République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Science biologique

Option: Toxicologie: Xénobiotiques et Risques Toxicologiques

Thème:

Nanotoxicité hépatique de Fe_3O_4 (NPs.) Chez le lapin (Oryctolagus Cuniculus).

Présenté par:

Zarai Ghozala

Bakhouche Lemya

Devant le jury:

Boukazoula Fatma	MAA	Université de Tébessa	Président
Benamara Amel	MAA	Université de Tébessa	Examinateur
Rouabhi Rachid	Professeur.	Université de Tébessa	Rapporteur

Date de soutenance: 31/05/2016.

Note :……. Mention :……..……

الملخص:

تركز دراستنا التجريبية على تقييم السمية الكبدية والإجهاد التأكسدي الناتج عن أكسيد الحديد (Fe_3O_4) بشكل جزيئات فائقة الدقة (نانوية).

يتم تحديد سمية أكسيد الحديد (Fe_3O_4) على الأرنب من نوع (Oryctolagus Cuniculus) من خلال تعريض الحيوان لأربعة جرعات مختلفة من أكسيد الحديد (Fe_3O_4) (50، 75، 100، 125 مغ/كغ/اليوم) عبر الفم (الجهاز الهضمي) لمدة شهرين.

النتائج التي تحصلنا عليها بينت أن: أكسيد الحديد أدى إلى نقص وزن الكبد وأحدث تغيرات مورفولوجية كتساقط الوبر وتغير لون البول إلى أصفر قاتم ولزج وظهور التهابات جلدية، كما يظهر عليها التوتر والقلق مقارنة بالشاهد.

كما أظهرت النتائج المتحصل عليها وجود تأثيرات سلبية مست كل من المواد الأيضية: الكربوهيدرات، البروتينات، اللبيدات، حيث نلاحظ زيادة معتبرة في نسبة الكربوهيدرات والبروتينات وبالمقابل انخفاض في نسبة اللبيدات (الدهون الكبدية)، والتأثير على النشاطات الإنزيمية للكبد أدت إلى زيادة معتبرة في نسبة MDA وهو مؤشر لانخفاض الدهون.

إذ نلاحظ انخفاض النشاط الإنزيمي: GST،GPx ، CAT وغير إنزيمي: مادة GSH، كما تظهر نتائج تحليل الدم زيادة في نسبة تركيز الإنزيمات: TGP،TGP .

من خلال ما سبق يعتبر أكسيد الحديد (Fe_3O_4) مادة سامة، إذ تختلف درجة سميتها حسب الجرعة المتعرض لها.

الكلمات المفتاحية:

الجزيئات النانوية (NPs)- أكسيد الحديد (Fe_3O_4)- الإجهاد التأكسدي- مضادات الأكسدة- تسمم كبدي--GST-CAT GPx

Abstract

Our Experimental study has been conducted on the assessement of the toxicity of oxide of iron (Fe_3O_4) nanoparticles.

To define (Fe_3o_4) toxicity on the rabbit (oryctolagus cuniculus), we have exposed the animal to four different doses of oxide iron (Fe_3o_4) 50, 75, 100, 125 mg / kg / day, through oral route (digestive system) during a period of two month.

The Obtained results show that iron oxide has caused a hypertrophy of liver of the animal, and many changes in the morphology such as hair loss, urine color and skin inflammations and as it appear stress and anxiety.

Our Results, also, have been indicated including negative effects on metabolite elements such as:

Carbohydrates, proteins, which suffered an increase in the proportion, a decrease in lipids amount has been shown led to a significant increase in MDA production.

Toxic effects of FeO-NPs caused a decrease in GSH level as well as enzymatic activity of: GPx, GST, CAT.

Blood analysis, also, indicates an increase in the amount of transaminases: TGP and TGP.

It is to note that all our results are in dose-dependent relationship.

Key words:

Nanoparticles (NPs), iron oxide, oxidative stress, antyoxidants, liver toxity, GSH, CAT, GPx.

Résumé

Notre étude Expérimentale a porté sur l'évaluation de la toxicité hépatique et le stress oxydatif causé par l'oxyde de fer (Fe_3O_4) particules ultrafines (nanoparticules).

Pour définir la toxicité d'oxyde de fer (Fe_3O_4) sur le lapin (Oryctolagus Cuniculus), en exposant l'animal à quatre doses différentes d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (50, 75, 100, 125 mg/kg/jour) par voie orale (L'appareil digestif) pendant 2 mois.

Les résultats obtenus montrent que : L'oxyde de fer entraîne une diminution de poids du foie, des changements morphologiques : chute de poil, couleur des urines sombre jaune gluant et l'inflammation cutané, stress et anxiété par rapport au témoin.

Les résultats obtenus y compris les effets négatifs aux métabolites : glucides, protéines, lipides, où on constate une augmentation significative de la proportion des glucides, protéines et une diminution de taux des lipides (matières grasses), influençant l'activité enzymatique du foie ont conduit à une augmentation significative de la proportion de MDA (Indicateur de la peroxydation lipidique).

Une diminution de taux de GSH, est observé ainsi que l'activité enzymatique : GPx, GST, CAT et l'augmentation des paramètres non enzymatique: MDA, Le résultats d'analyse de sang montrent également une augmentation des concentrations des transaminases : TGO, TGP.

Grâce à ce qui précède l'oxyde de fer (Fe_3O_4) est une substance toxique, cette toxicité est dose-dépendante.

Mots clés : Nanoparticules (NPs) - oxyde de fer (Fe_3O_4) - stress oxydatif -antioxydants- toxicité hépatique, GSH, CAT, GPx.

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous remercions en premier lieu Dieu de mes avoir donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce travail.

✓ *Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance et notre remerciement aux Professeur* ***ROUABHI Rachid*** *pour avoir encadré ce mémoire. Nous remercions particulièrement a sa disponibilité, sa générosité, ses précieuses orientations, ses encouragements, et ses conseils très précieux, Qu'il me soit Permis de lui exprimer dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect. Merci*

Nous remerciements sincères et respectueux vont également au ***Mme. BENAMARA Amel,*** *pour avoir accepté de consacrer du temps, examiner et juger ce travail, et pour Siéger dans ce jury en y apportant sa compétence et son expertise.*

Nous remercions aussi ***Mme. BOUKAZOULA Fatma*** *pour sa précieuse et d'avoir Accepté de présider le jury de cette soutenance. Tout l'honneur lui en revient.*

Tiens également à remercier vivement et profonds remerciements ***Monsieur Gasmi Salim,*** *et* ***Monsieur Mechri Halim*** *pour leur aide, leurs encouragements, gentillesse, et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer. Pour compléter ce mémoire de fin d'étude.*

Tenons à remercier vivement mes amis ***Chahinaz, Nadjiba, Samira, Ahlem, Aya*** *et* ***Hadje*** *pour ses précieuses orientations.*

Les plus vifs remerciements vont également à :

- Chraiete Ilhem

-Regai Sara

Enfin, j'adresse mes remerciements qui ont toujours fait bien plus que me soutenir et m'encourager. A mes Parent pour tout ce qu'il m'a enseigné, pour la valeur du travail bien fait que j'aitenté de concrétiser dans ce mémoire. A mes Mère pour m'avoir encouragé et écouté à d'innombrables reprises. A mes sœurs et mes frères.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail A tous ceux qui m'ont aide lors de ce travail surtout :

Mes parents qui sont la lumière redoré mon chemin par leur sacrifier pour se réussisse dans ma vie, et de m'avoir élevé dans des bonne conditions et qui aide moi à toutes les années pour ses riches conseils., pour son encouragement

L'encre est exécutée mais les mots n'est pas exécuté :

Merci Ma Belle mère et père et je t'aime

A mon chère sœur

A mes frères

A ma copine de ma vie : Ghozala

A mes très chères amies :

A mes Amis : kawther- salima –Nadia

A tous les enseignants et enseignantes, dont je voue (plus grand respect, avec une dédicace spéciale à mon encadreur.)

A mes collègues de promotion de la classe de 2éme année Master

. xénobiotiques et risque toxicologique

Je souhaite pour vous la santé et le succès.

A mes collègues de travail.

Par LEMYA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail A tous ceux qui m'ont aide lors de ce travail surtout :

Mes parents qui sont la lumière redoré mon chemin par leur sacrifier pour se réussisse dans ma vie, et de m'avoir élevé dans des bonne conditions et qui aide moi à toutes les années pour ses riches conseils, pour son encouragement

L'encre est exécutée mais les mots n'est pas exécuté :

Merci Ma Belle mère et père et je t'aime

A mon chère sœur : Mariem, Manel, Mouna, Sihem, Roua

A mes frères : Tarek et Abdelmouhaimen

A ma copine de ma vie : Lemya

A mes très chères amies :

A mes Amis : hadjer, asma, kawther, ilhem, narimane, mouna, sara, chaima, rayan….

A tous les enseignants et enseignantes, dont je voue (plus grand respect, avec une dédicace spéciale à mon encadreur.)

A mes collègues de promotion de la classe de 2éme année Master xénobiotiques et risque toxicologique

Je souhaite pour vous la santé et le succès.

A mes collègues de travail.

Par Ghozala

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Dédicace

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des symboles

Table de matière

Introduction

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre1:Nanoparticules (NPs.)

I. Les Nanoparticules (NPs.)…….....…..3

1-Définition des nanoparticules (NPs.) ……3

2- Les sources des nanoparticules…….3

2- 1-Sources naturelles……..3

2-2-Sources anthropiques ……3

3. Utilisations des nanoparticules…….4

4. Fabrication des nanoparticules……..5

4.1. Méthode ascendante……...5

4.2. Méthode descendante…….5

5. Classification…….6

5.1. Nanoparticules organiques……...…..6

5.1.1. Système micellaire/lipidique……..6

5.1.2. Nanoparticules à base de polymères……...7

5.1.3. Nanotubes de carbone (CNT) ……..…..7

5.2. Nanoparticules inorganiques ……8

5.2.1. Puits quantiques (Quantum dots [QD])……..9
5.2.2. Oxyde de fer super magnétique (OFM)……..9
5.2.3. Diamant photo luminescent……..10
5.2.4. Sondes Raman……...10
6. Caractéristiques et propriétés des nanoparticules……..……10
6.1. Les fullerènes……10
6.2. Les nanotubes de carbone……11
6.3. Les nanofils…..…… ……..……12
6.4. Les nanomousses de carbone...……...…….....12
6.5. Les puits quantique……...13
6.6. Les dendrimères ……...……13
*Autres nanoparticules……14

II. Les nanoparticules d'oxyde de fer ($Fe_3 O_4$)

1. Généralité...…….....14
2. propriétés physique et chimique…….....15
2.1. propriétés physique…….....15
2.2. propriétés chimique …….....15
3. caractérisation et fabrication d'oxyde de fer ($Fe_3 O_4$) ……..……16
4. Domaine d'utilisation et applications……17
5- Toxicologie d'oxyde de fer…….....18
5.1.Toxicocinétique……18
A. Vois d'exposition ou l'absorption……..19
- ✓ Voie Respiratoire……....19
- ✓ Voie digestif…….……...20
- ✓ Voie cutané…….....20

B .Distribution. …….....21
C. Métabolisme…….....21
D. Elimination ……..……21
5.2. Toxicité d'oxyde de fer…….....23

6. L'hépatotoxicité……..……..24

7- Signes et Les symptômes d' hépatotoxicité et Insuffisance hépatique…….25

Chapitre:2. Stress oxydatif

1. Définition…….27

1.1. Le stress oxydatif ……..27

1.2. Les radicaux libres……...27

2. Types des radicaux libres ……...27

2.1. Radicaux libres de l'oxygène (ROS) ……...27

2.1.1. L'anion super oxyde……..…28

2.1.2. Le radical hydroxyle……..28

2.1.3. Oxygène singulet ……..28

2.1.4. Radical peroxyde H_2O_2……..28

2.2. Radicaux libres nitrogènes……...29

2.2.1 L'oxyde nitrique (•NO ; monoxyde d'azote) ……29

2.2.2. Le péroxynitrite (ONOO-)……..……..29

2.2.3. Le dioxyde d'azote……...……..…30

2.2.4. Autre forme de ROS……...……...30

3. Origine des radicaux libres ……31

4. Conséquences du stress oxydant ……...33

4.1. Peroxydation lipidique ……... 33

4.2 .Oxydation des protéines……...33

4.3.Oxydation des glucides……..34

4.4.Dommage de l'ADN ..……...34

5. Les antioxydants ……....34

5.1. Définition ……34

5.2. Principaux antioxydants ……..…35

5.2.1. Les antioxydants synthétiques……..35

5.2.2. Les antioxydants naturels……..36

6. Système de défense……..36

6.1. Systèmes de défense enzymatique ……..…36
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) ……..…36
6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) ……..…… 37
6.1.3. Catalase (CAT) …….....37
6.1.4. Peroxyredoxines…….....37
6.2. Systèmes de défense non-enzymatique……38
6.2.1. Glutathion et les protéines-thiols……..38
6.2.2. Vitamine C ……38
6.2.3. Vitamine E…….....38
6.2.4. Caroténoïdes …….....39
6.2.5. Coenzyme Q10……..39
6.2.6. Acide urique ……39
6.2.7. Bilirubine …….....40
7. Oligoéléments…….....40

Chapitre 3 : Lapin dans la Recherche scientifique

1. Classification du lapin ……41

2. Caractéristiques générales……...42

3. Alimentation ……...42

4. Description……...43

4.1. Aspect extérieur……43

4.2. Anatomie interne……... ….44

5. Organes sensorielles ……...45

6. Utilisation des lapins……..45

6.1. Substrat pour la toxicologie et l'étude des maladies infectieuses ……45

6.2. Intérêts du lapin pour la recherche scientifique……...45

6.3. Autre utilisation dans le laboratoire…….....46

Partie 2: Etude pratique

I. Matériel et méthode

1. Matériel ……...47

1.1. Matériel biologique……..47

1.2. Matériel chimique……..47

2. Méthodes d'élevage et traitement ……..47

2.1. Description et élevage……..47

2.2. Mesure de poids……48

2.3. Traitement……48

2.4. Sacrifice et prélèvement ……..48

3. Méthodes de dosage ……..……50

3.1. Paramètres métaboliques……..50

3.1.1. Dosage des glucides ……...……50

3.1.2. Dosages des lipides ……...……...50

3.1.3. Extraction et dosage des protéines……...……51

3.2. Paramètres enzymatiques et non enzymatique ……...51

3.2.1. Dosage du glutathion GSH ……..……...51

3.2.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx) ……..52

3.2.3. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) ……..53

3.2.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)……54

3.2.5. Dosage de l'activité Catalase (CAT) ……...……55

3.3.1. Dosage des transaminases sérique (Transaminase Glutamique Oxaloacétique (TGO)

Transaminase Glutamique Pyruvate (TGP))……..…56

4. Etudes statistique. ……..……..……..56

II-Résultats

1. Paramètres physiologies……..……...…….……57

1.1. Action d'oxyde de fer sur le poids du foie chez les lapins traités pendant 2 mois……..….57

- ✓ Action sur le poids du foie……..……..57

2. Paramétrés biochimiques et enzymatiques ……..……58

2.1. Action d'oxyde de fer (NPs.) sur les métabolites chez les lapins traités pendant 2 mois ……..……58

2.1.1. Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des glucides chez les lapins traités pendant 2 mois…….....59

