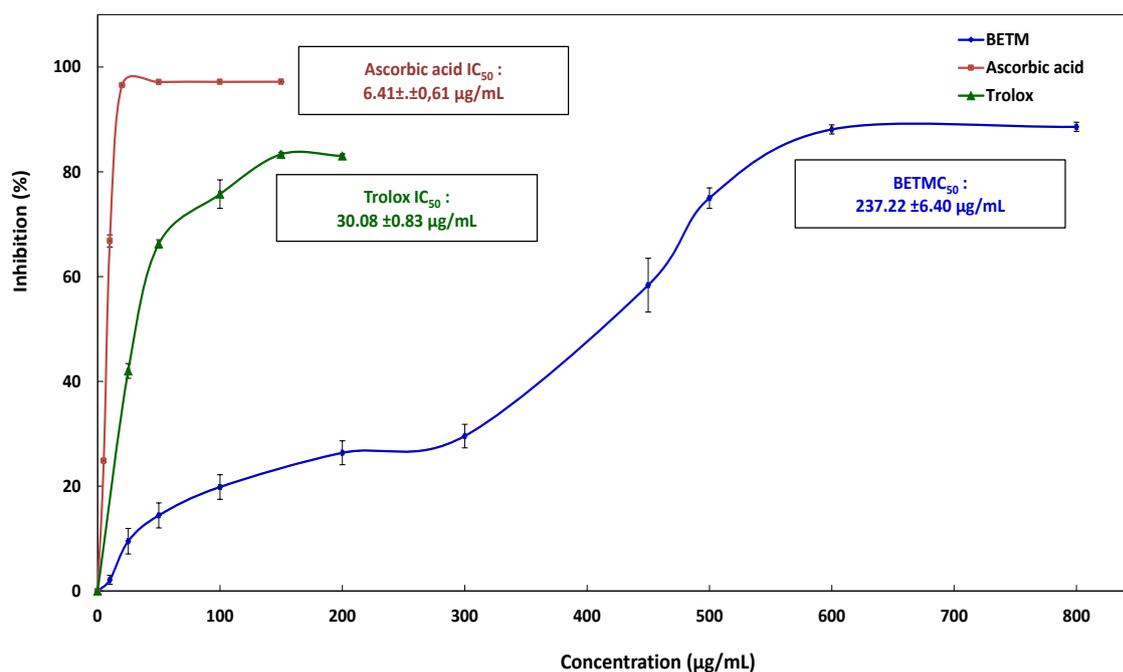


Figure 11 L'effet chélateur de DPPH* de EBTM et les standards. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3) $P < 0.05$.

4.1.2. Effet chélateur du radical hydroxyle

Dans la présente étude, EBTM a montré une forte capacité de piégeage le OH° à 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($74,34 \pm 0,51\%$) par rapport à des piègeurs de référence (trolox) qui était de $83,09 \pm 0,73\%$. L'inhibition IC_{50} du radical OH° était de $142,01 \pm 9,29 \mu\text{g} / \text{ml}$, comparé au trolox ($50,08 \pm 0,70 \mu\text{g} / \text{ml}$) (figure 12).

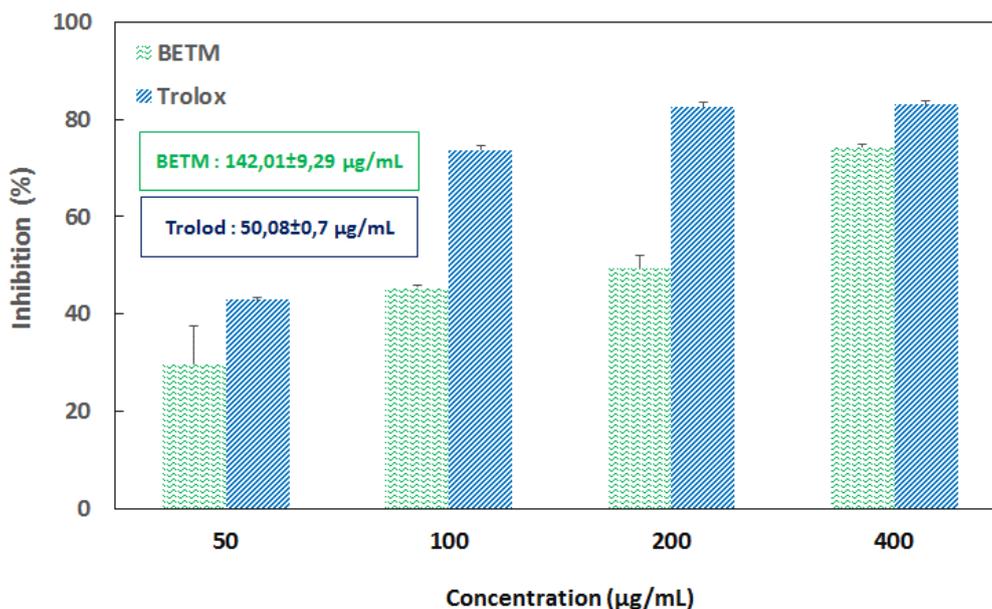


Figure 12 L'effet chélateur d' OH^\bullet de EBTM et les standards. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3) $P < 0.05$.

4.2. L'activité antiinflammatoire

L'étude de l'activité antiinflammatoire a été réalisée suite à l'inflammation aiguë, suite à l'injection sous-plantaire de λ -carragénine (1%) qui va induit un gonflement progressif de la patte du rat ($5,068 \pm 0,0192\text{mm}$) et atteint un niveau maximal à la troisième heure ($6,124 \pm 0,036\text{mm}$), EBTM a montré un effet significative ($P < 0,01$) plus prononcé à la concentration 200 mg / kg (Figure 13) en réduisant significativement le gonflement à la phase précoce (3h, 45%) , et la phase tardive (6 h, 42,35%) de l'œdème induit par la carragénine, cet effet est clairement comparé au diclofénac-sodium (10 mg / kg), qui se sont avérés être 50,1% et 43,01% d'inhibition respectivement.

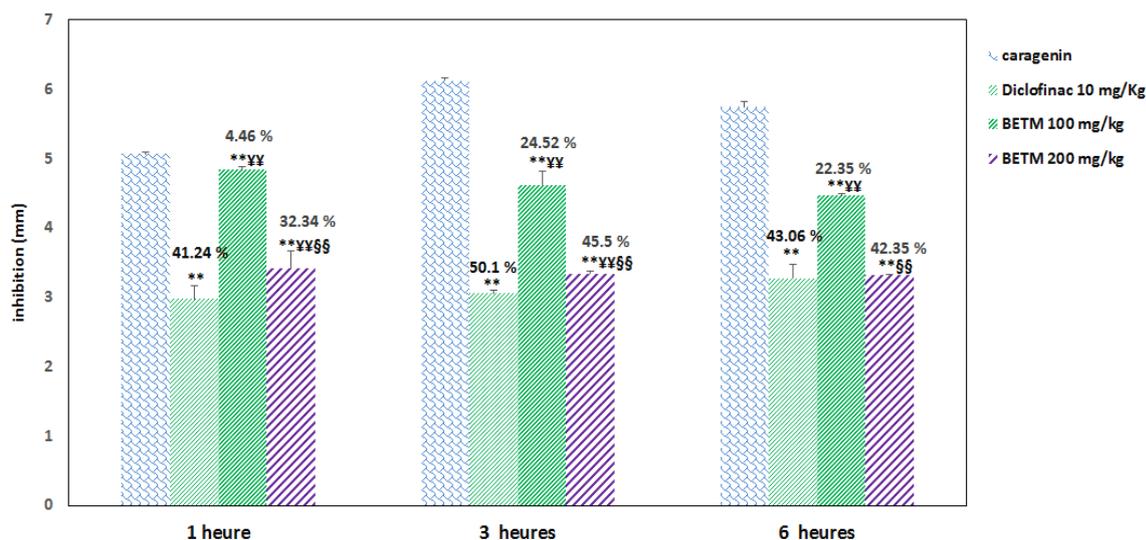


Figure 13 L'effet d'EBTM sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. Chaque valeur est en moyenne \pm SD (n=5); (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$), comparaison avec le control; (a: $p < 0.05$; b: $p < 0.01$, EBTM (100 mg/kg) vs EBTM (200 mg/kg); Diclofenac-de sodium (10 mg/kg) vs EBTM (200 mg/kg). Test de Student. Les valeurs données au-dessus des bars représentent le pourcentage d'inhibition.

4.3. Les marqueurs de la fonction rénale

Les animaux traités avec CdCl_2 (5 mg / kg) ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) des taux de créatinine et d'azote uréique (Tableau 4) ainsi que de l'activité GGT, sodium et potassium par rapport au groupe témoin. Les animaux recevant le traitement combiné de Cd (5 mg / kg) et EBTM (200 mg / kg) ont montré une amélioration significative ($p < 0,01$) des marqueurs de la fonction rénale, comme en témoigne une réduction significative ($p < 0,01$) de créatinine (61,91%) et BUN (70,09%). Il y avait aussi une modulation significative ($p < 0,01$) de l'activité GGT (74,13%), du sodium (70,85%) et du potassium (79,73%) (Tableau 5) par rapport à la référence standard, groupe VitE (83,59%, 85,65 % et 81,96%) respectivement.

Tableau 4 L'effet protecteur de EBTM sur le dysfonctionnement rénal induit par le cadmium chez le rat (BUN et créatinine). ** Comparaison entre le témoin et les traités. †† Comparaison entre cadmium et les traitements. ¥¥ Comparaison entre Vit et Extrait.

	BUN (mg/dl)	Créatinine (mg/dl)
Témoin	14,816±0,703	1,198±0,199
Cadmium	87,74±4,040**	3,25±0,27**
Vit E + Cd	34,24±0,97** †† (78,70)	1,75±0,36* †† (81,79 %)
Cd + Extrait	41,18±2,22** †† ¥¥ (70,09 %)	1,32±0,02 †† ¥¥ (61,91 %)

Tableau 5 L'effet de EBTM (200mg/Kg) sur le dysfonctionnement rénal induit par CdCl₂ (Na⁺, K⁺ GGT). Les valeurs sont moyenne ± SD (n = 7), G2 vs G1; G3, G4 vs G2; **P<0.01; *P<0.05; les valeurs entre parenthèses représentent le pourcentage de de protection. Le pourcentage de protection est calculé comme: 100 x (valeurs de CdCl₂)-valeurs des échantillons/ (valeurs de CdCl₂)-valeurs de témoin, (P<0.001).

Paramètres	Témoin	CdCl ₂	EBTM	Vit E
Na ⁺ (mEq/L)	152.46±7.96	167.66±1.92**	156.89±3.89§§ (70.85 %)	154.64 ±6.66§§ (85.65 %)
K ⁺ (mEq/L)	6.028±0.33	7.37±0.37**	6.3±0.66§§ (79.73 %)	6.27 ±0.7§§ (81.96 %)
GGT (UI/L)	2.284±0.38	4.82±0.37**	2,94±0.67§§ (74.13 %)	2.70± 0.32§§ (83.59 %)

4.4. Stress oxydatif rénal et niveau de métallothionéine

Le niveau de la peroxydation lipidique (MDA) était significativement ($p < 0,05$) élevée chez les rats traités au $CdCl_2$. Le co-traitement de EBTM (200 mg / kg) avec $CdCl_2$ (5 mg / kg) significativement ($p < 0,05$) réduit (86,07%) la peroxydation lipidique. Une diminution significative ($p < 0,05$) du système de défense antioxydante rénale (SOD, CAT et GST) et une déplétion du niveau de GSH ont été observées chez des rats traités au cadmium. L'administration de EBTM (200 mg / kg / jour) et de cadmium ($p < 0,05$) a restauré significativement les niveaux du système de défense antioxydant rénal (72,64, 65,95, 59,45, 69,27%) respectivement par rapport au groupe Vit E (84,55, 71,049, 72,71, 84,6%) (Tableau 6). Le niveau de métallothionéine, qui est également un agent antioxydant, était significativement ($P < 0,01$) plus élevé dans le tissu du cortex rénal des rats traités au $CdCl_2$ ($353,1 \pm 15 \mu\text{g} / \text{g}$ de tissu) que dans le groupe témoin ($99,35 \pm 10,8 \mu\text{g} / \text{g}$ de tissu). Dans le groupe EBTM et le groupe Vit E, le niveau de métallothionéine a été significativement ($P < 0,01$) normalisé (79,42%) par rapport à Vit E (87,76%) (Figure 14)

Tableau 6 L'effet protecteur de EBTM sur le stress oxydant induit par le cadmium chez le rat.