2.1.2. Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des lipides chez les lapins traites Pendant 2 mois …….....60

2.1.3. Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des protéines chez les lapins traités Pendant 2mois ……..…...61

2.1.4. Action d'oxyde de fer (NPs.) Sur les paramètres enzymatiques chez les lapins traités pendant 2 mois ……..……..62

2.1.5.Action d'oxyde de fer sur le teneur de glutathion réduit (GSH) chez les lapins traités pendant 2 mois……...…..……...……..63

2.1.6. Action d'oxyde de fer sur le teneur de Glutathion peroxydase (GPx) chez les lapins traité pendant 2 mois…….....64

2.1.7. Action d'oxyde de fer sur le taux de malondialdéhyde (MDA) hépatique des lapins traités pendant 2 mois……...……..….....65

2.1.8. Action d'oxyde de fer sur l'activité de catalase (CAT) chez les lapins traités pendant 2 mois……..……66

2.1.9. Action d'oxyde de fer sur l'activité enzymatique de glutathion -S-transférase (GST) hépatique des lapins traités pendant 2 mois……..……..……67

3-Effet de traitement par l'oxyde de fer sur l'activité enzymatique des transaminases (TGO et TGP) (UI/L) des lapins……..……...…68

3.1. Activité de TGO (UI/L) ……...……69

3.2. Activité de TGP (UI/L) ……..….70

III-Discussions

1. Effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) sur le poids relatif du foie et les paramètres sanguins :les transaminases (TGO, TGP)……..……...71

2. Effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs) sur les métabolites tissulaires (Glucides, Lipides, Protéines)……...……...……..…….73

3. Effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs) sur les paramètres biochimiques tissulaires (MDA, GSH, GPx, CAT,GST) ……...……..…74

4. Changements comportementaux et morphologiques……..…….77

Conclusion……...……78

Références.

Annexes.

Liste des tableaux

Tableau N°.	Titre	Page
01	Classification du lapin domestique.	41
02	Variation de quelques paramètres métabolites (protéines, glucides et lipides) hépatique des lapins témoins et traités par l'oxyde de fer après 2 mois.	58
03	Variation de teneur non enzymatique de GSH, MDA et l'activité enzymatique de GPX, GST, et CAT hépatique chez les lapins dans les différents lots expérimentaux.	62
04	Variation de transaminases (TGO, TGP) (UI/L) des lapins témoins et traités par l'oxyde de fer après 2 mois de traitement.	68

Liste des figures

Figure N°.	Titre	Page
1	Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques.	3
2	Source et domaine d'utilisation.	4
3	Les deux voies de fabrication des nanoparticules.	5
4	Structure de base des nanoparticules organiques	7
5	Structure de base des nanoparticules inorganiques.	8
6	Représentation schématique d'un fullerène.	11
7	Représentation schématique de nanotubes de carbone. monocouches, multicouche ou contenant d'autres éléments.	12
8	Différentes formes de puits quantiques montrant l'organisation des atomes individuels.	13
9	Tétroxyde de triferCristaux de magnétite.	15
10	Toxicocinitique d'oxyde de fer.	19
11	Les vois d'exposition.	22
12	Les effets toxiques d'oxyde de fer.	24
13	Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction mono électronique de l'oxygène.	27
14	L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	32
15	Mode d'action des principaux systèmes antioxydants.	35
16	structure du β-carotène	39
17	Le lapin de garenne Oryctolagus cuniculus.	41
18	Alimentation du lapin.	43
19	Description externe du lapin.	43
20	L'appareil digestif du lapin.	44

21	*Les solutions de produit (Fe_3O_4).*	*47*
22	*L'élevage du lapin.*	*48*
23	*Schéma récapitulatif du protocole expérimental.*	*49*
24	*Variation des poids du foie (mg) des lapins témoins et traité pendant 2 mois par l'oxyde de fer (P >0,05).*	*57*
25	*Variation de teneur cellulaire en glucide (µg) chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).*	*59*
26	*Variation de teneur cellulaire en lipide (µg) chez les lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,05).*	*60*
27	*Variation de teneur cellulaire en protéine (mg) chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).*	*61*
28	*Variation du taux de GSH (µmol/mg de prot.) dans le foie chez les lapins témoins et traités après 2 mois (P≥0,05).*	*63*
29	*Variation de l'activité de GPx (µmol/min/mg de protéine) dans le foie des lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,001).*	*64*
30	*Variation de la teneur tissulaire en MDA (nmol /mg de protéine) hépatique des lapins témoins et traités par l'oxyde de fer après 2 mois (P≤0,001).*	*65*
31	*Variation d'activité de CAT (µmol/min/mg de protéine) dans le foie chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).*	*66*
32	*Variation de taux de GST (µmol/mg de protéine) dans le foie des lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,05).*	*67*
33	*Variation des transaminases (TGO) (UI/L) hépatique chez les lapins témoins et traités après 2 mois. (P≤0,01).*	*69*
34	*Variation des transaminases (TGP) (UI/L) hépatique chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).*	*70*

Liste des symboles

symboles	Désignation
%	Pourcentage
µl	Micro litre
$^{\bullet}NO$	Monoxide d'azote/ oxide nitrique
$^{\bullet}NO_2$	Dioxide d'azote
A	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acide gras polyinsaturés
Al	Aluminium
ATP	Adénosine triphosphate
B.H.A.	Butylhydroxyanisole
B.H.T.	Butylhydroxytoluéme
BBC	Bleu Brillant de Comassie
BSA	Sérum Albumine bovine
C	Concentration
Ca^{+}	Calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CDNB	1-Chloro2, 4 di nitrobenzène
CDU	Chimie des urines
Cm	Centimètre
CNT	Nanotubes de carbone
C^{o}	Degré Celsius

CO_2	dioxide de charbon
Cu	Cuivre
Dob	Densité optique de blanc
DTNB	Acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique
E	Coefficient d'extinction molaire
EDRF	Endothélium-derived relaxing factor
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ERO	Espèce réactif de l'oxygène
Fe	Fer
Fe^{2+}	Fer ferreux
Fe^{3+}	Fer ferrique
Fe_3O_4	Tétroxyde de tri fer
Fig	Figure
GPx	Glutathion peroxydase
g	Gramme
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion -S-transférase
H_2O	Eau
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Chlore d' hydrogène
HNE	Hydroxynonenal
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
IRM	Imagerie par résonance magnétique
J	Jour

KCal	*Kilo Calorie*
Kg	*kilogramme*
L	*Litre*
MDA	*Malondialdéhyde*
Mg	*Milligramme*
Ml	*Millilitre*
Mn	*Manganèse*
N	*Nombre des échantillons*
NaCl	*Chlore de potassium*
NADH	*Nicotinamide adénine dinucléotide réduit*
NADPH	*Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit*
Ni	*Nickel*
nm	*Nanomètre*
NO_2	*dioxyde d'azote*
NPs	*Nanoparticules*
O_2	*Dioxygène*
O_2•-	*Anion superoxyde*
O_3	*Ozone*
OFM	*Oxyde de fer super magnétique*
OH	*Hydroxyl*
ONOO-	*Péroxynitrite*
P	*Seuil de signification*
P	*Teneur en protéines*
P450	*Cytochrome*

PEG	*Polyéthylène glycol*
PUF	*Particule ultrafine*
QD	*Quantum dots*
ROS	*Radicaux libres de l'oxygène*
SH	*groupement thiol*
SOD	*Super oxide dismutase*
SSA	*Acide sulfosalycilique*
SWNT	*single-walled nanotube*
T	*Temps*
t/min	*Tour/minute*
TCA	*Tri chloro-acétique acide*
TGO	*Transaminase Glutamique Oxaloacétique*
TGP	*Transaminase Glutamique Pyruvate*
TP	*Tampon Phosphate*
UV	*Ultra-violet*
Ve	*Volume de l'extrait enzymatique*
VHI	*Virus de l'immuno déficience humain*
Vt	*Volume total*
X	*Concentration de l'extrait*
Zn	*Zinc*
ΔA	*pente de la droite de régression*
µm	*Micromètre*
ω3	*Omega 3*

Introduction

Les activités humaines ont considérablement accru la libération de diverses molécules dans l'environnement dont certaine se révèlent toxiques, c'est un problème dans le monde vivant **(Aoun et Merghadi, 2013).**

Les nanotechnologies et la nanoscience représentent un développement clé des secteurs des matériaux innovants et des nouvelles productions. Les propriétés nouvelles attachées aux nanomatériaux ont déjà trouvé des applications commerciales. Par exemple les nanoparticules sont utilisées dans les cosmétiques (crèmes solaires), le textile, les céramiques, les industries chimiques et pharmaceutiques (administration des médicaments) **(Rossi, 2006).**

Les nanoparticules peuvent aussi être produites involontairement par des activités humaines comme la combustion à haute température, l'abrasion mécanique ou d'autres procédés industriels.

Les nanoparticules existent aussi dans la nature et nous vivons entourés des nanoparticules **(Borm, 2002).**

Parmi les nanoparticules on trouve l'oxyde de fer, l'un des composants magnétiques présent partout dans notre environnement. Des nombreuses études dans différentes conditions expérimentales et chez diverses espèces ont montré que l'oxyde de fer est à la fois un élément toxique, dans quelques doses peut provoquer des effets indésirables, stimule la production des radicaux libre ont génèrent un «stress oxydatif », Parmi les agents qui influencent et réduisent le stress oxydant on peut citer : Les antioxydants comme Vit C, GSH, et Caroténoïde.

En Vu de ces données, dans notre étude nous allons dans un premier temps présenter quelques connaissances acquises sur les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) et leur toxicité sur l'organisme. Nous avons ensuite abordé au second chapitre sur le stress oxydant en particulier la notion des radicaux libre biologiques, les cibles de stress oxydant et le système de défense antioxydant.

La partie expérimentale, est consacrée à étudier les effets de l'exposition au oxyde de fer (NPS) sur le foie des lapins (Oryctolagus Cuniculus), utilisé pour les tests de la toxicité et de la sécurité en recherche, ils sont des animaux alertes et timides qui s'adaptent facilement à

la captivité et caractérisé par une physiologie assemblé à la physiologie humaines **(Gasmi et Torchane ,2014).**

En suite les buts à atteindre :

- La Toxicité hépatique d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs).
- L'effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs) sur le poids relatifs de foie.
- L'effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs) sur les métabolites (Glucides, Lipides, Protéines).
- L'effet d'oxyde de fer(Fe_3O_4) (NPs) sur les paramètres non enzymatiques (MDA, GSH).
- L'effet d'oxyde de fer (Fe_3O_4) (NPs) sur les paramètres enzymatiques (GPx, CAT, GST).
- Etude physiomorphologique (Stress, Comportement, l'état extérieur du corps).

1-Définition des nanoparticules (NPs)

Les nanoparticules (NPs) sont des particules ultrafines (PUF) dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm (milliardième de mètre).

A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines.

La plupart des nanoparticules sont des agrégats de petites molécules ou d'atomes **(Kumar, 2006).**

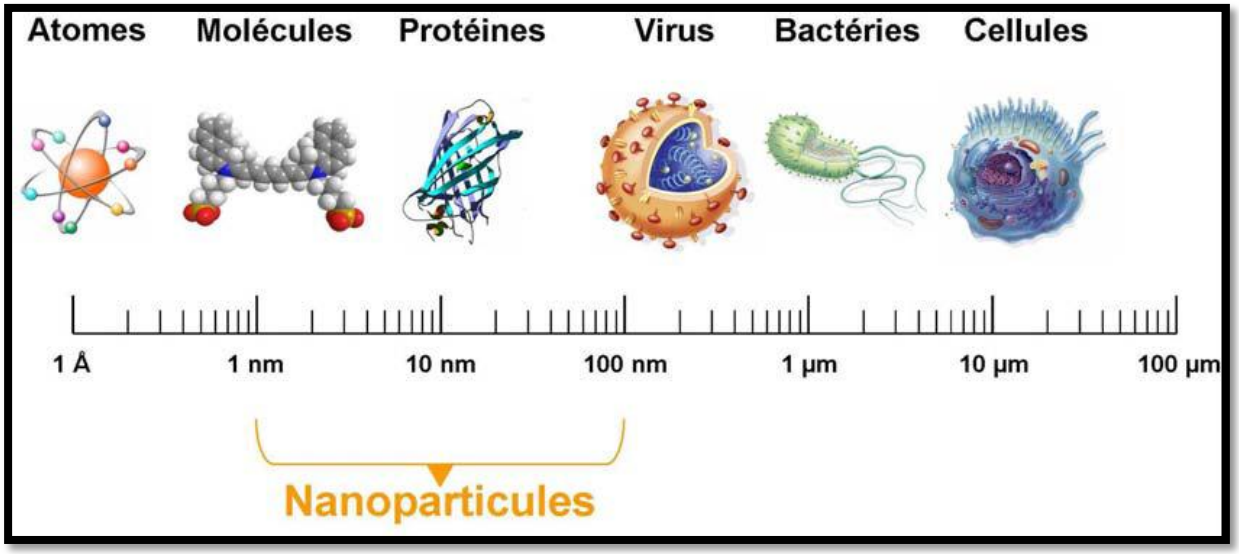


Figure (01) : Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques **(Kumar, 2006).**

2-Sources des nanoparticules

On distingue deux sources des nanoparticules :

2- 1-Sources naturelles

Volcans, aérosols marins, érosion éolienne, feux de forêts, combustion, matières organiques, pollens… **(Orsay et Proust, 2013).**

2-2-Sources anthropiques

(Activités humaines, émissions non volontaires) : fumées industrielles, domestiques (cuisine, four, cuisson, imprimante laser, aspirateur, encens, aérosols…), échappement moteurs diésels, émissions métallurgiques, minoteries, ateliers de soudage, métallurgie (fonderies) **(Orsay et Proust, 2013).**

3. Utilisations des nanoparticules

Les domaines d'usage potentiels des nanotechnologies sont très nombreux :

Les économies d'énergie des véhicules de transport, le développement des énergies renouvelables, la réduction des pollutions, la filtration de l'eau potable, les matériaux de construction, les applications médicales, la cosmétique, la pharmacie, les technologies de traitement de l'information, le renforcement des pneumatiques, l'optique, les textiles, le marquage, les peintures, les encres, etc.

On peut donc s'attendre à un développement rapide de l'usage des nanoparticules dans un grand nombre d'industries, notamment dans l'agro-alimentaire, l'aéronautique, l'automobile, la chimie, la construction, la cosmétique, la défense, l'électronique, la production d'énergie, l'optique, la pharmacie, le textile, etc.

Les plus grandes utilisations industrielles actuelles sont liées à la fabrication des pneumatiques (oxyde de silicium) et pour la formulation des cosmétiques, avec une consommation dépassant 1000 tonnes par ans (principalement d'oxyde de titane).

Les autres usages actuels semblent ne pas dépasser chacun 10 tonnes par an, mais sont promis à une forte croissance **(Fontan et *al*., 2006).**

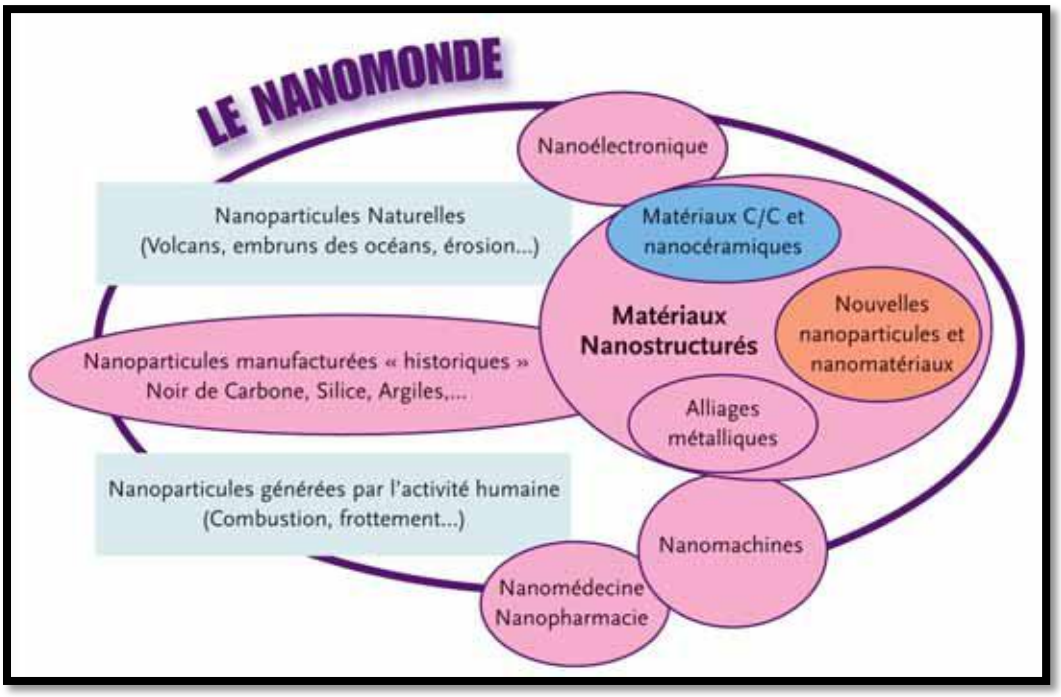


Figure (02) : Source et domaine d'utilisation **(Cohu et *al*., 2009).**

4-Fabrication des nanoparticules

Les nano-objet et nanomatériaux destinées à des usages industriels peuvent être synthétisés selon deux voies différentes (Fig.03).

4-1-Méthode ascendante

Qui consiste à élaborer les nano-objets et nanomatériaux atome par atome, molécule par molécule ou encore agrégat par agrégat.

La structure obtenue est entièrement maitrisée par un assemblage précis.

4-2-Méthode descendants

C'est-à-dire que l'on part d'un objet à l'échelle macro-ou micrométrique que l'on va chercher à miniaturiser **(Wang et Kasper, 1991).**

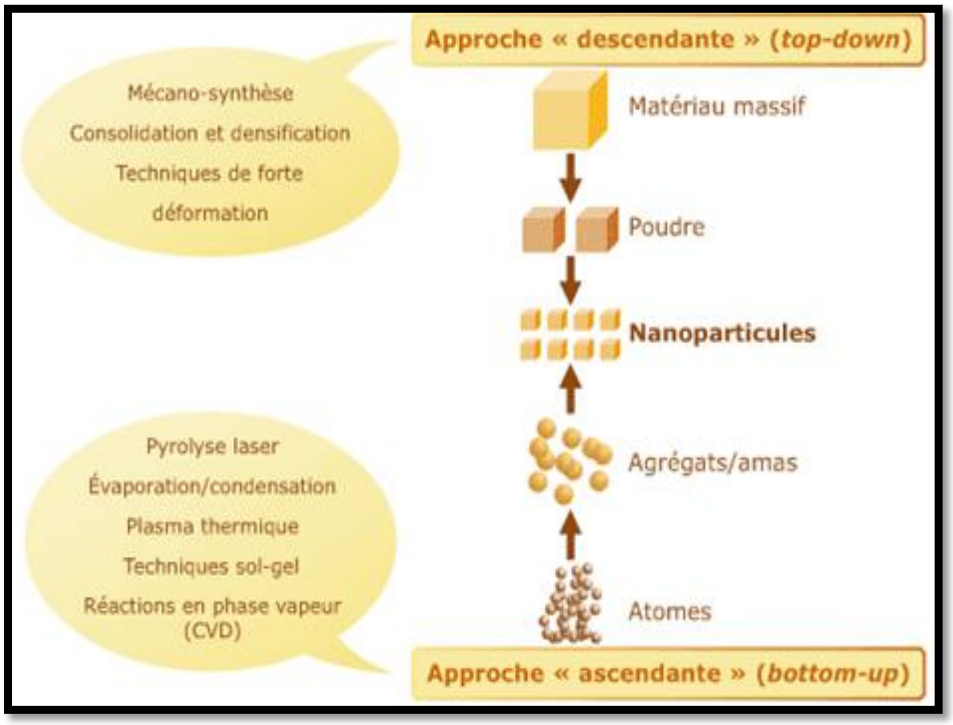


Figure (03) : Les deux voies de fabrication des nanoparticules **(Myriam et Olivier, 2012)**

5-Classification

On peut citez les NPs organiques et les NPs inorganiques

5.1. Nanoparticules organiques

5.1.1. Système micellaire/lipidique

Une micelle est un agrégat sphéroïdal formé par l'autoassemblage d'une monocouche de phospholipides dont la tête polaire est hydrophile et la queue hydrophobe. Lorsqu'ils sont introduits à une certaine concentration (concentration micellaire critique), ces phospholipides vont s'assembler en sphères de petite taille dont le type varie selon la polarité du solvant :

*micelles directes à centre hydrophobe dans de l'eau.

* micelles inverses à centre hydrophile dans un solvant organique tel que l'huile.

*Les micelles sont stabilisées par l'adjonction d'agents tensioactifs ou de certaines macromolécules (lécithine, ovalbumine).

Les liposomes se différencient des micelles par la présence d'une double couche lipidique délimitant un compartiment central hydrophile.

Les micelles et les liposomes sont des NP lipidiques qui permettent le transport de substances hydrophiles ou hydrophobes.

Il est nécessaire que ces objets ne soient pas reconnus par le système immunitaire et notamment que les opsonines ne s'adsorbent pas à leur surface. Pour cela, leur surface peut être protégée par le greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur les phospholipides : cette couche de polymère en surface stabilise les liposomes et retarde considérablement leur destruction par le système réticulo-endothélial (Fig.04).

Une troisième génération de liposomes est en plus recouverte de ligands spécifiques capables de reconnaissance à l'échelle moléculaire, permettant un ciblage actif des cellules cibles. La plupart dutemps, il s'agit d'anticorps spécifiques du tissu cible **(Yezhelyev et *al.*, 2006).**

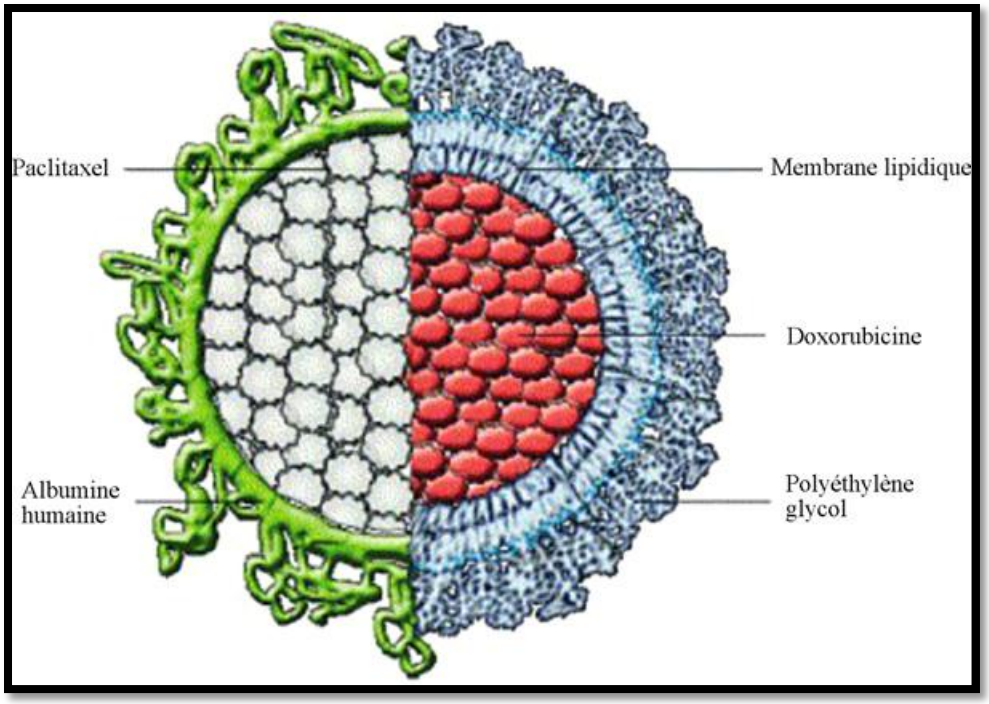


Figure (04) : Structure de base des nanoparticules organiques **(Chuto et *al*., 2010)**

5.1.2. Nanoparticules à base de polymères

Le principe de base est le même que pour les NP lipidiques. L'assemblage en nanosphères de polymères naturels (albumine, héparine) ou synthétiques (poly-L-laclide, PEG) permet le transport de substances. Ces sphères peuvent être recouvertes de molécules ligands assurant un adressage sélectif au niveau des tissus cibles. Ces assemblages permettent de contrôler dans le temps et dans l'espace la libération du principe actif **(Senden et *al*., 1997).**

5.1.3. Les nanotubes de carbone

Ils sont composés soit par une simple paroi de graphène (single-walled nanotube [SWNT]), soit de couches multiples concentriques (multiple-walled nanotube [MWNT]) **(Donaldson et Poland, 2009).**

Il faut noter que les nanotubes n'ont que deux dimensions nanométriques, leur longueur pouvant avoisiner le centimètre actuellement. Ils peuvent être observés en microscopie électronique, en spectroscopie Raman, en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ou en photoluminescence après greffage par liaison covalente ou

simple adsorption de groupements fonctionnels contenant des sondes de fluorescence sur les parois des tubes (ce processus est appelé fonctionnalisation).

Il est nécessaire de modifier leurs propriétés de surface afin de vaincre leur faible solubilité qui est un obstacle à leur utilisation. Outre leurs propriétés physiques intéressantes (très grande dureté, excellente conductivité), les nanotubes peuvent être remplis dans leur cavité par des composés chimiques : une application très connue en médecine nucléaire depuis 1986 est la création de NP de carbone remplies de technétium-99m **(Senden et *al*., 1997).**

5.2. Nanoparticules inorganiques

Elles ont la même structure de base que les NP organiques, avec un noyau aux propriétés fluorescentes, magnétiques ou optiques et une couche protectrice organique en surface. À cette pellicule de surface peuvent être attachées des molécules vectrices (Fig.05) **(Yezhelyev et *al*., 2006).**

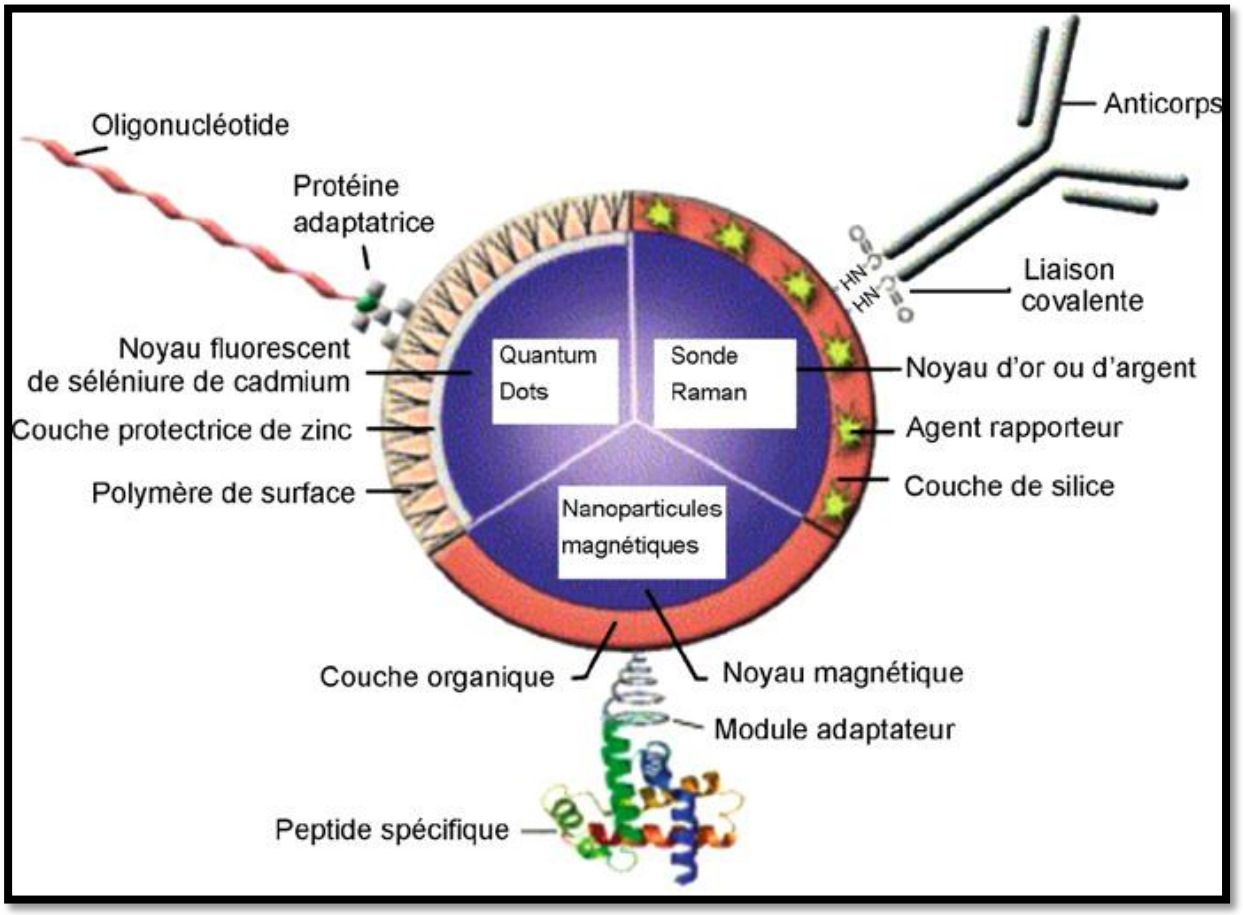


Figure (05) : Structure de base des nanoparticules inorganiques **(Yezhelyev et *al*., 2006).**

5.2.1. Puits quantiques (quantum dots)

Ces NP sont constituées de quelques centaines à quelques milliers d'atomes métalliques formant un nano cristal.