** comparaison entre le témoin et les traités, †† comparaison entre le cadmium et les traitements, ¥¥ comparaison entre Vit E et extrait. Les valeurs sont en moyenne \pm SD ($n = 7$), ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection.

	CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)	GSH (nmol/g tissu)	GST (nmol/g protéine)	SOD (u/mg protéine)	MDA (nmol/g tissu.)
Témoin	59,376 \pm 2,91	32,24 \pm 1,96	5,982 \pm 0,611	16,462 \pm 0,48	34,52 \pm 1,132
Cadmium	20,496 \pm 0,88**	12,496 \pm 0,63**	2,376 \pm 0,44**	7,9 \pm 0,65**	79,76 \pm 7,79**
Vit E + Cd	48,12 \pm 2,07** †† (71,049 %)	29,2 \pm 1,25 * †† (84,6 %)	4,998 \pm 0,12** †† (72,71 %)	15,14 \pm 0,43** †† (84,55 %)	46,54 \pm 2,18** †† (73,43 %)
Cd + Extrait	46,14 \pm 1,7** †† (65,95 %)	26,17 \pm 1,19** †† ¥¥ (69,27 %)	4,52 \pm 0,26** †† ¥¥ (59,45 %)	14,12 \pm 0,51** †† ¥¥ (72,64 %)	40,82 \pm 1,14** †† ¥¥ (86,07 %)

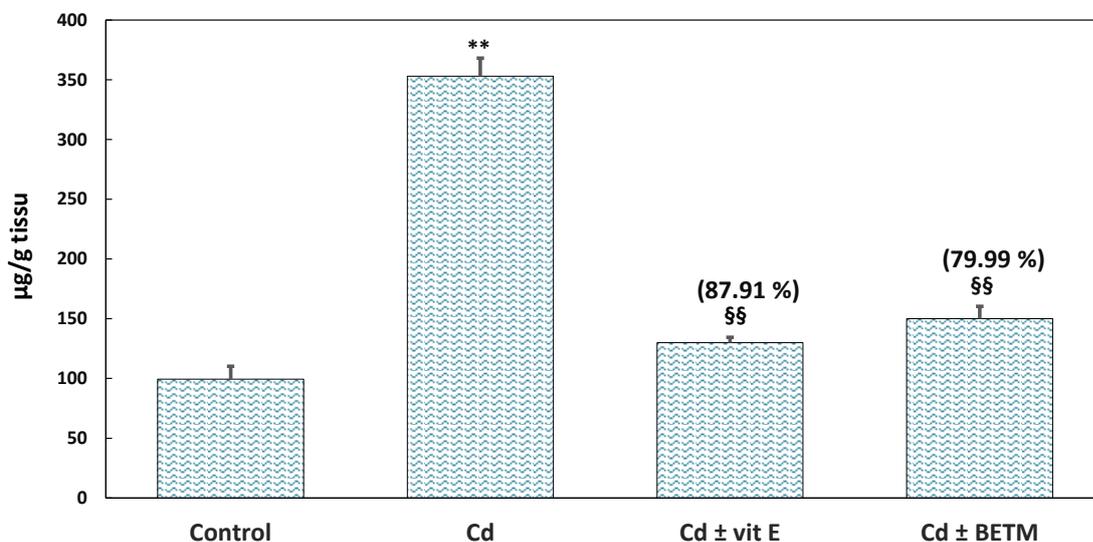


Figure 14 L'effet de EBTM (200 mg/Kg) sur le taux de la métallothionéine, induit par le CdCl₂. Le pourcentage de protection Vit E et EBTM sur la métallothionéine induite par le CdCl₂, les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le pourcentage de protection est calculé comme: $100 \times (\text{valeurs de CdCl}_2 - \text{valeurs des échantillons}) / (\text{valeurs de CdCl}_2 - \text{valeurs de témoin})$

4.5. Niveaux de MPO et de NO rénaux

L'activité MPO, qui est un indicateur de l'infiltration des neutrophiles, était significativement ($p < 0,05$) plus élevée dans le tissu rénal du groupe Cd ($87,3 \pm 1,98$) que dans le groupe témoin ($28,24 \pm 1,028$). Le taux de NO du groupe traité au Cd a été augmenté significativement ($p < 0,05$) dans le tissu rénal par rapport aux autres groupes ($p < 0,05$). Le traitement combiné de CdCl₂ (5 mg / kg) et EBTM (200 mg / kg) a rétabli significativement ($p < 0,05$) les niveaux de MPO et de NO respectivement de (61,91, 70,09%) par rapport au groupe VitE (81,79, 78,70%) (Tableau 7).

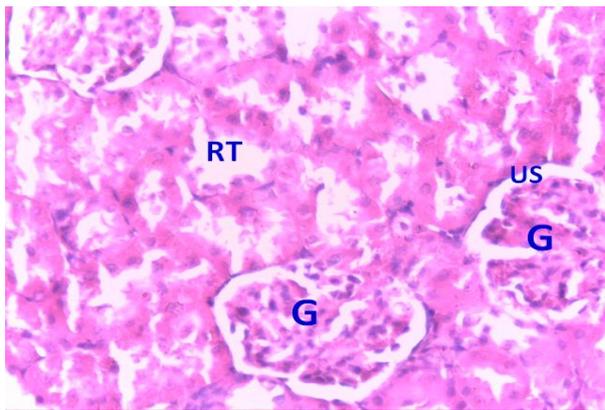
Tableau 7 L'effet de EBTM sur les paramètres de l'inflammation induite par le CdCl₂ chez le rat. **comparaison entre le témoin et les traités, †† comparaison entre le cadmium et les traitements, ¥¥ comparaison entre Vit E et extrait. Les valeurs sont en moyenne ± SD (n = 7), **P<0.01; *P<0.05; les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection.

	NO (µg/g tissu)	MPO (nmol/g tissu)
Témoin	37,98±0,717	28,24±1,028
Cadmium	86,81±2,41 **	87,3±1,98**
Vit E + Cd	48,38±1,35** †† (78,70 %)	38,99±1,96** †† (81,79 %)
Cd + Extrait	52,59±2,07** †† ¥¥ (70,09 %)	50,74±1,13** †† ¥¥ (61,91 %)

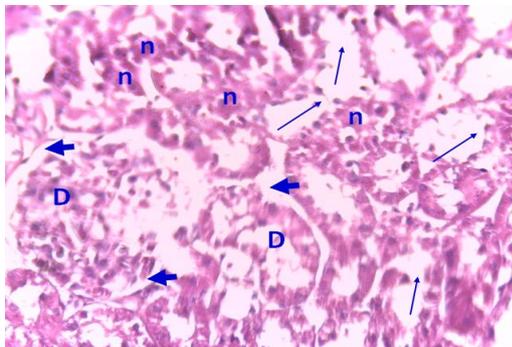
4.6. Examen histopathologique

L'analyse histopathologique de la région corticale des reins de rats a révélé des altérations morphologiques du parenchyme rénal. Dans le groupe Cd, le Cd a provoqué des lésions sévères et étendues mises en évidence par une dilatation de la lumière tubulaire, des cellules tubulaires nécrotiques, un épithélium dégénératif, des vaisseaux sanguins encombrés et des lésions interstitielles avec des degrés variables de nécrose tubulaire et d'infiltration inflammatoire cellulaire (Figure15 B1, B2) en comparaison avec les reins des rats témoins (figure 15 A). Ces altérations ont été également caractérisées par un parenchyme rénal perturbé (une dégénérescence glomérulaire sévère).

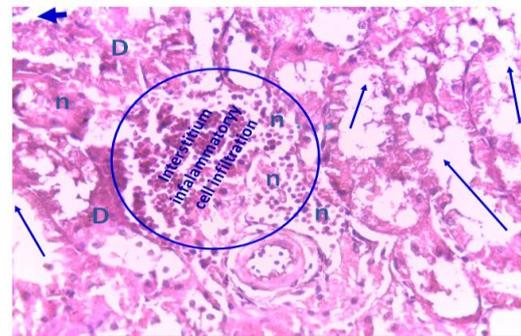
Dans le groupe traité par EBTM, il y avait une amélioration remarquable des caractéristiques histologiques du rein et un degré modéré d'altération histopathologique (lésion tubulaire et inflammation interstitielle réduites). Les groupes prétraités par VitE et EBTM ont montré une légère dégénérescence à quelques endroits et un degré modéré d'altération histopathologique (Figure15 C, D)



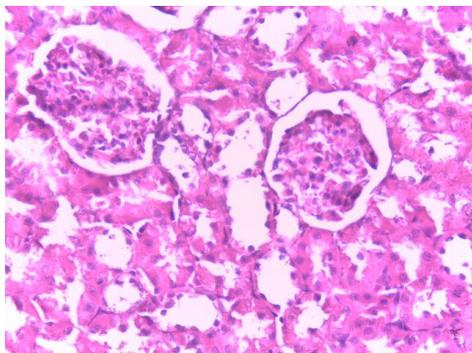
(A) Témoin



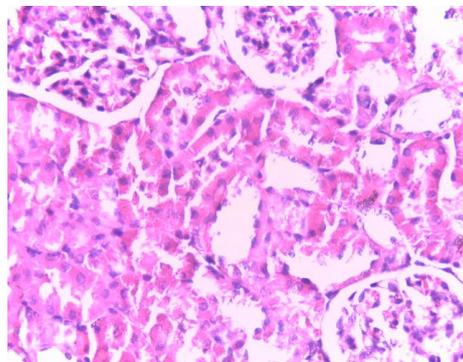
(B1) CdCl₂



(B2) CdCl₂



(C) Vit E



(D) EBTM

Figure 15 Photomicrographie de l'analyse histopathologique du cortex rénal des rats (H&E X400).

DISCUSSION

5. Discussion

Le rein est vulnérable aux dommages en raison d'une très grande perfusion et de la forte concentration de composés excrétés dans les cellules tubulaires rénales (Mohamed *et al.*, 2003). Le cadmium induit un large spectre d'effets toxicologiques et de dysfonctionnements biochimiques pour la santé. De nombreuses études ont démontré que la néphrotoxicité induite par le cadmium est associée à la lésion tubulaire proximale qui entraîne une nécrose des cellules épithéliales tubulaires proximales dans le rein des rats (Shaikh *et al.*, 1999 ; Sabolic *et al.*, 2001 ; Morales *et al.*, 2006 ; Garcon *et al.*, 2007 ; Pari *et al.*, 2007).

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme au divers agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiennes (les glucocorticoïdes) et non stéroïdiennes comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours (Gaziano *et al.*, 2006). La carragénine est un polysaccharide (galactane) extrait d'algues rouges. L'administration de la carragénine provoque des réactions inflammatoires et des lésions tissulaires. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes, du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO. (monoxyde de nitrogène). La carragénine est l'agent phlogistique de choix pour tester les médicaments anti-inflammatoires car il n'est pas connu pour être antigénique et est dépourvu d'effets systémiques apparents. De plus, le modèle expérimental présente un haut degré de reproductibilité. Dans l'œdème de la patte induit par la carragénine, l'extrait butanolique de la plante *TM* a exercé un effet anti-inflammatoire présenté par une réduction significative de l'œdème de la patte chez le rat à la dose de 200 mg / kg par rapport au témoin. L'effet de l'extrait butanolique de la plante *TM* sur l'œdème s'explique par la synthèse des substances pro-inflammatoires comme le MPO et le NO ainsi que l'acide hypohaleux (Rahmani *et al.*, 2012). L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *TM* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires.