Leurs propriétés électroniques et optiques sont uniques car non présentes dans les molécules constitutives de base, ni dans les cristaux massifs. Pour un type de semi-conducteur donné (par exemple, séléniure de cadmium [CdSe]), les quantum dots (QD) se caractérisent par une émission de fluorescence lors d'excitation par une source lumineuse. La longueur d'onde de cette émission de fluorescence est directement liée à la taille des QD, cette taille étant contrôlable lors de la fabrication. Le spectre d'émission s'étend du proche infrarouge (1500 nm, pénétration de quelques centimètres dans les tissus, permettant quelques utilisations in vivo) aux longueurs d'onde du visible (jusqu'à 400 nm, pénétration d'un à deux millimètres) **(Marchal et *al.*, 2008).**

Les avantages des QD par rapport aux marqueurs fluorescents organiques sont nombreux : grande brillance (meilleur rapport signal/bruit), très grande résistance au photoblanchiment (pas de perte d'émission de fluorescence malgré une excitation prolongée) permettant l'observation pendant plusieurs heures d'une NP unique avec un microscope à fluorescence. Un spectre d'excitation large permet, avec la même longueur d'onde d'excitation, de générer en même temps une émission dans le vert pour des QD de 2 nm et dans le rouge pour ceux de 7 nm. Ces composés sont hydrophobes, et nécessitent l'ajout de ligands de surfaces hydrophiles mais ils peuvent aussi être conservés sous forme aqueuse stable, encapsulés dans des micelles **(Marchal et *al.*, 2008).**

5.2.2. Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et super magnétique

Elles sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif (fer essentiellement, mais aussi cobalt, nickel) et sont utilisées comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Elles sont couvertes d'une couche organique protectrice sur laquelle peuvent être attachées des molécules vectrices. Elles peuvent être encapsulées dans des micelles **(Wang et *al.*, 2008).**

5.2.3. Nanoparticules de diamant photoluminescentes

L'ajout d'une impureté (atome d'azote et/ou de nickel) lors de la production d'un diamant synthétique peut conduire à la formation de centres colorés photoluminescents (exemple : les centres NV, composés d'un atome d'azote et d'une lacune). L'avantage de ces NP est une photoluminescence intense qui est stable dans le temps. Ces structures sont spontanément internalisées dans les cellules par un mécanisme d'endocytose **(Debbage, et Jaschke, 2008).**

2.2.4. Sondes Raman

Formées d'un noyau métallique (or, argent ou bismuth) possédant des propriétés physiques permettant l'étude spectroscopique en imagerie optique, elles sont recouvertes d'une couche de silice **(Debbage et Jaschke, 2008).**

6- Caractéristiques et propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules démontrent des propriétés qui diffèrent des matériaux en vrac desquels ils proviennent. En général, l'intégration de nanoparticules visera la modification de propriétés électriques, mécaniques, magnétiques, optiques ou chimiques. En voici les principales :

6.1. Les fullerènes

Les fullerènes sont des cages sphériques contenant de 28 à plus de 100 atomes de carbone (fig.06). La forme la plus étudiée, synthétisée pour la première fois en 1985**,** contient 60 atomes de carbone **(Holister et *al*., 2003)**, le C_{60} C'est un ballon creux constitué de pentagones et d'hexagones de carbone interreliés, à l'image d'un ballon de soccer. Les fullerènes constituent une classe de matériaux démontrant des propriétés physiques uniques. Ils peuvent être soumis à des pressions extrêmes être trouver leur forme originale lorsque la pression est relâchée **(Gilles, 2006).**

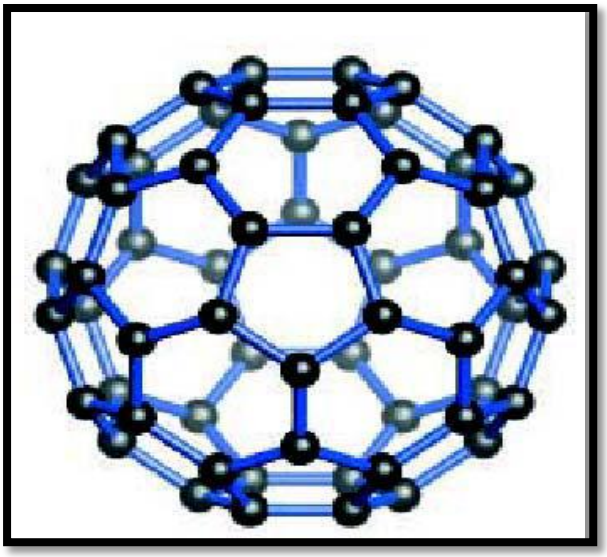


Figure (06): Représentation schématique d'un fullerène **(Gilles, 2006).**

6.2. Les nanotubes de carbone

Découverts depuis à peine plus d'une décennie, les nanotubes de carbone constituent une nouvelle forme de molécules de carbone. Enroulés dans un réseau hexagonal d'atomes de carbone, ces cylindres creux peuvent avoir des diamètres aussi petits que 0,7 nm et atteindre plusieurs millimètres de longueur **(Hett, 2004)**. Chaque bout peut être ouvert ou fermé par une demi-molécule de fullerène (fig.07).

Ces nanotubes peuvent avoir une seule couche (comme une paille) ou plusieurs couches (comme une affiche enroulée dans un tube) de cylindres coaxiaux de diamètres croissants dans un axe commun. Les nanotubes de carbone multicouches peuvent atteindre des diamètres de 20 nm **(Gilles, 2006).**

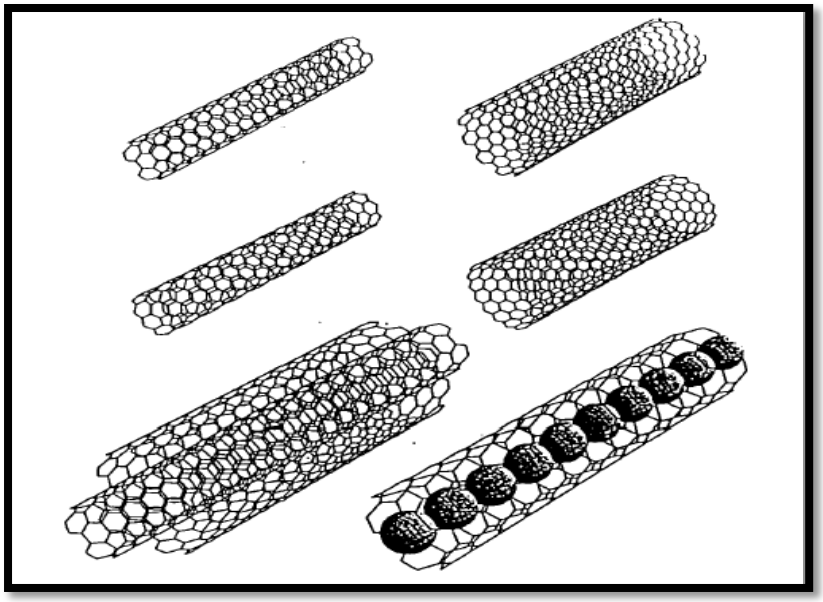


Figure (07) : Représentation schématique de nanotubes de C monocouches, multicouche ou contenant d'autres éléments **(Gilles, 2006).**

6.3. Les nanofils

Les nanofils sont des particules conductrices ou semi-conductrices avec une structure cristalline de quelques dizaines de nm avec un rapport longueur/diamètre élevé. Des nanofils ont déjà été produits à base de silicium, de cobalt, d'or ou de cuivre. Ils sont utilisés pour le transport des électrons en nanoélectronique. Ils pourraient être constitués de différents métaux, oxydes, sulfures et nitrures **(Gilles, 2006).**

6.4. Les nanomousses de carbone

Les nanomousses de carbone constituent le cinquième allotrope connu du carbone, après le graphite, le diamant, les nanofibres de carbone et les fullerènes. Dans la nanomousse de carbone, des îlots d'atomes de carbone, typiquement de 6 à 9 nm, sont inter reliés au hasard pour former une structure solide tridimensionnelle très légère et spongieuse qui peut agir comme semi-conducteur. Les nanomousses de carbone démontrent des propriétés magnétiques temporaires **(Gilles, 2006).**

6.5. Les puits quantiques

Important domaine de recherche depuis cinq ans environ, les puits quantiques (également Appelés nanocristaux ou atomes artificiels) représentent une forme spéciale de nanocristaux sphériques de 1 à 10 nm de diamètre.

Ils ont été élaborés sous forme de semi-conducteurs, d'isolants, de métaux, de matériaux magnétiques ou d'oxydes métalliques. Le nombre d'atomes des puits quantiques, qui peuvent varier de 1 000 à 100 000, en fait ni une structure solide étendue, ni une entité moléculaire **(Aitken et *al*., 2004).** Les principales recherches ont porté sur les puits quantiques semi-conducteurs qui démontrent des effets quantiques distinctifs selon les dimensions. La lumière émise peut être ajustée à la longueur d'onde désirée en modifiant la dimension de l'ensemble **(Aitken et *al*., 2004).**

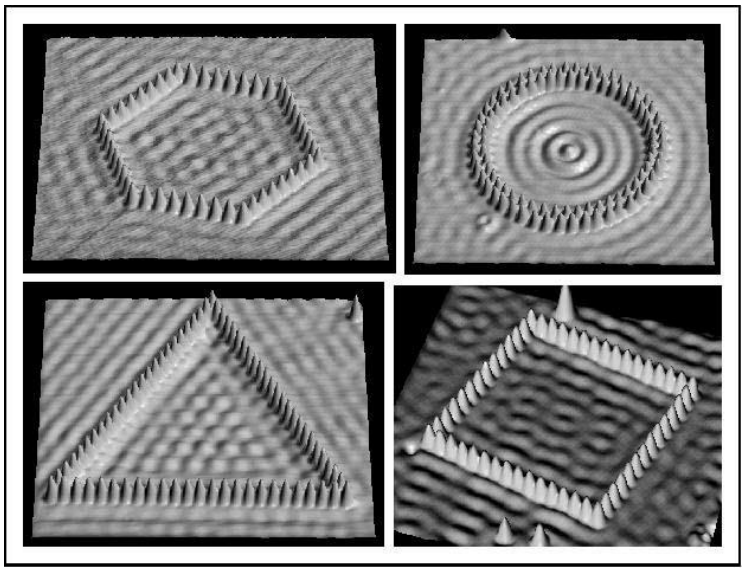


Figure (08) : Différentes formes de puits quantiques montrant l'organisation des atomes individuels **(Gilles, 2006).**

6.6. Les dendrimères

Les dendrimères représentent une nouvelle classe de polymères à structure contrôlée et de dimensions nanométriques. Ils sont considérés comme des éléments de base pour la synthèse à grande échelle de nanostructures organiques et inorganiques avec des dimensions de 1 à 100 nm et démontrant des propriétés uniques. Les dendrimères permettent un contrôle précis, atome par atome, de la synthèse de nanostructures en fonction des dimensions, de la forme et de la chimie de surface désirée. Compte tenu que

les dendrimères peuvent être élaborés afin de montrer des caractéristiques hydrophiles ou hydrophobes, leurs utilisations pourront être très diversifiées. Avec différents groupements réactifs de surface, on envisage notamment s'en servir abondamment dans le domaine médical et biomédical. Compatibles avec les structures organiques telles l'ADN, ils peuvent également être fabriqués de façon à pouvoir interagir avec les nanocristaux métalliques et les nanotubes ou encore posséder une capacité d'encapsulation ou démontrer une fonctionnalité unimoléculaire **(Tomalia, 2004).**

- ***Autres nanoparticules***

Plusieurs nanoparticules ont tendance à s'agglomérer et à former des structures en chaînes ou avec de multiples branchements. Sont normalement regroupés dans cette catégorie les fumées de soudage, les fumées de silice, le noir de carbone et autres nanoparticules qui sont souvent synthétisées par pyrolyse à la flamme.

Ces nanoparticules peuvent inclure des métaux, des oxydes métalliques, des semi-conducteurs, des céramiques et du matériel organique. Ils peuvent également inclure des composites avec, par exemple, un noyau métallique et un recouvrement d'oxyde ou d'alliage**.** Les colloïdes, connus depuis longtemps, sont de dimensions nanométriques. Ces nanoparticules ne seront pas considérées dans la présente étude ascendante **(Aitken et *al.*, 2004).**

II. Les nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3 O_4)

1-Généralité

Parmi les nanoparticules d'oxydes de fer, on distingue les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (appelées SPION) qui possèdent un corps d'oxyde de fer, et enveloppées par des matériaux inorganiques (tels que la silice, l'or) ou des matériaux Synthétiques/naturels (tels que les phospholipides, acides gras, polysaccharides, les polymères naturels). Ces SPIONs sont souvent classés en fonction de leur taille qui inclut le corps d'oxyde de fer et le revêtement /fonctionnalisation, appelé le diamètre hydrodynamique **(Katia et Hocine, 2010).**

Le **tétroxyde de trifer**, souvent incorrectement nommé **oxyde de fer (II, III)** est un composé chimique de formule Fe_3O_4. C'est un oxyde de fer présent dans le milieu naturel sous forme de magnétite, un minéral cristallisé (Fig.09), au laboratoire, il se

présente généralement sous forme d'une poudre. Il contient à la fois des cations ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+}, et sa formule est parfois écrite FeO^{+} Fe_2O_3. Il présente un magnétisme permanent, de nature ferrimagnétique **(Norman et *al.*, 1997).**



Figure (09) : Tétroxyde de trifer Cristaux de magnétite **(Norman et *al.*, 1997).**

2- propriétés physiques et chimique

2-1- propriétés physiques

Fe_3O_4 à une structure spinelle dans laquelle les cations ferreux Fe^{2+} occupent la moitié des sites à coordination octaédrique tandis que les cations ferriques Fe^{3+} sont répartis sur les sites à coordination octaédrique restants ainsi que sur les sites à coordination tétraédrique. Les sous-réseaux d'oxyde de fer (II) Fe O et d'oxyde de fer (III) Fe_2O_3 partagent le même sous-réseau cubique à faces centrées d'anions O^{2-}, ce qui explique la facilité avec laquelle les atomes de fer peuvent changer d'état d'oxydation, dans la mesure où cela n'affecte globalement pas la structure générale du matériau **(Norman et *al.*, 1997)**

Le ferrimagnétisme de l'oxyde de fer(II, III) résulte du couplage du spin des électron d'une part des ions ferreux Fe^{2+} et ferriques Fe^{3+} occupant les sites octaédriques et d'autre part des ions ferriques occupant les sites tétraédriques **(Norman et *al.*, 1997).**
La température de curie de Fe_3O_4 est de 585 °C **(Verwey, 1939).**

Fe_3O_4 est un conducteur électrique à la conductivité un million de fois plus élevée que celle deFe_2O_3, ce qui est attribué aux échanges d'électrons entre centres ferreux et ferriques **(Norman et *al.*, 1997).**

2-2- propriétés chimique

L'oxyde de fer (III) se dissout facilement dans les acides forts tels que l'acide chlorhydrique et l'acide sulfurique. Il se dissout également très bien dans les agents de chélation tels que l'EDTA et l'acide oxalique **(Greedon, 1994).**

Il entre souvent dans la composition des thermites, dont la combustion est très exothermique :

$$2\ Al + Fe_2O_3 \rightarrow 2\ Fe + Al_2O_3$$

Cette réaction est utilisée pour souder de grandes pièces métalliques telles que des rails de voies ferrées en guidant le fer fondu entre les pièces à souder au moyen d'un entonnoir en céramique **(Greedon, 1994).**

Le minerai d'oxyde de fer (III) est la principale source de fer pour l'industrie sidérurgique **(Greedon, 1994).**

3-Caractérisation et fabrication d'oxyde de fer ($Fe_3\ O_4$)

Synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer La voie classique de synthèse de ces NPs est la voie chimique. Des nombreuses méthodes chimiques peuvent être utilisées pour synthétiser des nanoparticules magnétiques: microémulsions, synthèses sol-gel, procédé hydrothermal, hydrolyse et thermolyse de précurseurs.

Le contrôle de la taille, la forme et composition des NPs dépend du type de sels utilisés, du ratio $Fe^{2+/}Fe^{3+,}$ le pH et la force ionique du milieu. Cependant la méthode la plus commune est la coprécipitation de sels de fer. Elle est probablement la plus simple et la plus efficace pour obtenir ces nanoparticules d'oxyde de fer qui sont généralement préparées grâce à un mélange stœchiométrique de sels ferreux et ferrique en milieux aqueux.

La réaction chimique de formation Fe_3O_4 peut être écrite comme suit:

$$Fe_2^{+} + Fe_3^{+} + 8OH^{-} \rightarrow\ Fe_3O_4 + 4H_2O$$

Cependant, avec cette méthode, la distribution de taille des nanoparticules obtenues est trop grande comprise entre 2 et 16 nm donc notre produit n'est pas assez homogène. Il existe aussi une technique dite hydrothermal et à haute température qui se fait aussi en milieu aqueux dans des réacteurs ou autoclaves afin d'augmenter la pression au-delà de=$\mathbf{1{,}4.10^6}$ Pa et d'atteindre une température supérieure à 200°C.

Deux voies sont donc possibles, l'hydrolyse et l'oxydation ou la neutralisation d'un mélange d'hydroxydes métalliques. Ces deux possibilités sont très similaires mis à part que des sels ferreux sont utilisés dans la première **(Hosin, 2011).**

La caractérisation des nanomatériaux et la compréhension de leur comportement est primordiale pour le développement de nouvelles applications et la production de nanomatériaux de façon reproductible et fiable, Il est donc nécessaire de déterminer les caractéristiques des nanomatériaux de manière à pouvoir étudier leur toxicité.

Autrement, les possibles effets toxiques ne peuvent pas être attribués à certaines propriétés du nanomatériau ou au nanomatériau même, à cause de la présence d'impuretés par exemple **(Hosin, 2011).**

4- Domaine d'utilisation et applications

Depuis plus de 30 ans, les secteurs de recherche de nanotechnologie nénesse des développer passant d'un intérêt physique et biologique initialement à des applications cliniques. Cependant, plusieurs de ces particules ayant une application biomédicale sont toujours en phase préclinique ou clinique. Combinés à des médicaments ou gènes, ces NPs peuvent changer la viabilité ou les processus de transcription des cellules, ce qui les rend fortement intéressante pour l'industrie pharmaceutique, la biologie cellulaire et les diagnostics. Elles permettent une nouvelle approche de la recherche et développement d'un médicament puis qu'elles sont capables d'interagir avec les cellules de manière spécifique.

Elles sont utiles en tant qu'outils versatiles pour les diagnostics précoces (notamment utilisées en tant qu'agent de contraste en imagerie IRM), souvent combinés lors des screening de nouvelles molécules.

Elles peuvent également être utilisées en tant que système de délivrance de médicaments qui peut être modifié ou dirigé vers des cellules, tissus, organes spécifiques. Ainsi, les effets secondaires systémiques peuvent être évités (exemple : dans les traitements des tumeurs cancéreuses, les cellules saines seront épargnées).

Ces NPs d'oxydes de fer superparamagnétiques sont capables de se lier aux médicaments, protéines, enzymes, anticorps ou nucléotides et peuvent être dirigés vers un organe, tissu, ou tumeur en utilisant un champ magnétique externe.

Grâce à leur taille, leurs propriétés dépendant de cette taille et cette capacité à être dirigé spécifiquement vers une cible privilégiée, ces matériaux sont des candidats prometteurs pour la recherche, les diagnostics et les applications thérapeutiques dans plusieurs domaines, tels que le cancer, les maladies neuro dégénératives (sclérose en plaque, accident vasculaire cérébral) et les maladies inflammatoires (arthrite rhumatoïde).

Les patients sont donc amenés à être exposés à des produits pharmaceutiques contenant ces NPs. Il est alors important de connaître leur biocompatibilité et d'étudier leur toxicité, notamment cellulaire **(Hofmann et *al*., 2010).**

5- Toxicologie d'oxyde de fer

5-1-Toxicocinétique

Bien que plusieurs modifications de surface aient été effectuées jusqu'à présent pour rendre ces NPs plus biocompatibles, leur potentiel toxique constitue toujours un Souci majeur.

Il a été montré que les causes de la toxicité des NPs peuvent être liées à leurs tailles, formes, propriétés électroniques, optiques et magnétiques (par exemple, étude du potentiel zêta), ainsi que leurs implications dans des réactions catalytiques et oxydatives. (Figure. 10) **(Elsaesser et Howard, 2011).**

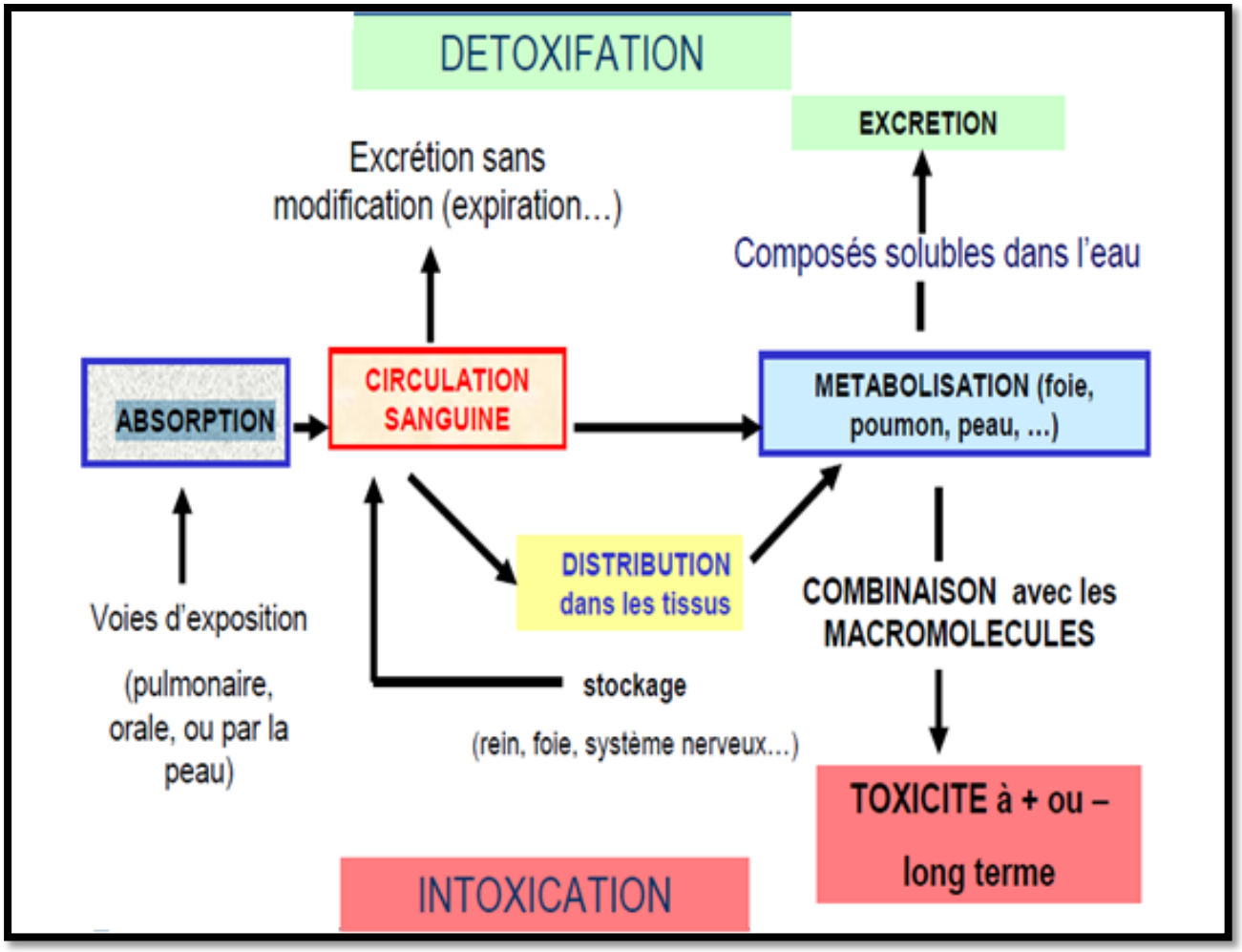


Figure (10) : Toxicocinitique d'oxyde de fer (Elsaesser et Howard, 2011).

A- Vois d'exposition ou l'absorption

- ✓ **Voie Respiratoire**

Par inhalation (sous forme poudre ou bien particule ultra fine ; aérosol, volatile entre par le passage et le changement des gazes au niveau le pomment) (figure.11) **(carles, 2011).** Se fait essentiellement par diffusion **(Witschger et Fabries, 2005).**

La localisation de ce dépôt dépend de la taille, de la forme et de l'état d'agglomération des particules. Ainsi dans le cas de particules sphériques non agglomérées, l'intensité du dépôt en fonction de leur taille a pu être modélisée dans les différentes régions du tractus respiratoire : la région extra-thoracique (incluant la bouche, le nez, le larynx et le pharynx), l'arbre trachéo-bronchique (qui s'étend de la trachée aux bronches) et la région alvéolaire (constituée des bronchioles sterminales et des alvéoles).

D'après ce modèle, les nanoparticules comprises entre 5 et 100 nm de diamètre se déposent essentiellement dans la région alvéolaire. Il est donc tout à fait justifié de travailler avec des nanoparticules supérieur à 5 nm de diamètre lors d'études *in vitro* sur des cellules alvéolaires. Suite au dépôt dans les voies respiratoires, l'organisme peut mettre en œuvre différents mécanismes d'élimination des nanoparticules en fonction de leur localisation mais aussi de leur taille et de leur nature **(Buzea et *al.*, 2007 ; Yang et *al.*, 2007)**. L'escalier mucociliaire est le principal mécanisme mis en jeu pour éliminer les particules des régions extra-thoracique et trachéo-bronchique : le mouvement des cils emmène le mucus contenant les particules piégées jusqu'au pharynx où il sera éliminé dans le tractus intestinal. C'est une élimination rapide. (laplus grande partie en 24h dans la région trachéo-bronchique) en particulier pour les particules ultrafines déposées **(Kreyling et Scheuch, 2000).**

- ✓ **Vois digestif (Le tractus digestif)**

Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines :

- Ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les médicaments
- Eliminées de l'appareil respiratoire par l'escalier mucociliaire.