Dans la présente étude, l'augmentation de la créatinine sérique et BUN reflètent l'insuffisance rénale. Qui va expliquer l'excrétion massive de la créatinine dans le sang. La créatinine est produite à partir de la créatine, une molécule indispensable pour la production d'énergie dans les muscles. En temps normal, la créatinine est transportée par le sang puis éliminée par les

reins, dans les urines. L'augmentation de ce taux dans le sang (taux plasmatique) va de pair avec une réduction de la fonction rénale. L'administration de EBTM (200 mg / kg / jour) a restauré de manière significative la fonction rénale et protège le rein de l'intoxication au Cd. La valeur de créatinine dans le plasma est inversement liée au Débit de Filtration Glomérulaire (DFG), donc à la fonction rénale. Ainsi, plus la fonction rénale est altérée, plus la créatininémie augmente. La valeur de créatinine dans le plasma dépend aussi de la production musculaire de créatinine.

Chez les rats exposés au Cd, les taux sériques de sodium et de potassium ont été significativement augmentés. Selon plusieurs études, les perturbations électrolytiques sont dues à l'effet toxique du cadmium sur les tubules rénaux (Akesson *et al.*, 2005). Le cadmium augmente la rétention du sodium et diminue l'excrétion de l'eau. D'autres recherches ont montré que le Cd augmente la réabsorption du sodium (Perry *et al.*, 1980 ; Nishiyama *et al.*, 1984 ; Zaki *et al.*, 2013). Le cadmium induit également la dépolarisation de la membrane cellulaire et diminue la résistance de la membrane cellulaire; stimulant les canaux potassiques et augmentant la concentration de potassium extracellulaire (Jungwirth *et al.*, 1990). Un autre mécanisme qui augmente le niveau de sodium et de potassium est la diminution de nombre des néphrons fonctionnels qui déclenche de multiples processus adaptatifs dans les néphrons restants hyper fonctionnels, y compris des taux accrus de réabsorption d'électrolytes (Kheir Eldin *et al.*, 2008). Notre étude révèle également que GGT a augmenté. Le taux de gamma-GT peut être élevé dans toutes les maladies hépato-biliaires, dans l'alcoolisme chronique, après la prise de médicaments inducteurs (barbituriques, antidiabétiques, pilule, médicaments contre la tension artérielle, somnifères, est aussi après des intoxications par des xénobiotiques comme les métaux lourds, au cours de l'obésité, d'hyperlipidémie, du diabète ou quelque fois dans des cas de l'insuffisance rénale, dans notre étude le GGT a été significativement augmenté dans les reins après 28 jours de consommation de cadmium. Cette augmentation renforce vraisemblablement l'absorption rénale de GSH à partir du flux sanguin, ce qui peut contribuer à la diminution de la concentration de GSH dans le plasma. Le rein est caractérisé par l'activité GGT la plus élevée, presque 900 fois plus élevée que dans le foie (Hinchman et Ballatori, 1990). En outre, le renouvellement rapide du GSH cellulaire a été démontré dans le rein et il est considéré comme fondamental pour cet organe (Potter et Tran, 1993).

Dans la présente étude, le niveau accru de TBARS observé dans les tissus rénaux des rats exposés au Cd (5 mg / kg) indique un degré élevé de peroxydation lipidique et de stress oxydatif. Il est bien connu que le cadmium peut interférer avec les mécanismes de défense antioxydant

et la production des ROS, pouvant ainsi agir comme une molécule de signalisation dans l'induction de la mort cellulaire (Waisberg *et al.*, 2003). Les réactions de ROS, qui consistent principalement le O_2^- , H_2O_2 et OH^\cdot (Nagma *et al.*, 2012) avec des biomolécules cellulaires, ont entraîné une peroxydation lipidique, et des dommages aux protéines membranaires, une altération de l'expression des gènes, des dommages à l'ADN et qui conduit à l'apoptose (Stohs et Bagchi, 1995 ; Stohs *et al.*, 2001). Bien que le cadmium est incapable de générer des radicaux libres directement, il génère indirectement divers radicaux libres tels que le radical superoxyde, et les autres espèces azotées telles que le peroxydant, l'oxyde nitrique et le radical hydroxyle qui vont causant ainsi des dommages cellulaires liée au stress oxydatif (Hassoun et Stohs, 1996 ; Stohs *et al.*, 2000). La suppression de la fonction de piégeage des radicaux libres et l'augmentation du taux des ROS contribuent à l'induction du stress oxydant par le Cd qui va associés d'autres effets toxiques (Szuster-Clesielska *et al.*, 2000 ; Waisberg *et al.*, 2003). En revanche, l'augmentation des niveaux de ROS dans les cellules rénales induit l'expression du gène codant pour les transporteurs multi résistants aux médicaments qui protège les cellules des tubules proximaux contre l'apoptose (Nair *et al.*, 2013). La peroxydation lipidique, qui représente les effets directs des radicaux libres, est considérée comme le mécanisme principal de la toxicité induite par le Cd (Bagchi *et al.*, 1996 ; Cinar *et al.*, 2011). Le cadmium induit une peroxydation lipidique et une augmentation des teneurs en espèces hydroperoxydes lipidiques résulte des défragmentation des phospholipides et des carbonyles protéiques ce qui a été considéré comme la cause principale de son influence sur la fonction de la membrane cellulaire rénale (Yiin et Lin, 1998 ; Jahangir *et al.*, 2005 ; Eybl *et al.*, 2006). Plusieurs études expérimentales indiquent que l'exposition au Cd induit rapidement des lésions membranaires dans les cellules rénales par le biais du processus de peroxydation lipidique. Une étude a démontré que la plus forte augmentation de MDA dans le rein de rat se produit 24 h après injection intra péritonéale de Cd (2,5 mg Cd / kg) (Casalino *et al.*, 2002), tandis qu'une dose de Cd deux fois plus élevée appliquée par la même voie a provoqué une augmentation considérable de MDA après 72 h (Yiin *et al.*, 1999). Des études expérimentales ont confirmé des niveaux accrus de TBARS / MDA dans le rein d'animaux traités par le Cd par différentes voies et sur différentes périodes (1-12 semaines) (Jurczuk *et al.*, 2004 ; Morales *et al.*, 2006 ; Renugadevi et Prabu, 2010; Matović *et al.*, 2013; Dkhil *et al.*, 2014).

Le niveau élevé de MDA mentionné dans le groupe Cd de notre étude était associé à une déplétion remarquable du GSH rénal chez les rats exposés au Cd en raison de la liaison directe du Cd aux sites actifs de l'enzyme, qui contient des groupements $-SH$ (Quig, 1998). Plusieurs

recherches ont montré que la diminution significative des niveaux de ces antioxydants non-enzymatiques suite à une toxicité au Cd pourrait conduire à une susceptibilité accrue du tissu rénal aux dommages des radicaux libres. Telle que le GSH qui est un antioxydant non enzymatique agissant comme une première ligne de défense contre le stress oxydatif provoqué par des xénobiotiques. (Sunitha *et al.*, 2001). La réduction significative des niveaux de GSH enregistrés peut être attribuée à l'utilisation accrue de GSH (par les tissus rénaux) pour neutraliser la production excessive des ROS générées au cours du processus de lésion rénale induite par le Cd (Stohs *et al.*, 2001). Alors que la déplétion du GSH semble être un facteur primordial qui permet la peroxydation des lipides dans l'intoxication par le Cd. Une diminution des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GST) a également été observée dans les tissus rénaux exposés au Cd, ce qui indique un échec du système de défense antioxydant contre les agressions et le taux élevé des ROS lors de l'exposition au Cd. L'exposition au Cd inactive la plupart des enzymes antioxydantes par la liaison directe aux sites actifs enzymatiques un phénomène très remarqué surtout pour les enzymes qui possèdent un groupement thiol (Quig, 1998) ou par le déplacement des cofacteurs métalliques des sites actifs (Casalino *et al.*, 2000). Ainsi, l'inhibition des enzymes impliquées dans l'élimination des radicaux libres conduit à l'accumulation de H₂O₂, un agent très active dans le vieillissement cellulaire à travers la favorisation de la peroxydation lipidique et la mort cellulaire (Stohs *et al.*, 2000 ; Waisberg *et al.*, 2003). La présente étude a révélé que l'exposition du rat au CdCl₂ (5 mg / kg, 28 jours) diminuait les activités des enzymes telle que la SOD, la CAT et la GST. Des études sur l'activité rénale de la CAT ont été montrés que après une administration orale prolongée (2 mois) à une dose de 5 mg / kg de CdCl₂ pendant 4 semaines diminué l'activité enzymatique environ 60% (Renugadevi et Prabu, 2010). Des effets similaires sur l'état oxydatif sanguin ont été observés après une exposition prolongée au Cd (1 mg / kg, 21 jours) (Ashour et El-Shemi, 2014). Ainsi que l'administration orale de Cd (40 mg / L, eau potable, 30 jours) a révélée des diminutions significatives dans l'activité de SOD et de CAT dans le sérum des rats (El-Boshy *et al.*, 2015). D'autres recherches à suggérés que des intoxications au Cd ont induit des effets similaires : une injection *i.p.* de CdCl₂ (6,5 mg kg) pendant 5 jours et une injection *sc.* de Cd (1,2 mg Cd / kg) 5 fois par semaine pendant 9 semaines ont entraîné une diminution significative des activités de SOD et CAT rénales (Morales *et al.*, 2006; Dkhil *et al.*, 2014). Une exposition orale au Cd dans l'eau potable (250 mg / L) pendant 10 et 30 jours a diminué significativement l'activité de la SOD rénale, ainsi que la CAT avec une diminution progressives (Casalino *et al.*, 2002). L'intoxication aiguë au Cd inhibe généralement l'activité des enzymes antioxydants SOD et CAT. Plusieurs études ont montré qu'une exposition prolongée au Cd diminue l'activité des

enzymes antioxydants, en particulier dans les reins, en raison de l'effet du Cd sur l'expression des gènes (Jurczuk *et al.*, 2004 ; Wätjen et Beyersmann, 2004).

La néphrotoxicité induite par le Cd est représentée par le complexe Cd- MT, qui est synthétisé dans le foie, libéré dans la circulation, et repris par les cellules rénales des tubules proximales (Dudley *et al.*, 1985). En fait lorsque la synthèse de la MT devient insuffisante pour lier tous les ions de Cd dans le foie, le Cd non-lié à La MT produit une lésion hépatocytaire et un complexe Cd-MT est libéré dans la circulation sanguine. Le complexe dans le plasma est ensuite filtré à travers les glomérules dans le rein et repris par les cellules tubulaires proximales (Nordberg *et al.*, 1975; Chan *et al.*, 1993 ; Sudo *et al.*, 1996). Des études menées sur des mammifères ont révélé une atteinte rénale, associée à la libération du complexe Cd-Mt dans la circulation périphérique, après la saturation du foie. En passant par les reins, ce complexe provoque des lésions, principalement dans la région corticale, atteignant le tubule proximal et causant une perte progressive de la fonction de l'organe (Dorian et Klaassen, 1995).

L'élévation de l'activité rénale de la MPO peut indiquer la présence d'un grand fonctionnement des leucocytes nucléaires polymorphes (PNL) dans le tissu enflammé. Les neutrophiles ont un rôle dans la lésion oxydative via plusieurs mécanismes tels que l'action de NADPH oxydase ou la MPO (Wangsiripaisan *et al.*, 1999). L'acide hypochloreux est produit en grande partie à partir des neutrophiles stimulés via l'intervention du MPO qui catalyse la production HOCl. D'autre part, L'acide hypochloreux en tant que un facteur de risque secondaire, il va oxydé d'autres molécules, y compris les protéines, les acides aminés, les glucides, les acides nucléiques et les lipides (Arnhold *et al.*, 2001). Il existe une évidence accrue que le NO est un puissant modulateur et médiateur de la communication paracrine (un mode de signalisation cellulaire impliquant des messagers chimiques qui agissent dans le voisinage de la cellule qui les a synthétisés.) qui contrôle les fonctions rénales, comme le débit sanguin rénal global et régional, l'auto-régulation rénale, la filtration glomérulaire, la sécrétion de rénine et l'excrétion des électrolytes (Cowley *et al.*, 2003 ; Ghasemi *et al.*, 2015).