Peu d'études ont été menées sur ce sujet et montrent que les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale **(Jani et al., 1994 ; Yamago et al., 1995).** Cependant, comme pour la translocation de la barrière alvéolaire, il existe très certainement des différences suivant la nature et la taille des nanoparticules. En effet il a été montré que l'internalisation des nanoparticules par les cellules intestinales dépend de ces deux paramètres **(Hillyer et Albrecht, 2001 ; Win et Feng, 2005).**

- ✓ **voie cutané** contacte par la peau (figure.11) **(carles, 2011).**

L'exposition par voie cutanée est probablement faible en raison du temps de dépôt long des nanoparticules sur les surfaces. Cependant elle ne peut pas être négligée dans le cas de manipulations directes des nanoparticules au poste de travail ou encore lors de l'utilisation de crèmes cutanées contenant des nanoparticules telles que les crèmes solaires.

Du fait de leur taille réduite, les nanoparticules pourraient avoir plus de facilité à passer la barrière cutanée pour atteindre le derme qui est riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques, en nerfs sensitifs et en cellules dendritiques. Cependant la plupart des études

ne montrent pas **(Cross et *al*., 2007 ; Lademann et *al*., 1999)** ou ne montrent une faible pénétration de nanoparticules dans l'épiderme mais sans qu'il ait passage dans le derme lorsque celui-ci est intact **(Alvarez-Román et *al*., 2004).** Ainsi l'épiderme semble être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des nanoparticules mais à condition que celui-ci ne soit pas lésé.

En effet quelques études mettent en évidence une pénétration dans le derme : celle-ci serait imputée à des lésions cutanée ou à une ouverture des follicules pileux et non à une diffusion dans l'épiderme **(Mavon et *al*., 2007 ; Tinkle et *al*., 2003).**

Le passage ou non des nanoparticules par la peau n'apparait donc pas clair et est Probablement dépendant de leurs caractéristiques. De plus, il reste aussi à déterminer, en cas de pénétration, si les nanoparticules restent localisées dans le derme ou s'ils transloquent par le sang ou encore les nerfs sensitifs.

B- Distribution

Une fois absorbé, il est possible que certains NPS transporté se retrouvent dans le sang après avoir franchi les mécanismes de protection respiratoire, cutanée ou digestive et distribué rapidement dans tous les organes (principalement le foie et les reins), donc stockées à l'intérieur.

L'oxyde de fer a aussi la capacité de traverser la barrière placentaire, parce que ultra fine **(Mavon et *al*., 2007).**

C- Métabolisme

La métabolisation de L'oxyde de fer passe par des réactions d'oxydation et de méthylation, jusqu'à obtention de métabolites **(Mavon et *al*., 2007).**

D- Elimination

- excrétion sans modification aves le changement de gaz (respiration).
- La composé soluble dans l'eau donc excrétion urinaire **(Mavon et *al*., 2007).**

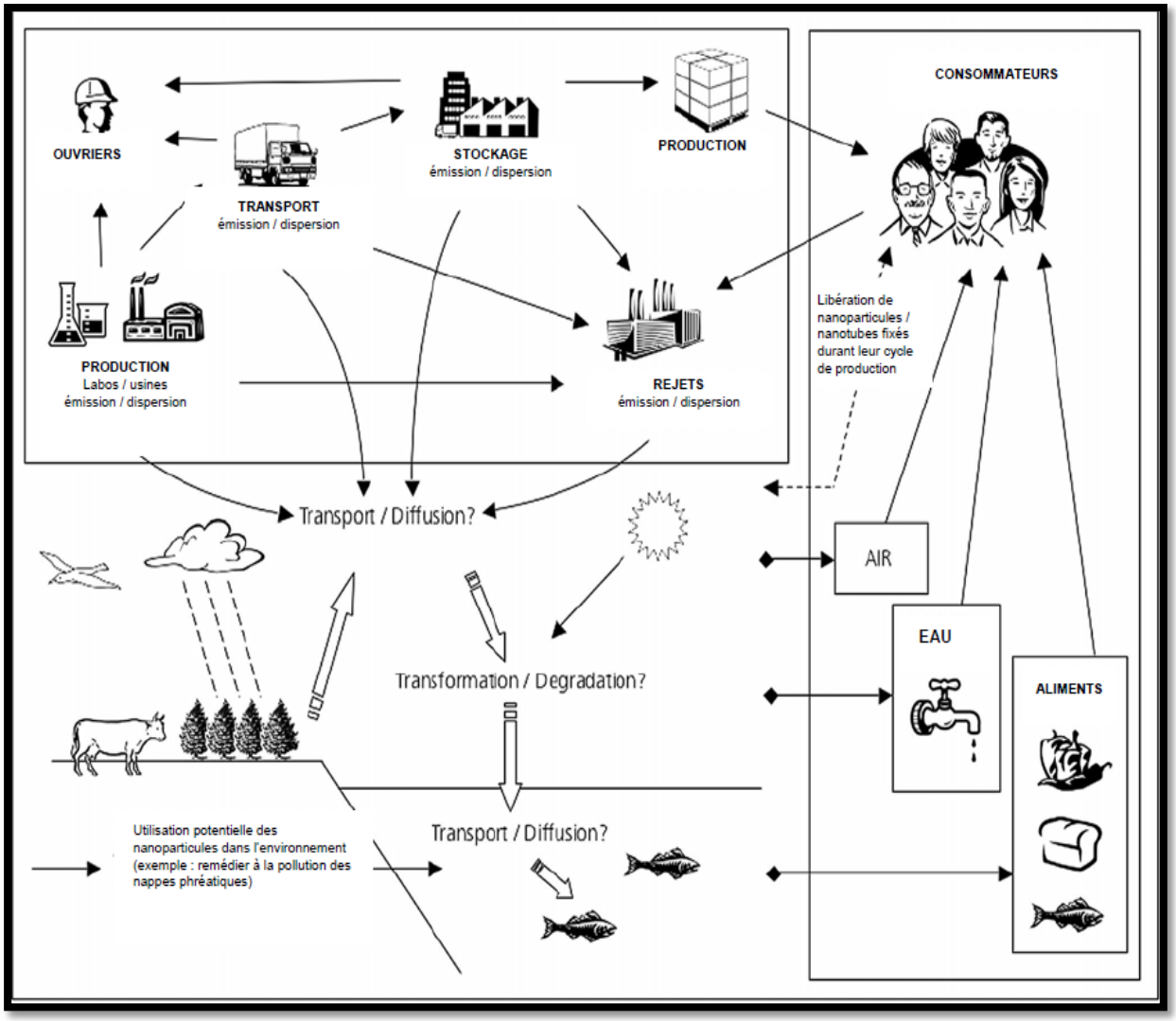


Figure (11) : Les voies d'exposition **(Carles, 2011)**.

5.2. Toxicité d'oxyde de fer

Ne connaissant pas le degré d'exposition de l'homme et l'animal aux nanoparticules d'oxyde de fer, il est difficile de quantifier et de connaître la nature des effets sur la santé humaine. Cependant des effets sont à prévoir si on se fie aux données complémentaires obtenues par les études *in vivo* déjà réalisées et les études épidémiologiques sur l'impact des particules ultrafines de l'air et des aliments sur la santé humaine **(Peters et *al*., 1997).**

Ainsi plusieurs études montrent que de fortes concentrations en particules fines ont un impact à court terme sur l'état de santé en (fig.12) particulier en ce qui concerne les problèmes respiratoires et cardiovasculaires.

L'oxyde de fer phagocyté par une cellule peuvent interagir avec les membranes plasmiques et les organites cellulaires.

Des études à plus long terme montrent que l'exposition à de fortes concentrations en particules fines peut conduire à une réduction de l'espérance de vie **(Brunekreef, 1997 ; Maynard et Maynard, 2002).** Les études *in vivo* permettent de déterminer les effets directs des nanoparticules.

Elles montrent que les nanoparticules peuvent être responsables de pathologies, principalement au niveau des organes directement exposés mais aussi dans tous les autres organes. Cependant, il faut noter que la nature et l'intensité des effets dépendent des caractéristiques des nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4). De plus ces études sont la plupart du temps réalisées avec de fortes concentrations en nanoparticules **(Peters et *al*., 1997).**

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS **(Alberts et *al*., 1983).** Elles peuvent amorcer la production d'espèces réactives de l'oxygène (stress oxydant impliquant des radicaux libre et leurs « effets en cascade ») **(Ostiguy et *al*., 2008).**

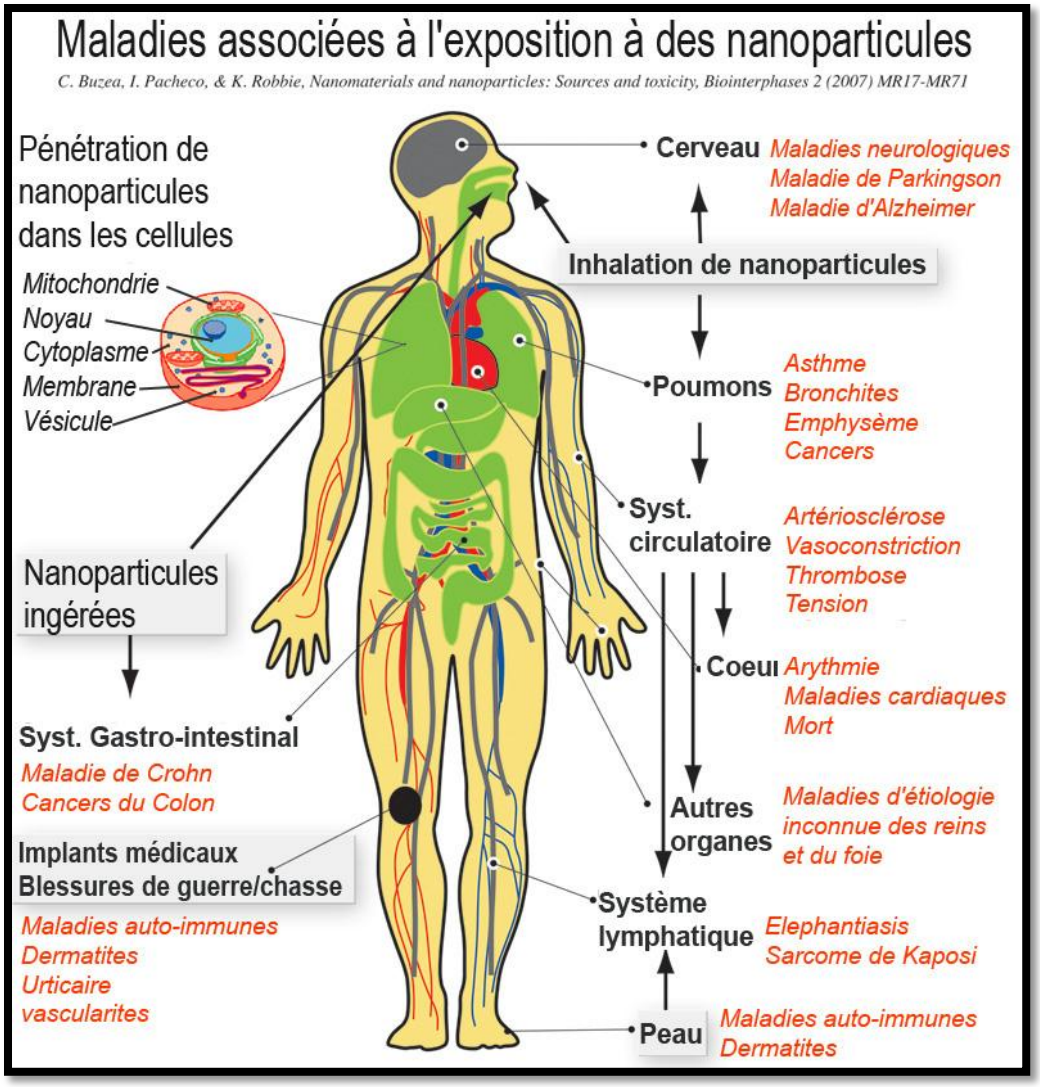


Figure (12) : Les effets toxiques d'oxyde de fer **(Peters *et al.*, 1997).**

6. L'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité : est définie comme le pouvoir qu'a une substance (comme les médicaments) de provoquer des dommages au foie **(Larrey, 2006).**

La toxicité au foie se manifeste sous forme d'inflammation (on parlera d'hépatite) ou encore de nécrose (mort des cellules du foie), dans les cas plus sévères. La stéatose hépatique survient lorsqu'il y a accumulation de gras dans le foie.

Le foie est un organe important car il permet à notre organisme d'éliminer les substances nuisibles auxquelles nous sommes quotidiennement exposées **(Larrey, 2006).**

7. Signes et Les symptômes d' hépatotoxicité et Insuffisance hépatique

Hépatotoxicité est un terme utilisé pour décrire les dommages causés au foie par certains produits chimiques. Commune coupables derrière cette condition est des médicaments d'ordonnance, les drogues récréatives et même certains suppléments à base de plantes et de vitamines. Il est essentiel de comprendre les signes et les symptômes associés à l'hépatotoxicité, comme pas traitée, elle peut entraîner une insuffisance hépatique **(Larrey, 2006).**

Jaunisse est une maladie qui provoque le jaunissement du blanc des yeux (sclérotiques) ainsi que la peau. Il est le résultat d'une accumulation excessive de bilirubine dans le sang. La bilirubine est un produit chimique brun jaunâtre dans la bile, une substance produite par le foie. Comme le foie perd sa capacité à briser efficacement contre ces produits chimiques, qu'ils stockent dans le corps, qui se traduit par un ictère. Le plus sombre le jaunissement, le pire de l'état du foie. Décoloration de l'urine et des matières fécales présence de bilirubine dans les selles est ce qui lui donne sa couleur sombre. Quand elle n'est pas correctement traitée dans le foie, il peut causer des selles à être de couleur pâle. De plus, cette accumulation de l'excès de bilirubine peut être présente dans d'autres liquides biologiques tels que l'urine. Urine de couleur foncée peut être une indication de l'excès de bilirubine, un signe de dommages au foie **(Larrey, 2006).**

Démangeaisons chroniques de la peau Lorsque le foie humain est compromis, un symptôme commun est extrême démangeaisons et des irritations de la peau. On en sait moins sur les raisons de ce phénomène se produit. Certains spéculent qu'il est le résultat de l'incapacité du foie à filtrer les toxines et les irritants communs qui entrent dans le corps humain. Avec nulle part où aller, ces toxines peuvent parfois s'accumuler dans la peau, provoquant des démangeaisons. Gonflement des jambes et /ou de l'abdomen Dans les cas graves d'hépatotoxicité et d'insuffisance hépatique, l'excès de liquide peut s'accumuler dans le corps. Typiquement, ces fluides s'accumulent dans les jambes et provoquer un gonflement, une condition appelée œdème. Ce fluide peut aussi s'accumuler dans l'abdomen, provoquant un gonflement et de la douleur. Lorsque le liquide s'accumule dans l'abdomen, il est connu comme l'ascite. Facile ecchymoses et des saignements Parmi les nombreux emplois le foie est responsable, l'un des plus critiques est la production de protéines qui aident à la coagulation du sang. En

moins de cette protéine est mis à disposition, il devient plus facile pour le corps à devenir meurtri. Saignements de nez fréquents sont souvent un autre symptôme de ce manque de protéines de coagulation **(Larrey, 2006).**

II. Stress oxydatif

1. Définition

1.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydant se définit classiquement comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des ROS (espèce réactif de l'oxygène), en faveur de ces dernières **(Favier, 2003).**

1.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un électron célibataire. Cette propriété les rend aptes à réagir avec des molécules lors de réactions en chaîne. La réactivité des radicaux de l'oxygène ne doit pas non plus être exagérée car elle est très variable selon la nature du radical **(Favier, 1997)**. Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, Fanion radicalaire superoxyde ($0^{2\,\bullet}$) comme le monoxyde d'azote (•NO) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives **(Favier, 2003).**

Les radicaux libres sont des particules très réactives, de dangereux produits du métabolisme qui favorisent, notamment, le processus de vieillissement. Ils attaquent les membranes cellulaires, agressent des protéines essentielles à la vie et détruisent le patrimoine génétique **(Favier, 2003)**.