Le NO joue également un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs états pathologiques rénaux, tels que la néphropathie diabétique, la glomérulopathie inflammatoire, l'insuffisance rénale aiguë et l'hypernéphrotoxicité des médicaments et métaux (Cowley *et al.*, 2003 ; Ghasemi *et al.*, 2015). L'oxyde nitrique réagit avec les anions superoxydes et produit des radicaux peroxy-nitrite qui causent d'autres dommages cellulaires et augmente l'état de stress oxydatif dans les reins. Des études expérimentales ont confirmé le rôle de la production des

ROS, c'est-à-dire la synthèse excessive de NO, à travers un stress oxydatif induit par le Cd. Plusieurs travaux à montrant que l'injection intra péritonéale de 6,5 mg de CdCl₂ / kg de poids corporel aux rats pendant 5 jours a entraîné des niveaux élevés de NO, qui va réagit avec O₂^{•-} et produit des radicaux peroxynitrite qui contribuent à d'autres dommages oxydatifs dans les cellules (Dkhil *et al.*, 2014). La surexpression de NO peut être attribuée à l'activité de la NOS dans les conditions des réactions inflammatoires déclenchée par le Cd (Othman *et al.*, 2014).

Les résultats de notre étude ont montré que les paramètres biochimiques et histopathologiques étaient en accord les uns avec les autres. L'observation histopathologique chez des rats traités au Cd a montré une nécrose tubulaire, une infiltration cellulaire inflammatoire, une dégénérescence, hémorragie, gonflement des tubules et vacuolisation. Cela pourrait être dû à l'accumulation de radicaux libres comme conséquence de la présence des ions du Cd et aussi à l'augmentation de la peroxydation des lipides par les ions Cd libres dans les tissus rénaux des rats traités au Cd. Notre étude a rapporté que les extrais butanolique *Thymelaea microphylla* réduit de manière significative les changements histologiques induits par le cadmium. L'extrait butanolique contient 257,4 mg / g de polyphénols qui sont de puissants antioxydants. Ces résultats ont confirmé la capacité de EBTM à améliorer ou normaliser la fonction rénale grâce à ses composés bio actifs qui pourraient augmenter l'effet antioxydant et diminuer les niveaux de peroxydes lipidiques en piégeant les radicaux libres. Cette étude a montré que le EBTM est efficace pour prévenir la néphrotoxicité induite par CdCl₂ chez le rat; cela peut être dû à la teneur en polyphénols. La propriété antioxydante et la capacité de EBTM à inhiber la génération de radicaux pourraient réduire davantage la menace oxydative causée par le cadmium, ce qui pourrait diminuer l'utilisation des 'antioxydants endogènes non enzymatiques et augmenter leurs niveaux dans le tissu rénal. Ces résultats indiquent que différents composés de biophénols contenus dans EBTM peuvent avoir différents mécanismes d'action contre la néphrotoxicité induite par le CdCl₂.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6. Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude démontre que *Thymelaea microphylla* a un effet protecteur contre les dommages oxydatifs induits par le Cd dans le rein des rats. Les mécanismes contribuant à son efficacité peuvent être l'effet chélateur des radicaux libres, le pouvoir antioxydant et la capacité de réduire les ions métalliques par *Thymelaea microphylla*. Récemment, beaucoup d'attention a été portée sur les fonctions biochimiques protectrices des antioxydants naturels dans les systèmes biologiques contre les métaux lourds toxiques. Cet effet dû nettement à la richesse de la plante aux composés bioactifs tel que les polyphénols et autres composés comme les terpènes, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Qui peuvent donner d'autres opportunités concernant l'utilisation de cette plante pour soulager les agressions inflammatoires.

Les résultats obtenus nécessitent des études à l'échelle moléculaire par la séparation des différentes molécules de la plante afin de déterminer la molécule responsable de chaque effet et sa relation avec les paramètres testés et l'organe cible.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- A.P.G., (1998).** An ordinal classification for the families of flowering plants, *Ann. Missouri Bot. Gard*, 85, 531-553.
- Abou-Karam, M., El-Shaer, N. S., Shier, W., (1998).** *Phytotherapy Research*, 12(4), 282-284.
- Adriano, D.C., (1986).** Trace elements in the environment. *New York, Springer Verlag*. Pp 155.
- Aebi, H., (1974).** Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, *Academic Press, New York*, 2(2), 673-684.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1999.** Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, GA; (accès 6 juin 2008). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.html>
- Aît Youssef, M., (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. *Ibis Press, Paris*.
- Åkesson, A., Lundh, T., Vahter, M., Bjellerup, P., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., et al., (2005).** Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1627- 1631.
- Akesson, A., Bjellerup, P., Lundh, T., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., Sam-sioe, G., Skerfving, S., Vahter, M., (2006).** Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ Health Perspect Jun*, 114 (6), 830-834.
- Akrout, A., Gonzalez, Alarcon, L., El Jani, H., (2011).** Madrid, Pablo Campra, *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 342-347.
- Amari, N., Bouzouina, M., Berkani, A., Lotmani, B., (2014).** From *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 104-109.
- Amiard, J. C., Cosson, R.P., (1997).** Les métallothionéines. in *Biomarqueurs en écotoxicologie*. (L. Lagadic, T. Caquet, J-C. Amiard et F. Ramade, Eds.), *Masson, Paris*, 53-66.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., (2006).** Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol*, 76, 160-202.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T., (1996).** Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res*, 28, 65-180
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Nordberg, G.F., (2004).** Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake-possibilities for risk reduction. *Biometals*, 17, 543-547.

Aramini, J. M., Hiraoki, T., Ke, Y., Nitta, K., Vogel, H. J., (1995). Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *Journal of biochemistry*, 117, 623-628.

Arnhold, J., Osipov, A.N., Spalteholz, H., Panasenko, O.M., Schiller, J., (2001). Effects of hypochlorous acid on unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radic Biol Med*, 31, 1111-1119.

Ashour, T.H., El-Shemi, A.G., (2014). Caffeic acid phenyl ester prevents cadmium intoxication induced disturbances in erythrocyte indices and blood coagulability, hepatorenal dysfunction and oxidative stress in rats. *Acta Haematol Pol*, 45, 272-278.

Asmuss, M., Mullenders, L. H., Eker, A., Hartwig, A., (2000). Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis*, 21, 2097-2104.

Azza, Z., Oudghiri, M., (2015). *Pharmacognosy Research*, 7(2), 213-216.

B

Bagchi, D.M., Bagchi, E.A., Hassoun, S.J., Stohs, J., (1996). Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in sprague-dawley rats. *Biological Trace Element Research*, 52, 143-154.

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Poujeol, P., Cougnon, M., (2004). Acute study of interaction among cadmium, calcium, and zinc transport along the rat nephron in vivo. *American journal of physiology*, 287, 1067-1075.

Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., Poujeol, P., (2005). Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron*, 99, 105-110.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem*, 45, 4505–4515.

Benhammou, N., Bekkara, F.A., Constard, J.M., (2009). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* (De Noë) and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Adv Food*, 31, 194-201.

Bernard, A., (2004). Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals*, 17, 519–523.

Bernard A. 2008. Cadmium & its adverse effects on human health. *Indian J Med Res*. 128:557–564.

Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. D., (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews*, 1, 11-21.

- Berthet, B., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthelot, Y., Le Hen, A., Mastain, O., Rainbow, P.S., Smith, B.D., (2003).** Response to metals of the polychaete annelid *Hediste diversicolor*, a key species in estuarine and coastal sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 468–478.
- Berthet, B., Mouneyrac Perez, T., Amiard-Triquet, C., (2005).** Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 141 (3), 306–313.
- Bertin, G., and Averbeck, D., (2006).** Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88, 1549-1559.
- Beyersmann, D., and Hechtenberg, S., (1997).** Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 144, 247-261.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., Gluud, C., (2004a).** Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, CD004183.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., Gluud, C., (2004b).** Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and metaanalysis. *Lancet*, 364, 1219-1228.
- Blumberg, J., Block, G., (1994).** The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention
- Bnouham, M., Benalla, W., Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M., Legssyer, A., (2012),** *Journal of Diabetes*, 4(3), 307-313.
- Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maallem, S., Ziyat, A., 2007,** *Pharmazie*, 62(8), 630-632.
- Bonnefont-Rousselot, D., (1994).** Irradiation des membranes cellulaires. *J. Chim. Phys*, 91, 968-983.
- Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A., (1988).** Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae, *J. Ethnopharmacol*, 24, 41-91
- Bossokpi, I.P.L., (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, 133.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., (2013).** *J. Ethnopharmacol*, 148 (2), 395-402.
- Boukef, M.K., (1986).** Traditional medicine and pharmacopoeia. Plants in Tunisian traditional medicine. *Ed. ACCT, Paris*, 355.

Bouquegneau, J.M, Gilles, R., (1979). Osmoregulation and pollution of the aquatic medium. In metabolism and osmoregulation in animals. *Gilles R. Ed, John Wiley and sons, New York*, 563.

Bourdineaud, J. P., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Moreau, J. L., (2006). Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie*, 88, 1787-1792.

Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78: 206-209.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 28: 25-30.

Bruneton, J., (1993). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, *Lavoisier Techniques & Documentation, Paris*.

Bryan, S.E., Hidalgo, H.A., (1976). Nuclear 115 cadmium: uptake and disappearance correlated with cadmium-binding protein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 68, 858-865.

Buchet, J.P., Lauwerys, R., Roels, H., Bernard, A., Bruaux, P., Claeys, F., Ducoffre, G., de Plaen, P., Staessen, J., Amery, A., (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet*, 336, 699–702.

Buchko, G. W., Hess, N. J., Kennedy, M. A., (2000). Cadmium mutagenicity and human nucleotide excision repair protein XPA: CD, EXAFS and (1)H/(15)N-NMR spectroscopic studies on the zinc(II)- and cadmium(II)-associated minimal DNA-binding domain (M98-F219). *Carcinogenesis*, 21, 1051-1057.

C

Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., (1999). Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology*, 132, 85–98.

Cao, F., Zhou, T., Simpson, D., Zhou, Y., Boyer, J., Chen, B., Jin, T., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W., (2007). p53-Dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. *Toxicology and applied pharmacology*, 218, 174-185.

Carlson, L.A., Friberg, L., (1957). The distribution of cadmium in blood after repeated exposure. *Scand J Clin Lab Invest*, 9, 67-70.

- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, L., Landriscina, C., (2000).** Cadmium dependent enzyme activity alteration is not imputable to lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 383, 288-295.
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C., (2002).** Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179, 37-50
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Cerratto, N., Viarengo, A., (2002).** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131, 447-455.
- Chan, H.M., Zhu, L.F., Zhong, R., Grand, D., Goyer, R.A., Cherian, M.G., (1993).** Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 123, 89-96.
- Chang, K.C., Hsu, C.C., Liu, S.H., Su, C.C., Yen, C.C., Lee, M.J., Chen, K.L., Ho, T.J., Hung, D.Z., Wu, C.C., Lu, T.H., Su, Y.C., Chen, Y.W., Huang, C.F., (2013).** Cadmium induces apoptosis in pancreatic b-cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-jun N-terminal kinase activation. *PLoS One*, 2, e54374,
- Chang, W., Shoback, D., (2004).** Extracellular Ca²⁺-sensing receptors--an overview. *Cell calcium*, 35, 183-196.
- Chargui, A., Zekri, S., Jacquillet, G., Rubera, I., Ilie, M., Belaid, A., Durantou, C., Tauc, M., Hofman, P., Poujeol, P., et al., (2011).** Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure. *Toxicol Sci*, 121, 31-42.
- Cherian, M.G., Goyer, R.A., Valberg, L.S., (1978).** Gastrointestinal absorption and organ distribution of oral cadmium chloride and cadmium-metlothioneine in mice. *J Toxicol Environ Health*, 4, 861-868.
- Cheung, A.P.L., Lam, T.H.J., Chan, K.M., (2004).** Regulation of tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions. *Marine Environmental Research*, 58, 389-394.
- Chung, K., Wong, T.Y., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y., (1998).** Tannins and human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 38, 421-464.
- Cinar, M.A.A., Yigit, I., Yalcinkaya, E., Oruc, O., Duru, M., Arslan, M., (2011).** Cadmium induced changes on growth performance, some biochemical parameters and tissue in broilers: Effects of vitamin C and vitamin E. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 923-934.

- Correia, A.D., Lima, G., Costa, M.H., Livingstone, D.R., (2002).** Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea). I: induction of metallothionein and lipid peroxidation. *Biomarkers*, **7**(5), 422–437.
- Cortas, N.K., Wakid, N.W., (1990).** Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, **36**, 1440-1443.
- Cosson, R.P., Amiard, J.C., (1998).** Utilisation des métallothionéines comme biomarqueurs d'exposition aux métaux. In Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier. Paris*, 77-109.
- Cosson, R.P., Amiard, J-C., (2000).** Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F. (Eds). Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Scientific Publs, Inc., Enfiled, UAS, Plymouth, UK, 2000, 79-111.
- Cousins, R.J., (1985).** Absorption, transport and hepatic metabolism of cooper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiology reviews*. **65**: 238-309.
- Cowan, M.M., (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, **12** (4), 564- 582.
- Cowley, A.W., Mori, T., Mattson, D., Zou, A.P., (2003).** Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **284**, 1355-1369.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Edt Blackwell Publishing Ltd*.
- Curtis, D. K., Choudhuri, S., Mc Kim, J.M., Lehman-McKeeman, J.L.D., Kershaw, W.C., (1994).** *In Vitro* and *In Vivo* studies on the degradation of metallothionein. *Environ. Health. Perspect*, **102**, 141-146.

D

- Dabrio, M., Rodriguez, A. R., Bordin, G., Bebianno, M. J., De Ley, M., Sestakova, I., Vasak, M., Nordberg, M., (2002).** Recent developments in quantification methods for metallothionein. *Journal of inorganic biochemistry*, **88**, 123-134.
- Dainiak, N., and Tan, B. J., (1995).** Utility of biological membranes as indicators for radiation exposure: alterations in membrane structure and function over time. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **13** Suppl 1, 142-152.
- Das, K., Debacker, V., Bouquegneau, J. M., (2000).** Metallothioneins in marine mammals. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, **46**, 283-294.

Dianzani, M.U., Ugazio, G., (1978). Lipid peroxydation. In Biochemical mechanisms of liver injury. *Salter T.F Ed. Academic press. London, 669.*

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem, 97, 654-660.*

Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M., Stocker, P., (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome Arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol, 48, 2599-2606.*

Dkhil, M.A., Al-Quraishy, S., Diab, M.M., Othman, M.S., Aref, A.M., Abdel Moneim, A.E., (2014). The potential protective role of *Physalisperuviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol, 74, 98-106.*

Do Pico, G.A., (1995). Toxic gas inhalation. *Curr Opin Pulm Med, 1, 102-108.*

Dohou, N., (2004). Approches floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de *Thymelaea lythroides*. *Thèse Doctorat. Botanique et Substances naturelles, Univ. Ibn Tofaïl, Fac. Sci. Kénitra, 2004, 158.*

Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A., (2004). Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroides* sur trois champignons pathogènes du Riz, *Bull. Soc. Pharm, Bordeaux, 143(1-4), 31-38.*

Dorian, C., Klaassen, C.D., (1995). Protection by zinc-metallothionein (ZnMt) against cadmium metallothionein-induced nephrotoxicity. *Fund Appl Toxicol, 26, 99-106.*

Dudley, R.E., Gammal, L.M., Klaassen, C.D., (1985). Cadmium-induced hepatic and adrenal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol, 77, 414-426.*

Dufresne, J., Cyr, D. G., (1999). Effects of short-term methylmercury exposure on metallothionein mRNA levels in the testis and epididymis of the rat. *Journal of andrology, 20, 769-778.*

Duncan, K. E., Ngu, T. T., Chan, J., Salgado, M. T., Merrifield, M. E., Stillman, M. J., (2006). Peptide folding, metal-binding mechanisms, and binding site structures in metallothioneins. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J), 231, 1488-1499.*

E

Ejnik, J., Robinson, J., Zhu, J., Forsterling, H., Shaw, C. F., Petering, D. H., (2002). Folding pathway of apo-metallothionein induced by Zn²⁺, Cd²⁺ and Co²⁺. *Journal of inorganic biochemistry*, 88, 144-152.

Ejnik, J. W., Munoz, A., DeRose, E., Shaw, C. F., Petering, D. H., (2003). Structural consequences of metallothionein dimerization: solution structure of the isolated Cd⁴⁺-alpha-domain and comparison with the holoprotein dimer. *Biochemistry*, 42, 8403-8410.

El-Boshy, M.E., Risha, E.F., Abdelhamid, F.M., Mubarak, M.S., Hadda, T.B., (2015). Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 29: 104-110.

El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H., (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood haematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol*, 42, 1563-1571.

Ellman, G., (1959). Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, 82, 70 -77.

El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., Hamdy, M.A., (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipidperoxidation in rat tissues. *J. Biochem Mol Toxicol*, 15, 207-214.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1, 529-539.

European Union Risk Assessment Report (accès 6 juin 2008).
Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/cdmetalreport303.pdf

Evtushenko, Z.S., Belcheva, N.N., Lukyanova, O.N., (1986). Cadmium accumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol*, 83, 377-382.

Eybl, V., Kotyzova, D., Leseticky, L., Bludovska, M., Koutensky, J., (2006). The influence of curcumin and manganese complex of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements status in tissues of mice. *J Appl Toxicol*, 26, 207-212.

F

Faurskov, B., Bjerregaard, H. F., (2002). Evidence for cadmium mobilization of intracellular calcium through a divalent cation receptor in renal distal epithelial A6 cells. *Pflugers Arch*, 445, 40-50.

Feng, W., Benz, F. W., Cai, J., Pierce, W. M., Kang, Y. J., (2006). Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 281, 681-687.

Figueiredo-Pereira, M. E., Yakushin, S., and Cohen, G., (1998). Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*, 273, 12703-12709.

Filipic, M., Hei, T. K., (2004). Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutation research*, 546, 81-91.

Filipic, M., Fatur, T., Vudrag, M., (2006). Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Human & experimental toxicology*, 25, 67-77.

Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D., and Timbrell, J. A., (2005). Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol In Vitro*, 19, 481-489.

Fraysse B., Geffard O., Berthet B., Quéau H., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., (2006). Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 144, 286–293.

G

Galan, A., Troyano, A., Vilaboa, N. E., Fernandez, C., de Blas, E., Aller, P., (2001). Modulation of the stress response during apoptosis and necrosis induction in cadmium-treated U-937 human promonocytic cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1538, 38-46.

Galicja-Herbada, D., (2006). Origin and diversification of *Thymelaea* (*Thymelaeaceae*): Inferences from a phylogenetic study based on ITS (rDNA) sequences. *Plant Syst Evol*, 257, 159-187.

Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14, 1237–1243.

Ganguly, S., Taioli, E., Baranski, B., Cohen, B., Toniolo, P., Garte, S. J., (1996). Human metallothionein gene expression determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction as a biomarker of cadmium exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 297-301.

Garcon, G., Leleu, B., Marez, T., Zerimech, F., Mariehaguenoer, J., Furon, D., Shirali, P., (2007). Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and

cadmium on kidney function: usefulness of alpha-glutathione S-transferase. *Sci. Total Environ*, 377, 165-172.

Geffard, A., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., (2002a). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*, 7, 123-137.

Geffard, A., Geffard, O., His, E., Amiard, J-C., (2002b). Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Marine Ecology Progress Series*, 233, 131-142.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J-C., (2005). Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 209-220.

George, S.G., (1972). Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In physiological mechanisms of marine pollutant toxicity. Vernberg, W.B, Calabrese, A, Thurberg, F.P, Vernberg, F.J Ed. *Academic press New York*.

Ghasemi, M., Nematbakhsh, M., Daneshmand, F., Moeini M, Talebi, A., (2015). Role of nitric oxide in kidney and liver (as distanceorgan) function in bilateral renal ischemia-reperfusion: effect of L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Adv Biomed Res*, 4, 233.

Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 213, 282-290.

Gichner, T., Patkova, Z., Szakova, J., Demnerova, K., (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation research*, 559, 49-57.

Gilg, E., (1984). Thymelaeaceae. In: Engler, A., Prantl, K. (eds.), Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil III, Abteilung 6a. *Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig*, 216- 245.

Glaumann, H., Ballard, F.J., (1987). Lysosomes: Their role in protein breakdown. *Academic press, London*.

Gobe, G., Crane, D., (2010). Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol Lett*, 198, 49–55.

Goering, P. L., Fisher, B. R., Kish, C. L., (1993). Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 122, 139-148.

H

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakpoly, W.B., (1974).** Glutathione transferase: a first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249, 7130-7139.
- Haddad, J.J., (2002).** Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*, 14, 879-897.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Aruoma, O.I., (1987).** The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 165, 215-219.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (2006).** Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press, New York (USA)*.
- Hamada, T., Nakano, S., Iwai, S., Tanimoto, A., Ariyoshi, K., Koide, O., (1991).** Pathological study on beagles after long-term oral administration of cadmium. *Toxicol Pathol*, 19, 138–147.
- Hamer, D. H., (1986).** Metallothionein. *Annual review of biochemistry*, 55, 913-951.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard-Triquet, C., El Abed, A., (1997).** Metallothionein-like protein: is It an efficient biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian coast. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 33, 53- 62.
- Hansen, B. H., Romma, S., Garmo, O. A., Pedersen, S. A., Olsvik, P. A., Andersen, R. A., (2007).** Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere*, 67, 2241-2249.
- Hansen, J. M., Zhang, H., Jones, D. P., (2006).** Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free radical biology & medicine*, 40, 138-145.
- Hart, B. A., Potts, R. J., Watkin, R. D., (2001).** Cadmium adaptation in the lung – a double-edged sword? *Toxicology*, 160, 65-70.
- Hartwig, A., (2001).** Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & redox signaling*, 3, 625-634.
- Hassoun, E.A., Stohs, S.J., (1996).** Cadmium induced production of superoxide anion and nitric oxide. DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A1 cell cultures. *Toxicology*, 112, 219-226.
- Haswell-Elkins, M., Satarug, S., O'Rourke, P., Moore, M., Ng, J., McGrath, V., Walmbly, M., (2008).** Striking association between urinary cadmium level and albuminuria among Torres Strait Islander people with diabetes. *Environ Res*, 106, 379–383.

- Hengstler, J. G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H. G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B., Oesch, F., (2003).** Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 24, 63-73.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1, 3-6.
- Hinchman, C.A., Ballatori, N., (1990).** Glutathione-degradating capacities of liver and kidney in different species. *Biochem Pharmacol*, 40, 1131-1135.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., (2002).** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
- Horiguchi, H., Oguma, E., Sasaki, S., Miyamoto, K., Ikeda, Y., Machida, M., Kayama, F., (2004).** Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium-exposed female Japanese farmers. *Toxicol Appl Pharmacol*, 196, 114-123.
- Huang, Y. H., Shih, C. M., Huang, C. J., Lin, C. M., Chou, C. M., Tsai, M. L., Liu, T. P., Chiu, J. F., and Chen, C. T., (2006).** Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry*, 98, 577-589.
- Hunziker, P. E., Kâgi, J. H. R., (1984).** Metallothionein, in Metalloproteins Part 2 : metal proteins with non-redox roles. *P.M. Harrison ed*, 4, 149-181.