2. Types des radicaux libres

2.1. Radicaux libres de l'oxygène (ROS)

L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO (fig.13). En présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire) **(Barouki, 2006)**.

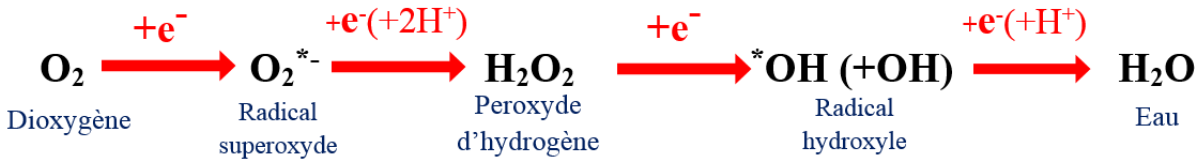


Figure (13) : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction mono électronique de l'oxygène **(Gardès-albertal, 2003).**

2.1.1. L'anion super oxyde

L'anion superoxyde (O_2•-) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante :

•O-O + e^- ⟶ O-O (O_2•-)

Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives **(Pastre, 2005).**

2.1.2. Le radical hydroxyle

Le radical libre hydroxyle (OH) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'anion super oxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple :

- la réaction d'Haber-Weiss :

$O^{2\bullet-} + H^+ + H_2O_2 + Fe^{3+}$ ⟶ HO• $+H_2O + Fe^{2+}$

- la réaction de Fenton :

$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+$ ⟶ $Fe^{3+} + H_2O + HO^{\bullet}$ (Pastre, 2005).

2.1.3. Oxygène singulet

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme active. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion super oxyde selon la réaction suivante :

•O-O• ⟶ $1O^{2.}$ (Sous l'action de la lumière)

2.1.4. Radical peroxyde H_2O_2

Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ROS) même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les réactions suivantes :

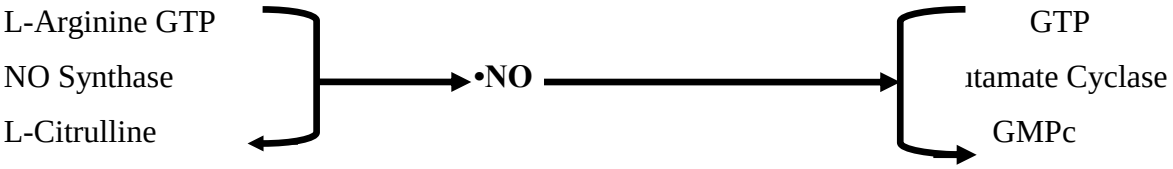
$$O^{2-} + H^+ \rightarrow HO^{-2}$$

$$2HO_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$$ **(Delattre *et al.*, 2003)**

2.2. Radicaux libres nitrogènes

2.2.1 L'oxyde nitrique (•NO ; monoxyde d'azote)

Est un radical libre ubiquitaire synthétisé à partir de l'arginine grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthase, selon le schéma suivant :



Trois types de NO synthase endothélliale constitutive, calcium-dépendante, encore appelée NOS-III. Elle permet la production de •NO dans les vaisseaux sanguins, responsable de leur vasodilatation (le •NO ainsi produit a été identifié comme étant *l'endothélium-derivedrelaxing factor (EDRF).*cette NO synthétase existe aussi dans certain neurones.

-Un NO synthétase inductible (NOS-II), dont l'activité est indépendante de la concentration en calcium et qui peut être induite par différents stimuli, notamment inflammatoire. Elle esten particulier présente dans les macrophages.

-Une NO synthase neuronale constitutive (NOS-I), présent dans les neurones et le bmuscle squelettique.

Le monoxyde d'azote est susceptible de réagir avec d'autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes.

Ainsi est-il capable de réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour donner le peroxynitrite $ONOO^{—}$ oxydant puissant vis-à-vis de nombreuses molécule biologiques **(Delattre et *al.*, 2003).**

2.2.2 Le péroxynitrite (ONOO-)

$ONOO^-$ est non radicalaire, instable (durée de vie < une seconde) et très oxydant (E0=+1.4V, comme HOCl ; Sa formation ($^{\bullet}NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$) est endothermique et aurait lieu dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les mitochondries, mais son précurseur O_2•-dismute sans longtemps exister.

Au pH physiologique, il est en équilibre avec son acide conjugué, ONOOH.

$ONOO^{—} + H^+ \leftrightarrow ONOOH$

Il se transforme rapidement en nitrites et en nitrates et se décompose en dérivés radicalaires (•OH, $•NO_2$). Ses réactions avec les biomolécules (principalement des nitrations et des hydroxylations) sont agressives et délétères : attaque des fonctions thiols, des lipides,

des 25 bases nucléiques, des fonctions amines sur les protéines, et de beaucoup d'autres molécules de petite taille (urate, ascorbate, etc…). $ONOO^-$ attaque les sites à métaux de transition (enzymes himniques, hémoglobine, Mn/CuZn SOD), nitre les cycles aromatiques (tyrosine, tryptophane) et par là les enzymes dont le site actif porte un résidu tyrosyle.

La réaction d'$ONOO^-$ avec le CO_2 produit du peroxy nitroso carboxylate ($ONOOCO_2^-$) dont les dérivés ($\bullet NO_2$ et $CO_3^{\bullet-}$ ou NO_3 et CO_2) augmentent les événements de nitration **(Delattre et *al.*, 2003).**

2.2.3. Le dioxyde d'azote

NO•2, abondant dans les polluants de l'atmosphère des villes, se formerait aussi in vivo par réaction entre NO et O_2.

$$NO + O_2 \rightarrow 2\ NO_2$$

$NO_2^{\bullet}$ attaque les doubles liaisons des acides gras non-saturés (acide linoléique; α-linolénique et γ-linolénique; acide arachidonique) et transforme ces acides soit de cis-en transe, soit par nitration. Des lipoxygénases transforment l'acide arachidonique en eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, etc…), qui sont des messagers intra et extracellulaires indispensables. Les dérivés nitrés de l'acide arachidonique seraient également des messagers bioactifs.

$NO_2^{\bullet}$ s'additionnerait aux doubles liaisons d'autres molécules, arracherait soit un H soit un électron aux molécules voisines.
Ces réactions créent des radicaux libres.
Comme$O_2^{\bullet-}$ - $NO_2^{\bullet}$peut exister assez longtemps dans les espaces intra membranaires aprotiques **(Delattre *et al.*, 2003).**

2.2.4 Autres formes de ROS

La formation de l'oxygène singulier ($^1O_2$) à partir du triplet $^3O_2$ exige l'inversion d'un des spins des deux électrons célibataires de $^3O_2$. Cette inversion est endothermique (22 Kcal) et peu vraisemblable in vivo. La formation de l'ozone(O_3) exige 69 Kcal et n'a pas lieu in vivo, mais dans l'atmosphère suite aux rayons UV et aux étincelles électriques **(Delattre *et al.*, 2003).**

3. Origine des radicaux libres

Des radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Sans vouloir faire du finalisme, nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoie des signaux **(Favier, 2003).**

a) La mitochondrie est la source de production majeure d'O_2°- dans la cellule intacte. Dans les conditions physiologiques, la formation de ce radical est liée à l'activité physique et par là même à l'intensité d'oxygénation. Cette production peut également s'intensifier lorsque interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires (effet du TNF-a) ou nutritionnels (carence en ubiquinone) **(Favier, 2003).**

b) L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et corps étrangers. De plus les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF-α qui est capable de faire produire des radicaux libres par la mitochondrie des cellules cible **(Favier, 2003).**

c) Plusieurs autres systèmes enzymatiques produisent des radicaux libres au cours de réaction biochimiques (xanthine oxydase, hème oxygénase, cytochrome P450…). Une autre espèce radicalaire le monoxyde d'azote (ou NO°) est elle aussi produite par des systèmes enzymatiques que sont les différentes NO Synthases (ou NOS) à des fins de médiation cellulaires. Rappelons que la production concomitante dans un même site de NO et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au radical peroxynitrite **(Favier, 2003).**

d) Une autre source importante de radicaux sont les mécanismes de cycles rédox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ces différentes molécules endogènes ou exogènes (ascorbate, glutathion réduit, adrénaline, flavines) réagissent spontanément avec l'O_2 et sont ainsi oxydées conduisant à la formation d'O_2°-. Ce mécanisme est souvent mis en cause pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de certains médicaments (chloroquine, adriamycine, acetaminophène), mais il existe aussi pour des composés endogènes comme le lévulinate et surtout les catécholamines. Ce dernier mécanisme amplifié par les métaux, fait l'objet de recherche

actuelle sur l'origine de la maladie de Parkinson. Les O_2°- sont également produits lors de la formation de methémoglobine à partir d'oxyhémoglobine **(Hininger et Favier, 2003).**

e) Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des radicaux hydroxyles très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées telles que l'amiante et ou la silice sont aussi des sources de radicaux par la phagocytose exacerbée qu'elles déclenchent et aussi car elles sont recouvertes de sels de fer en surface **(Hininger et Favier, 2003).**

f) Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisant **(Hininger et Favier, 2003).**

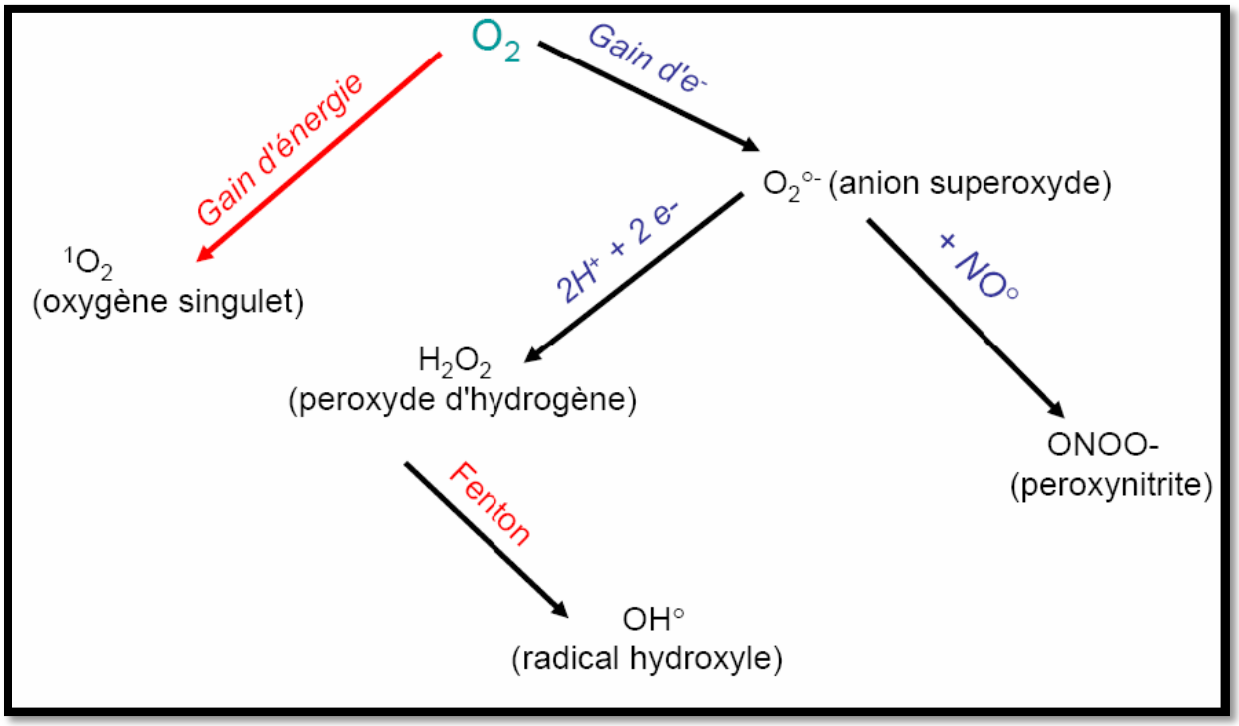


Figure (14) :L'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie **(Amara, 2007).**

4. Conséquences du stress oxydant

L'évaluation d'un stress oxydant repose sur la présence ou l'augmentation de marqueurs oxydatifs. Ces indicateurs comportent les produits de dégradation stables des protéines, des glucides, des lipides et de l'ADN **(Aouachria et Aounallah, 2015).**

4.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs **(Garait, 2006)**.

La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonenal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique **(Garait, 2006)**.

4.2 Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le $Fe^{2+,}$ peuvent être classées en 02 catégories :

a) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique,

b) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases) **(Favier, 2003).**

4.3. Oxydation des glucides

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des ions superoxyde (OH), et entrainer la coupure de protéine et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde **(Wolf et *al,* 1988).**

4.4. Dommage de L'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant **(Garait, 2006 ; Zengue, 2008).**

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitroguanine, forme amidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimidouracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN, qui est un poly anion (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...), est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions. Cette attaque de l'ADN est quotidienne **(Favier, 2003).**
Heureusement que notre organisme doté d'un système de défense anti oxydant.

5. Les antioxydants

5.1. Définition

Dès le début du XXème siècle, l'industrie s'est intéressée de près aux antioxydants (ou anti oxygène), molécules capables par exemple de réduire les effets de l'oxygène sur la corrosion des métaux. En biologie, les toutes premières recherches sur les antioxydants (fig.14) ont montré leur capacité à réduire l'oxydation des acides gras insaturés **(Pincemail, 2007)**. De façon générale, un antioxydant peut être défini comme étant une

substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat, peut significativement retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Les défenses anti oxydantes de notre organisme peuvent se diviser en deux antioxydants primaires antioxydants secondaires **(Pincemail et *al.*, 1998).**

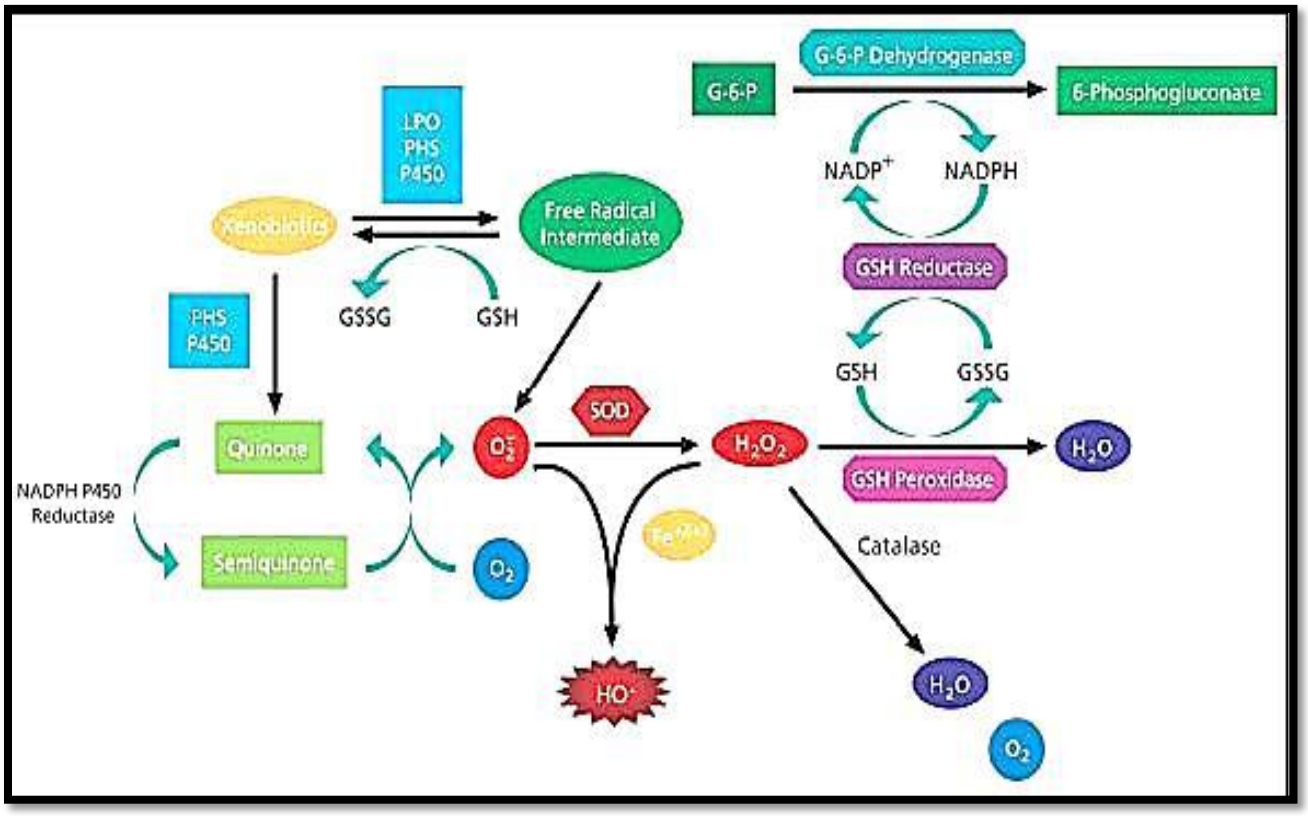


Figure (15): Mode d'action des principaux systèmes antioxydants **(Descamps, 2004).**

5.2. Principaux antioxydants

5.2.1. Les antioxydants synthétiques

Cette famille de substances antioxydants est relativement limités, puisqu'elle correspond à des corps étrangers au biologique (humain comme animal), donc biologiquement suspects. C'est la raison pour laquelle ces molécules on fait l'objet de nombreuses publications, dont les données toxicologiques sont parfois contradictoire **(Saidi, 2007).**

- Le Butylhydroxytoluéne (B.H.T).
- Le Butylhydroxyanisole (B.H .A).
- L'acide iso ascorbique.

5.2.2. Les antioxydants naturels

L'utilisation empirique d'antioxydants naturels est une pratique très ancienne pour la conservation des vivres. La recherche de nouveaux antioxydants naturels, connaît depuis ces dernières années un regain d'intérêt, car les antioxydants synthétiques actuellement utilisent, notamment le B.H.T et le B.H.A ne seraient pas dépourvus de toxicité. Les multiples atouts santé des fruits et légumes sont liés à leur faible teneur calorique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. Certains de ces micronutriments, apparaissent de plus en plus clairement comme essentiels au fonctionnement en participant à la protection de notre organisme contre les cancers, les maladies cardio-vasculaires et les autres maladies dégénératives. C'est le cas des antioxydants dont les fruits et légumes constituent l'une des principales sources alimentaires. Les principaux antioxydants végétaux sont au nombre de quatre. L'homme ingère avec ses aliments environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E et l'on estime que les fruits et légumes contribuent pour moitié à ces apports **(Saidi, 2007).**

6. Systèmes de défense

6.1. Systèmes de défense enzymatique

Les systèmes de défenses antioxydants comportent des enzymes. Sont au nombre de trois et ils fonctionnent en complémentarité **(Baudin, 2007).**

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La Cu/Zn-SOD, chez l'homme, existe sous deux formes, l'une cytosolique et l'autre extracellulaire. Toutes les sous-unités portent un ion Zn non catalytique, et un ion Cu^{2+} responsable de l'activité SOD, c'est-à-dire la dismutation de l'anion superoxyde selon la réaction : **(Baudin, 2007)**

$$SOD, 2H + O_2\text{-} + O_2^{-} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$O_2 + 2e\text{-} + 2H+ \longrightarrow H$$

Une troisième forme est mitochondriale et dans son site actif on trouve du manganèse (Mn-SOD) ; c'est une protéine importée du noyau, on ne la trouve donc pas dans les hématies ; son activité catalytique est identique à celles des Cu/Zn-SOD. Un autre rôle des SOD est de

régénérer la vitamine C. On voit que l'action antioxydant des SOD est incomplète car en éliminant l'anion superoxyde, elles produisent du peroxyde d'hydrogène **(Baudin, 2007).**

6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)

Il y aurait plusieurs gènes GPx mais l'existence de formes intra- et extracellulaires serait essentiellement due à des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Dans le plasma, on trouve une forme très glycosylée qui viendrait du foie. Toutes ces enzymes sont homo-tétramériques et séléno-dépendantes, c'est-à-dire qu'elles contiennent dans leur site actif un atome de Sélénium (Se) à la place d'un soufre cystéinique. Le glutathion (GSH) est un substrat obligatoire, le deuxième substrat étant un hydro peroxyde (ROOH), souvent H_2O_2 ; la GPx agit par son groupement sélénol et deux molécules de GPx sont nécessaires à la transformation d'une molécule d'hydro peroxyde. Comme ces deux GSH s'oxydent en GSSG (forme oxydée), il est indispensable que la GPx soit couplée au système de régénération du GSH (forme réduite active) comme suit **(Baudin, 2007)** :

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O_2 + GSSG$$

6.1.3. Catalase (CAT)

La catalase est localisée dans les peroxysomes et les hématies ; c'est une enzyme tétramérique et capable d'éliminer H_2O_2 selon **(Baudin, 2007).**

$$2\ H_2O + O_2 \longrightarrow 2\ H_2O_2$$

6.1.4. Peroxyredoxines

La thiorédoxine-peroxydase fonctionnant sans GSH. GPx et catalase agissent tardivement dans le processus oxydant en éliminant H_2O_2 et les peroxydes membranaires alors que les SOD agissent un peu plus précocement dès que se forme vit C, que ce soit dans le cytosol ou la mitochondrie **(Baudin, 2007).**

6.2. Systèmes de défense non-enzymatique

6.2.1. Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tri-peptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible.

Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer, les autres propriétés anti-oxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire.

La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols» qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées **(Haleng et *al.*, 2007)**.

6.2.2. La vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits **(Haleng et *al,* 2007).**

La vitamine C est avant tout, un excellent piégeur des EOA (HO• ou$O^{2\bullet-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer **(Haleng et *al*., 2007)**.

6.2.3. La vitamine E

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). D'un point

de vue biologique, deux isomères sont particulièrement restants, T α-et l ey-tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux pyroxyles (ROO) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Les apports journaliers d'α-tocophérol sont de l'ordre de 10mg **(Haleng et *al.*, 2007).**

6.2.4. Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes (fig.15) différents ont été isolés à partir de sources naturelles **(Haleng et *al.*, 2007).**

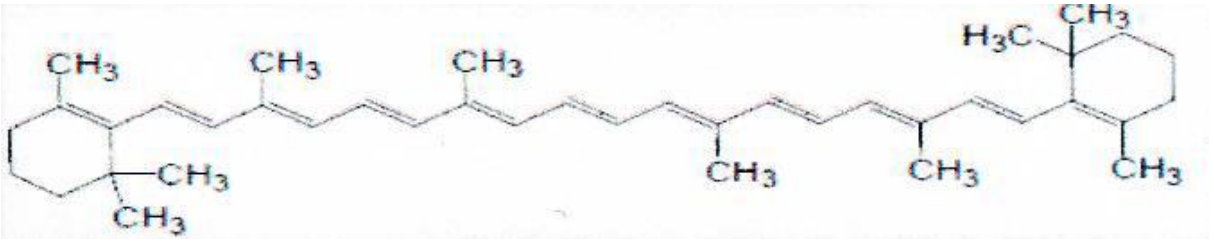


Figure (16) : structure du P-carotène **(Goupy et al., 1999).**

6.2.5. Le coenzyme Q10

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E **(Haleng et *al.*, 2007).**

6.2.6. L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, un piégeur puissant de radicaux (OH•, ROO•, NOO•) **(Haleng et *al.*, 2007).**

6.2.7. La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales.
La bilirubine est capable de piéger ROO• l'oxygène singlet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires **(Haleng et *al.*, 2007).**

7. Oligoéléments

Le Cuivre (Cu), le Zinc (Zn), le Manganèse (Mn), le Sélénium (Se) et le Fer (Fe) sont des éléments essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de Zinc, la catalase de fer et la GPx de Sélénium **(Goupy et *al.*, 1999).**

Le lapin domestique est un lapin européen qui a été domestiqué. Issus du «lapin de garenne» sauvage (*Oryctolagus Cuniculus*). Son but premier est la production de viande, mais il permet également la production de poils et de fourrures, L'ensemble de ces particularités fait du lapin un animal d'intérêt comme modèles dans les laboratoires et pour des études de diversité génétique **(Aoun et Merghadi, 2013).**



Figure (17): Le lapin de garenne *Oryctolagus cuniculus* **(PP)**

1. Classification du lapin

Tableau 01. Classification du lapin domestique **(Aoun et Merghadi, 2013).**

Règne	Animal
Embranchement	Chordé vertébré
Classe	*Mammifère placentaire*
Ordre	*Lagomorphe*
Famille	*Léporidé*
Genre	*Oryctolagus*
Espèce	*Cuniculus*
Nom commune	Lapin domestique

2. Caractéristiques générales

L'espérance de vie du lapin en laboratoire ou en élevage excède rarement quatre à cinq années alors que dans des conditions naturelles et particulièrement dans le cas des mâles, elle peut atteindre au moins deux fois cet âge. Les lapins sont des animaux alertes et timides qui s'adaptent facilement à la captivité. A l'état sauvage, ils sont des animaux nocturnes. La formule dentaire du lapin est la suivante : incisives 2/1, canines 0/0, prémolaires 3/2 et molaires 3/3 **(Joly et *al*., 1990 ; Nchare, 1990).**

Une particularité des dents de lapin qu'il faut signaler est qu'elles croissent continuellement et que la croissance des incisives peut atteindre 12 centimètres par année **(Nchare, 1990).** Cela ne présente aucun problème à la condition qu'il n'y ait rien qui entrave la mastication. La température corporelle moyenne se situe à 39,5ºC (avec des variations de 38,5º à 40ºC) et habituellement elle fluctue beaucoup lors de l'excitation provoquée par les manipulations même si d'autres signes d'inconfort ne sont pas évidents. L'urine de lapin est normalement épaisse et trouble et elle contient des substances cristallines qui sédimentent et s'accumulent sur les plateaux d'excréments des cages à lapins **(Nchare, 1990).**

3. Alimentation

Herbivore, le lapin de garenne se nourrit essentiellement de graminées et de nombreuses plantes herbacées. Opportuniste, il est capable de consommer également des végétaux ligneux comme les ronces, les ajoncs, les bruyères. Lorsque les apports du milieu naturel ne sont pas suffisants, il peut occasionner des dégâts considérables aux cultures et plantations forestières, **(Joly et *al*., 1990 ; Muriel 2010 ; Nchare, 1990).** Le lapin de garenne présente une digestion particulière avec un comportement de caecotrophie. La première digestion produit des crottes molles, riches en protéines et vitamines synthétisées par la flore caecale. Ces caecotrophes sont ingérées par le lapin et leur digestion permet l'assimilation des nutriments d'origine bactérienne **(Muriel, 2010).**



Figure (18) : Alimentation du lapin **(PP).**

4. Description

Le lapin est un animal couvert d'une fourrure assez épaisse de couleur variable. Les principales zones du corps du lapin sont décrites sur la figure si dessous (fig.17). Pour la majorité des races, à l'exception des races nais, l'allure générale du corps est différente selon le sexe **(Muriel, 2010).** Une tête large et forte, un thorax développé, des membres relativement épais et une musculature bien extériorisée sont généralement caractéristiques du mâle **(Aoun et Merghadi, 2013).**

4.1. Aspect extérieur