I

- Ikeda, M., Ezaki, T., Tsukahara, T., Moriguchi, J., (2004).** Dietary cadmium intake in polluted and no-polluted areas in Japan in the past and in the present. *Int Arch Occup Environ Health*, 77, 277-284.
- Ikediobi, C.O., Badisa, V.L., Ayuk-Takem, L.T., Latinwo, L.M., West, J., (2004).** Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *International journal of molecular medicine* 14, 87-92.
- International cadmium Association.** (accès 6 juin 2008). <http://cadmium.org/>

J

- Jacquillet, G., Barbier, O., Cougnon, M., Tauc, M., Namorado, M.C., Martin, D., Reyes, J.L., Poujeol, P., (2006).** Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, 127-137.

Jahangir, T., Khan, T.H., Prasad, L., Sultana, S., (2005). Alleviation of free radical mediated oxidative and genotoxic effects of cadmium by farnesol in Swiss albino mice. *Redox Report*, 10, 303-310.

Jarup, L., Roggenfelt, A., Elinder, C.G., Nogawa, K., Kjellstrom, T., (1983). Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. *Scand. J. Work, Environ. Health*, 9, 327– 331.

Jarup, L., Persson, B., Elinder, C.G., (1997). Blood cadmium as an indicator of dose in a long-term follow-up of workers previously exposed to cadmium. *Scand. J. Work, Environ. Health*, 23, 31–36.

Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C., Nordberg, G., Vahter, M., (1998). Health effects of cadmium exposure - a review of literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*, 24, 1-52.

Jarup, L., (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant*, 17 (Suppl 2), 35–39.

Jarup, L., (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*, 68, 167-182.

Jarup, L., Akesson, A., (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238, 201–208.

Jin, T., Lu, J., Nordberg, M., (1998). Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein. *Neurotoxicol*, 19(4-5), 529-535.

Jungwirth, A., Paulmichl, M., Lang, F., (1990). Cadmium enhances potassium conductance in cultured renal epithelioid (MDCK) cells. *Kidney Int*, 37(6), 1477-1486.

Jurczuk, M., Brzóška, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Galazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E., (2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol*, 42, 429-438.

K

Kagi, J. H., (1991). Overview of metallothionein. *Methods in enzymology*, 205, 613-626.

Kang, Y. J., (2006). Metallothionein redox cycle and function. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)*, 231, 1459-1467.

Kawano, M., Matsuyama, K., Miyamae, Y., Shinmoto, H., Kchouk, M. E., Morio, T., Shigemori, H., Isoda, H., (2007). *Experimental Dermatology*, 16(12), 977-984.

Kerbab, K., Mekhelfi, T., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Aquino, R., Rastrelli L., (2015). *Natural product research*, 29(7), 671-675

- KheirEldin, A.A., shaheen, A.A., Abd el-gawad H.M., Shehata, N.I., (2008).** Protective effect of taurine and quercetin against renal dysfunction associated with the combined use of gentamicin and diclofenac, *Indian J Biochem Biophys*, 45, 332-340.
- Kiss, T., Osipenko, O. N., (1994).** Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacological reviews*, 46, 245-267.
- Kjellstrom, T., Evrin, P.E., Rahnster, B., (1977).** Dose response analysis of cadmium-induced tubular proteinuria: a study of urinary beta2-microglobulin excretion among workers in a battery factory. *Environ Res*, 13, 303–317.
- Kjellstrom, T., Nordberg, G.F., (1978).** A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environ. Res*, 16, 248–269.
- Kjellström, T., (1992).** Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci Publ*, 118, 301-310.
- Klaassen, C.D., J. L., Choudhuri, S., (1999).** Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Klaassen, C. D., Lehman-McKeeman, L. D., (1989).** Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biological trace element research*, 21, 119-129.
- Kopera, E., Schwerdtle, T., Hartwig, A., Bal, W., (2004).** Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity. *Chemical research in toxicology*, 17, 1452-1458.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C., (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45, 244-249.

L

- Ladjel, S., Gherraf, N., Zellagui, A., Brahim, L., Hameurlaine, S., (2011).** Phytochemical and antibacterial screening of some Algerian Saharan medicinal plants. *Plant Sci Feed*, 1, 179-182.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade F., (1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. *Masson. Paris.* pp 417.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (1998).** Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier. Paris.* pp 320.
- Lauwerys, R., Roels, H., Regniers, M., Buchet, J.P., Bernard, A., Goret, A., (1979).** Significance of cadmium concentration in blood and in urine in workers exposed to cadmium. *Environ. Res*, 20, 375– 391.

Le Floch, E., (1983). Contribution to an ethnobotanical study of the Tunisian Flora. 2 nd Ed. *Tunisian Scientific Publications*. French.

Lee, K.W., Hur, H.J., Lee, C.Y., (2005). Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem*, 53, 1990-1995.

Leland, H. V., Kuwabara, S. J., (1985). Trace metals. In Rand, G. R.T., Petrocelli, S. R., *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 374-415.

Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Rad Biol Med*, 37, 1921-1942.

Leong, L.P., Shui, G., (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76, 69-75.

Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M. J., Canadas, S., and Gonzalez, M. P., (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free radical biology & medicine*, 40, 940-951.

Lu, J., Jin, T., Nordberg, G., Nordberg, M., (2001). Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. *Cell stress & chaperones*, 6, 97- 104.

M

Magder, S., (2006). Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*, 10 (1), 208.

Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., (2012). The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquatic toxicology*, 110-111, 208-213.

Maret, W., (1995). Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochemistry international*, 27, 111-117.

Maret, W., (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.*, 130, 1455S-1458S.

Marklund, S.L., (1985). Pyrogallol autooxidation. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Greenwald, R.A. ed. Boca raton, Fla: CRC Press, 243-247.

Mason, A.Z., Jenkins, K.D., (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. *John Wiley and Sons Ltd., London*, 479–608.

Masters, B. A., Quaife, C. J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L., and Palmiter, R. D., (1994). Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci*, 14, 5844-5857.

Mates, M., (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.

Mathiessen, P., (2000). Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM). *Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Remembrance Avenue, Burhamon- Crouch, Essex CMO 8HA, UK*, 24 p.

Matović, V., Dukić-Ćosić, D., Buha, A., Bulat, Z., (2013). Route, dose and duration of exposure to cadmium-relevance to oxidative stress induction. *Peroxidases: Biochemical Characteristics, Functions and Potential Applications*, 159-175.

Mekhelfi, T., Kerbab, K., Guella, G., Zaiter, L., Benatache, S., Benayache, F., (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of an endemic desert species *Thymelea microphylla* Coss. et Dur. *Pharm Lett*, 6, 152-156.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-839

Misra, U. K., Gawdi, G., Akabani, G., Pizzo, S. V., (2002). Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: the role of intracellular calcium and signal transduction mechanisms. *Cellular signaling*, 14, 327-340.

Moffatt, P., Seguin, C., (1998). Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system. *DNA and cell biology*, 17, 501-510.

Mohamed, M., Abdellatif, M.D., Sabar, A., Elglammal, M.D., (2003). Sodiumfluoride ion and renal function after prolonged sevoflurane or isoflurane anaesthesia. *Eng J Anaesth*, 19, 79-83.

Molitoris, B.A., Marrs, J., (1999). The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med*, 106, 583–592.

Moore, M.N, Viarengo, A., (1987). Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. *Experientia*, 43, 320-329.

Morales, A.I., Vicente-Sanchez, C., Egidio, J., Arevalo, M.A., Lopeznovoa, J.M., (2006). Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol*, 44, 2092-2100.

Mueller, P.W., (1993). Detecting the renal effects of cadmium toxicity. *Clin Chem*, 39,743–745.

Mueller, P.W., Price, R.G., Finn, W.F., (1998). New approaches for detecting thresholds of human nephrotoxicity using cadmium as an example. *Environ Health Perspect*, 106, 227–230.

Murakami, M., Cain, K., Webb, M., (1983). Cadmium-metallothionein-induced nephropathy: a morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration. *Journal of Applied Toxicology*, 3, 237-244.

N

Nagma, M., Nagma, J.A., Jamal, S., Abdur, R., (2012). Protective effect of Rutin against cadmium induced hepatotoxicity in Swiss Albino Mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7, 150-157.

Nair, A.R., Degheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., Cuypers, A., (2013). Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? *Int J MolSci*, 14, 6116-6143.

Navas-Acien, A., Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Muntner, P., Silbergeld, E., Jaar, B., Weaver, V., (2009). Blood cadmium and lead and chronic kidney disease in US adults: a joint analysis. *Am J Epidemiol*, 170, 1156–1164.

Nawrot, T., Plusquin, M., Hogervorst, J., Roels, H. A., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Van Hecke, E., and Staessen, J. A., (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The lancet oncology*, 7, 119-126.

Nielson, K. B., Winge, D. R., (1983). Order of metal binding in metallothionein. *The Journal of biological chemistry*, 258, 13063-13069.

Nielson, K. B., Winge, D. R., (1984). Preferential binding of copper to the beta domain of metallothionein. *The Journal of biological chemistry*, 259, 4941-4946.

Nielson, K. B., Winge, D. R., (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *The Journal of biological chemistry*, 260, 8698-8701.

Nielson, K. B., Atkin, C. L., Winge, D. R., (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *The Journal of biological chemistry*, 260, 5342-5350.

Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P., (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74, 418–425.

Nishiyama, S., Nakamura, K., (1984). Effect of cadmium on plasma aldosterone and serum corticosterone concentrations in male rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 76(3), 420-425.

Nogawa, K., Kido, T., Yamada, Y., Tsuritani, I., Honda, R., Ishizaki, M., Terahata, K., (1984). Alpha 1-microglobulin in urine as an indicator of renal tubular damage caused by environmental cadmium exposure. *Toxicol Lett*, 22.

Nohl, H., Kozlov, A.V., Gille, L., Staniek, K., (2003). Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem. Soc. Trans*, 31, 1308-1311.

Nordberg, G.F., Piscator, M., Nordberg, M., (1971). On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacol Toxicol*, 30, 289-295.

Nordberg, G.F., Goyer, R., Nordberg, M., (1975). Comparative toxicity of cadmium-metallothionein and cadmium chloride on mouse kidney. *Arch Pathol*, 99, 192–197.

Nordberg, G., Kjellström, T., Nordberg, M., (1985). Kinetics and Metabolism, cadmium and health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal. In Vol I: Exposure, Dose and Metabolism. Edited by Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellström, T., Nordberg, G.F., *Boca Raton CRC Press*, 103-178.

Nordberg, G.F., Nordberg, M., (1987). Different binding forms of cadmium--implications for distribution and toxicity. *J UOEH*, 9 Suppl, 153-164.

Nordberg, G.F., (2004). Cadmium and health in the 21st century - historical remarks and trends for the future. *Biometals*, 17: 485-489.

O

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 113, 823-839.

O'Brien, P., Salacinski, H. J., (1998). Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Archives of toxicology*, 72, 690-700.

Oh, S. H., Choi, J. E., Lim, S. C., (2006). Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicology*, 220, 1-12.

Ohta, H., Cherian, M.G., (1991). Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 107, 63– 72.

Ohta, H., Yamauchi, Y., Nakakita, M., Tanaka, H., Asami, S., Seki, Y., Yoshikawa, H., (2000). Relationship between renal dysfunction and bone metabolism disorder in male rats after long-term oral quantitative cadmium administration. *Ind Health*, 38, 339–355.

Okhawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.

Olafson, R.W., Sim, R.G., (1979). An electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins. *Anal Biochem*, 100, 343-351.

Olsson, I.M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., Oskarsson, A., (2002). Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ Health Perspect*, 110, 1185-1190.

Onasaka, S., Kawakami, D., Min, K.O., Tanaka, K., (1987). Induced synthesis of metallothionein by ascorbic acid in mouse liver. *Toxicology*, 43, 251-259

Othman, M.S., Safwat, G., Aboulkhair, M., Abdel Moneim, A.E., (2014). The potential effect of berberine in mercury-induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Food Chem Toxicol*, 69, 175-181.

P

Palade, P., Dettbarn, C., Alderson, B., Volpe, P., (1989). Pharmacologic differentiation between inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release and Ca²⁺ or caffeine-induced Ca²⁺ release from intracellular membrane systems. *Molecular pharmacology*, 36, 673-680.

Palmiter, R.D., (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8428-8430.

Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E., Durnam, D. M., (1992). MT-III, a brainspecific member of the metallothionein gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6333-6337.

Pari, L., Murugavel, P., Sitasawad, S.L., Sandeep Kumar, K., (2007). Cytoprotective and antioxidant role of diallyltetrasulfide on cadmium induced renal injury. An in vivo and in vitro study. *Life Sci*, 80, 650-658.

Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., (2001). Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology*, 163, 93-100

Paschal, D.C., Burt, V., Caudill, S.P., Gunter, E.W., Pirkle, J.L., Sampson, E.J., Miller, D.T., Jackson, R.J., 2000. Exposure of the U.S. population aged 6 years and older to cadmium: 1988–(1994). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 38, 377–383.

Pedersen, S.N., Lundebye, A.K., (1996). Metallothionein and stress protein levels in shore crabs (*Carcinus maenas*) along a trace metal gradient in the Fal estuary (UK). *Marine Environmental Research*, 42 (1–4), 241–246.

Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F., (2004). Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement. *Presses de l'université du Québec*, 462 p.

Perry, H.M., Erlanger, M.W., Perry, E.F., Blotcky, A.J., (1980). Inhibition of cadmium-induced hypertension in rats. *Science of the total environment*, 14(2), 153-166.

Pinel-Alloul, B., Perceval, O., Giguère, A., Couillard, Y., Campbelle, P.G.C., Hare, L., (2004). La métallothionéine : un biomarqueur d'exposition au cadmium pour les invertébrés d'eau douce. In : Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F., Ecotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement. *Presses de l'université du Québec*, 462 p.

Piotrowski, J.K., Trojanowska, B., Wisniewska- Knypl, J.M., Bolanowska, W., (1974). Mercury binding in the kidney and liver of rats repeatedly exposed to mercuric chloride: induction of metallothionein by mercury and cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 27, 11-19.

Potter, D.W., Tran,T., (1993). Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120, 186-192.

Potts, R. J., Bernalov, I. A., Wallace, S. S., Melamed, R. J., Hart, B. A., (2001). Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology*, 161, 25-38.

Potts, R. J., Watkin, R. D., Hart, B. A., (2003). Cadmium exposure down-regulates 8-oxoguanine DNA glycosylase expression in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology*, 184, 189-202.

Predki, P. F., Sarkar, B., (1994). Metal replacement in "zinc finger" and its effect on DNA binding. *Environmental health perspectives*, 102 Suppl 3, 195-198.

Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., (2007). Cell adhesion molecules in chemically induced renal injury. *Pharmacol Ther*, 114, 74–93.

Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Lamar, P.C., Liu, J., Vaidya, V.S., Bonventre, J.V., (2009a). Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238, 306–314.

Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., (2010). Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *Biometals*, 23, 793–809.

Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., (2012). Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions. *JPET*, 343, 2–12.

Q

Quaife, C. J., Findley, S. D., Erickson, J. C., Froelick, G. J., Kelly, E. J., Zambrowicz, B. P., and Palmiter, R. D., (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 33, 7250-7259.

Quig, D., (1998). Cysteine metabolism and metal toxicity. *AlternMed Rev*, 3, 262-270.

R

Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 72, 1439-1452.

Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J., (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol*, 45, 328-336.

Reeves, P.G., Chaney, R.L., (2002). Nutritional status affects the absorption and whole-body and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. *Environ Sci Technol*, 36, 2684-2692.

Reeves, P.G., Chaney, R.L., (2004). Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ Res*, 96, 311-322.

Renugadevi, J., Prabu, S.M., (2009). Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, 256, 128-134.

Renugadevi, J., Prabu, S.M., (2010). Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 62, 471-481.

Rodilla, V., Miles, A.T., Jenner, W., Hawksworth, G.M., (1998). Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction. *Chem Biol Interact*, 115, 71-83.

Rodriguez-Ortega, M.J., Alhama, J., Funes, V., Romero-Ruiz, A., Rodriguez-Ariza, A., Lopez Barea, J., (2002). Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south Spanish littoral. *Environmental and Toxicological Chemistry*, 21, 542-549.

Roesijadi, G., Fellingham, G.W., (1987). Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci*, 44, 680-684.

Roesijadi, G., (1994). Metallothionein induction as a measure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health. Perspect*, 102, 91-96.

Roesijadi, G., (1996). Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113,117-123.

Rose, C.S., Heywood, P.G., Costanzo, R.M., (1992). Olfactory impairment after chronic occupational cadmium exposure. *J Occup Med*, 34, 600-605.

Roy, A., Manna, P., Sil, P.C., (2009). Prophylactic role of taurine on arsenic mediated oxidative renal dysfunction via MAPKs/ NF-kappa B and mitochondria dependent pathways. *Free Radic. Res*, 43, 995–1007.

S

Sabolic, I., Herak-Kramberger, C.M., Brown, D., (2001). Subchronic cadmium treatment affects the abundance and arrangement of cytoskeletal proteins in rat renal proximal tubule cells. *Toxicology*, 165, 205-216.

Sabolic, I., Breljak, D., Skarica, M., Herak-Kramberger, C. M., (2010). Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23, 897–926

Satarug, S., Haswell-Elkins, M.R., Moore, M.R., (2000). Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *Br J Nutr*, 84,791-802.

Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E., Williams, D.J., Moore, M., (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*, 137, 65-83.

Satarug, S., Moore, M. R., (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental health perspectives*, 112, 1099-1103.

Satarug, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Sens, D.A., (2010). Cadmium, environmental exposure and health outcomes. *Environ Health Perspect*, 118, 182-190.

Schutte, R., Nawrot, T.S., Richart, T., Thijs, L., Vanderschueren, D., Kuznetsova, T., Van Hecke, E., Roels, H.A., Staessen, J.A., (2008). Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environ Health Perspect*, 116, 777-783.

Schwartz, D.A., (1987). Acute inhalational injury. *Occup Med*, 2, 297-318.

Schwartz, D.A., Blaski, C.A., (2000). Toxic inhalations. In : Fishman, A.P., Ed. *Pulmonary Diseases and Disorders*, vol 1, pp. 925-940. New-York: Mc Graw-Hill.

Scott, B.J., Bradwell, A.R., (1983). Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel and calcium. *Clin Chem*, 29, 629-633.

Shaikh, Z.A., Vu, T.T., Zaman, K., (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154, 256-263.

Shaw, C. F., Savas, M. M., Petering, D. H., (1991a). Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods in enzymology*, 205, 401-414.

- Shaw, C. F., Petering, D. H., Laib, J. E., Savas, M. M., Melnick, K., (1991b).** In vitro preparation and characterization of aurothioneins. *Methods in enzymology*, 205, 469-475.
- Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C., (2008).** Arjunolic acid attenuates arsenic-induced nephrotoxicity. *Pathophysiology*, 15, 147–156.
- Sprague, J. B., (1985).** Factors that modify toxicity .In Rand, G. M., et Petrocelli, S .R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 124-163.
- Steinebach, O.M, Wolterbeek, B.T., (1992).** Metallothionein biodegradation in rat hepatoma cells: a compartmental analysis aided 35S-radiotracer study. *Bioch. Biophys. Acta*, 1116,155-165.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., (1995).** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine*, 18, 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., (2000).** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 19, 201-213.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., (2001).** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 20, 77-88.
- Sudo, J., Hayashi, T., Kimura, S., Kakuno, K., Terui, J., Takashima, K., et al., (1996).** Mechanism of nephrotoxicity induced by repeated administration of cadmium chloride in rats. *J Toxicol Environ Health*, 48, 333-348.
- Sunitha, S., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., (2001).** Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defense system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, 72, 516-523.
- Surana, S., Kumar, R., (2013).** Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activities of an Isolated Steroids Fraction (USM) of Stem Bark of *Machilusmacrantha* Nees. (Lauraceae). *Journal of The Analgesics*, 1, 33-37.
- Svartengren, M., Elinder, C.G., Friberg, L., Lind, B., (1986).** Distribution and concentration of cadmium in human kidney. *Environ Res*, 39, 1-7
- Szuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kaminska, T., Sniezko, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J., Kandefer-Szerszen, M., (2000).** The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*, 145, 159-171.

T

- Tanimoto, A., Hamada, T., Koide, O., (1993).** Cell death and regeneration of renal proximal tubular cells in rats with subchronic cadmium intoxication. *Toxicol Pathol*, 21,341–352.

Tanimoto, A., Hamada, T., Higashi, K., Sasaguri, Y., (1999). Distribution of cadmium and metallothionein in CdCl₂-exposed rat kidney: relationship with apoptosis and regeneration. *Pathol Int*, 49, 125–132.

Thevenod, F., (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule insights from cadmium. *Nephron Physiol*, 93(4), 87-93.

Trigui, M., Hsouna, A., Tounsi, S., (2013). *J. Industrial Crops and Products*, 41, 150-157.

V

Valavanidis, Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178–189.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 266(1-2), 37-56

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

Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F., (1996). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56, 935– 943.

Vasak, M., (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *In: Riordan, J.F., Vallee, B.L. (Eds.), Methods in Enzymology Metallochemistry B*, 205, 452–458.

Verdugo, M., Ogra, Y., Quiroz, W., (2016). Mechanisms underlying the toxic effects of antimony species in human embryonic kidney cells (HEK-293) and their comparison with arsenic species. *J Toxicol Sci*, 41, 783–792.

Verougstraete, V., Lison, D., Hotz, P., (2002). A systematic review of cytogenetic studies conducted in human populations exposed to cadmium compounds. *Mutation research*, 511, 15-43.

Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N., Orunesu, M., (1981). Accumulation and detoxication of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam: A study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquat. Toxicol*, 4, 147-157.

Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmero, S., Orunesu, M., (1982). Effects of Cu⁺⁺ on nuclear RNA polymerase activities in mussel digestive gland. *Mar. Biol. Lett*, 3, 345-353.

Viarengo, A., (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat Sci*, 1, 295-317.

Viarengo, A., Nott, J.A., (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem Physiol C*, 104, 355-372

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbari, R., (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar Environ Res*, 44, 69-84.

Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *The American journal of physiology*, 277, 1612-1619.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 46, 407-417.

W

Waalkes, M.P., Misra, R.R., (1996). Toxicology of Metals. In: Chang L W, ed. *CRC press*. Boca Raton, FL, 231-244.

Waalkes, M. P., (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutation research*, 533, 107-120.

Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192, 95-117.

Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., Rao, K. M., (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*, 36, 1434-1443.

Wangsiripaisan, A., Gengaro, P.E., Nemenoff, R.A., Ling, H., Edelstein, C.L., Schrier, R.W., (1999). Effect of nitric oxide donors on renal tubular epithelial cell-matrix adhesion. *Kidney Int*, 55, 2281 -2288.

Wardman, P., Candeias, L.P., (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, 145, 523-531.

Wätjen, W., Beyersmann, D., (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals*, 17, 65-78.

Webb, M., (1979). Metallothionein. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. *Webb M (Ed.)*, 195-266, Elsevier, Amsterdam.

Weser, U., Rupp, H., (1979). Physicochemical properties of metalothioneins. In *Webb, M. ed. Topics in environmental health*. The chemistry, biochemistry and biology of cadmium. 2, 267-284.

Wester, R.C., Maibach, H.I., Sedik, L., Melendres, J., DiZio, S., Wade, M., (1992). In vitro percutaneous absorption of cadmium from water and soil into human skin. *Fundam Appl Toxicol*, 19:15.

WHO, (1992). Environmental Health Criteria 134 Cadmium. World Health Organization, Geneva.

World Health organization, (2004). Guidelines for drinking-water quality. Third Ed. Geneva.

World Health Organisation (WHO), (2006). Cadmium: Air Quality Guidelines, 2nd ed. World Health Organisation, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, (Chapter 6.3).

Wu, H.M., Lin-Tan. D.T., Wang, M.L., Huang, H.Y., Wang, H.S., Soong, Y.K., Lin, J.L., (2008). Cadmium level in seminal plasma may affect the pregnancy rate for patients undergoing infertility evaluation and treatment. *Reprod Toxicol*, 25, 481-484.

X

Xiao, W., Liu, Y., Templeton, D.M., (2009). Pleiotropic effects of cadmium in mesangial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238, 315–326.

Y

Yan, H., Carter, C.E., Xu, C., Singh, P.K., Jones, M.M., Johnson, J.E., Dietrich, M.S., (1997). Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. *J Toxicol Environ Health*, 52, 149–168.

Yang, H., Shu, Y., (2015). Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. *Int J Mol Sci*, 16, 1484-1494

Yang, H., Shu, Y., (2015). *University of Maryland at Baltimore, Baltimore City, MD. Unpublished work.*

Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59, 113-122.

Yesilada, E., Kupeli, E., (2002). Berberiscrataegina DC. Root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 237-248.

Yiin, S.J., Lin, T.H., (1998). Effects of metallic antioxidants on cadmium-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Ann Clin Laboratory Sci*, 28, 43-50.

Yiin, S.J., Chern, C.L., Sheu, J.Y., Tseng, W.C., Lin, T.H., (1999). Cadmium-induced renal lipid peroxidation in rats and protection by selenium. *J Toxicol Environ Health*, 57A, 403-413.

Yoshida, M., Ohta, H., Yamauchi, Y., Seki, Y., Sagi, M., Yamazaki, K., Sumi, Y., (1998). Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. *Biol Trace Elem Res*, 63, 167–175.

Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et al., (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*, 58, 1695–1703.

Youngs, H. L., Sundaramoorthy, M., Gold, M. H., (2000). Effects of cadmium on manganese peroxidase competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 1761-1769.

Z

Zaki, M.S., Abd El-Rahman, H., Mohamed, M., Abd El-Magid, S.S., (2013). Some Studies in Barki Sheep Intoxicated with Cadmium. *Life Sci Journal*, 10(1),1202-1205.

Zhang, Y., Vareed, S.K., Nair, M.G., (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 76, 1465-1472.

Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J. Ethnopharmacol*, 58, 45–54.

Le rôle de *Thymelaea microphylla* dans l'amélioration du stress oxydant et du taux de la métallothionéine induits par le cadmium dans le rein chez le rat.

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet protecteur et le pouvoir antioxydant de l'extrait n-butanolique de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis du stress oxydatif et la toxicité rénale induits par le chlorure de cadmium chez des rats Wistar. Tout d'abord, l'effet anti-oxydant de *Thymelaea microphylla* a été évalué *in vitro* avec des dosages des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et des hydroxyles (OH). Ensuite, des rats Wistar ont été soumis à un prétraitement oral avec l'extrait n-butanolique de *Thymelaea microphylla* (BETM) (200 mg / kg) contre la toxicité rénale induite par l'administration orale de chlorure de cadmium CdCl₂ (5 mg / kg) pendant 28 jours, la vitamine E (250 mg / kg) a été utilisée comme standard. L'efficacité de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis de la toxicité rénale a été évaluée par l'estimation biochimique des paramètres de la fonction rénale et de l'activité des enzymes antioxydantes dans le cytosol, des niveaux de la métallothionéine et de modifications histopathologiques. L'effet anti-inflammatoire de *thymelaea microphylla* a été évalué en induisant l'œdème de la patte de rat par la carragénine (1%). *Thymelaea microphylla* a révélé un effet chélateur élevé des radicaux DPPH et OH. De plus, le prétraitement par *Thymelaea microphylla* (200 mg / kg) a empêché les altérations induites par le chlorure de cadmium grâce à un mécanisme protecteur qui comprenait une diminution significative des taux d'urée sanguin, de créatinine, de gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), de potassium, de sodium, de la myéloperoxydase et du NO et des TBARS ainsi que par la restauration des enzymes antioxydantes cytosoliques, des niveaux de la métallothionéine et les structures histopathologiques altérés par le chlorure de cadmium. De plus, *Thymelaea microphylla* a révélé un effet anti-inflammatoire important en réduisant l'œdème de la patte induit par la carragénine. Cette étude a démontré l'effet antioxydant et protecteur de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis du stress oxydatif induit par le chlorure de cadmium et les lésions rénales.

Mots-clés: chlorure de cadmium, rein, stress oxydatif, *Thymelaea microphylla*, métallothionéine

***Thymelaea microphylla* ameliorates oxidative stress and metallothionein level induced by cadmium in rat kidney.**

Abstract

The present investigation was performed to evaluate the protective effect and the antioxidant power of *Thymelaea microphylla* against cadmium chloride induced oxidative stress and renal toxicity in Wistar rats. First, antioxidant and radical scavenging effect of *Thymelaea microphylla* was evaluated *in vitro* with 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl (OH) radicals assays. Then, Wistar rats were subjected to oral pretreatment with n-butanolic extract of *Thymelaea microphylla* (BETM) (200 mg/kg) against the renal toxicity induced by oral administration of cadmium chloride CdCl₂ (5 mg/kg) for 28 days, vitamin E (250 mg/Kg) was used similarly as standard. Efficiency of *Thymelaea microphylla* against the renal toxicity was evaluated in terms of biochemical estimation of renal function parameters, antioxidant enzymes activities, metallothionein levels and histopathological modifications. *Thymelaea microphylla* anti-inflammatory effect was evaluated by carrageenan (1%) induced rat paw edema. *Thymelaea microphylla* revealed a high scavenging ability of DPPH and OH radicals. Also, *Thymelaea microphylla* (200 mg/Kg) pretreatment prevented deteriorative effects caused by cadmium chloride through a protective mechanism that included significant decrease in the levels of Blood Urea Nitrogen, creatinine, gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), potassium, sodium, Myeloperoxidase, Nitric Oxide and Thiobarbituric Acid Reactive Species as well as by restoration of antioxidant enzymes in the cytosol, metallothionein levels and histopathological changes induced by cadmium. Additionally, *Thymelaea microphylla* revealed an important anti-inflammatory effect reducing carrageenan induced paw edema. This study proved the antioxidant and protective effect of *Thymelaea microphylla* against cadmium chloride induced oxidative stress and kidney injury.

Keywords: cadmium chloride, kidney, oxidative stress, *Thymelaea microphylla*, metallothionein

نور *Thymelae microphylla* في تحسين الإجهاد التأكسدي ومستوى الميتالوثيونيين الناجمين عن الكادميوم في كلية الجرذ

ملخص

تم إجراء هذه الدراسة لتقييم التأثير الوقائي و المضاد للأكسدة لنبات *Thymelaea microphylla* تجاه الإجهاد التأكسدي والسمية الكلوية الناجمة عن كلوريد الكادميوم في جرذان ويستار. حيث تم تقييم التأثير المضاد للأكسدة والقدرة على الارتباط بالجزور الحرة *in vitro* بواسطة اختبار DPPH و OH. ثم تم إخضاع الجرذان للمعالجة الفموية بالمستخلص البيتانولي من *Thymelaea microphylla* (BETM) (200 ملغم / كلغ) ضد السمية الكلوية الناجمة عن تناول كلوريد الكادميوم $CdCl_2$ (5 ملغ / كلغ) عن طريق الفم لمدة 28 يوما كما استعمل فيتامين هـ (250 ملغم / كغم) للمقار. تم تقييم كفاءة *Thymelaea microphylla* ضد التسمم الكلوي عن طريق تقييم الوظيفة الكلوية ونشاط الانزيمات المضادة للأكسدة ومستويات الميتالوثيونيين والتغيرات النسيجية. تم تقييم التأثير المضاد للالتهاب تجاه تورم قدم الجرذ الناجم عن حقن الكاراجينين (1%). كشفت النتائج عن قدرة عالية لمستخلص *Thymelaea microphylla* على الارتباط بالجزور الحرة. كما أن المعالجة ب *Thymelaea microphylla* (200 ملغم / كلغ) قد حالت دون حدوث آثار مدمرة ناتجة عن كلوريد الكادميوم من خلال آلية وقائية تضمنت انخفاضا معنويا في مستويات BNU والكرياتينين و GGT و البوتاسيوم والصوديوم و MPO و NO و TBARS وكذلك عن طريق ارتفاع ملحوظ في الانزيمات المضادة للأكسدة في السيتوزول والميتوكوندريا و في مستويات الميتالوثيونيين والتغيرات النسيجية الناجمة عن التعرض لكلوريد الكادميوم. بالإضافة إلى ذلك، أظهر المستخلص البيتانولي *Thymelaea microphylla* تأثير مهم مضاد للالتهابات بالتخفيف من التورم الناتج عن الكاراجينين. أثبتت هذه الدراسة تأثير وقائي و مضاد للأكسدة لنبات *Thymelaea microphylla* ضد الإجهاد التأكسدي والسمية الكلوية الناجمين عن كلوريد الكادميوم.

الكلمات المفتاحية: كلوريد الكادميوم، الكلية، والإجهاد التأكسدي، *Thymelaea microphylla* ، ميتالوثيونيين

Présentée par : LAIB Samira

Soutenue le : 10Mai 2018

Intitulée :

Le rôle de *Thymelaea microphylla* dans l'amélioration du stress oxydant et du taux de la métallothionéine induits par le cadmium dans le rein chez le rat.

Thèse en vue de L'obtention du Diplôme de Doctorat LMD

Résumé

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet protecteur et le pouvoir antioxydant de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis le stress oxydatif et la toxicité rénale induits par le chlorure de cadmium chez des rats Wistar. Tout d'abord, l'effet anti-oxydant de *Thymelaea microphylla* a été évalué in vitro avec des dosages des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) et des hydroxyles (OH). Ensuite, des rats Wistar ont été soumis à un prétraitement oral avec l'extrait n-butanolique de *Thymelaea microphylla* (BETM) (200 mg / kg) contre la toxicité rénale induite par l'administration orale de chlorure de cadmium CdCl_2 (5 mg / kg) pendant 28 jours, la vitamine E (250 mg / kg) a été utilisé comme standard. L'efficacité de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis la toxicité rénale a été évaluée par l'estimation biochimique des paramètres de la fonction rénale, d'activité d'enzymes antioxydantes dans le cytosol, de niveaux de métallothionéine et de modifications histopathologiques. L'effet anti-inflammatoire de *thymelaea microphylla* a été évalué en induisant l'œdème de la patte de rat par la carragénine (1%). *Thymelaea microphylla* a révélé un effet chélateur élevé des radicaux DPPH et OH. De plus, le prétraitement par *Thymelaea microphylla* (200 mg / kg) a empêché les altérations induites par le chlorure de cadmium grâce à un mécanisme protecteur qui comprenait une diminution significative des taux d'urée sanguin, de créatinine, de gamma-glutamyltranspeptidase (GGT), de potassium, de sodium, de myéloperoxydase. Les espèces réactives à l'oxyde et à l'acide thiobarbiturique ainsi que par la restauration des enzymes antioxydantes cytosoliques et mitochondriales, les niveaux de métallothionéine et les structures histopathologiques altérés par le chlorure de cadmium. De plus, *Thymelaea microphylla* a révélé un effet anti-inflammatoire important en réduisant l'œdème de la patte induit par la carragénine. Cette étude a démontré l'effet antioxydant et protecteur de *Thymelaea microphylla* vis-à-vis du stress oxydatif induit par le chlorure de cadmium et les lésions rénales.

Mots-clés: chlorure de cadmium, rein, stress oxydatif, *Thymelaea microphylla*, métallothionéine

Laboratoire de Recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine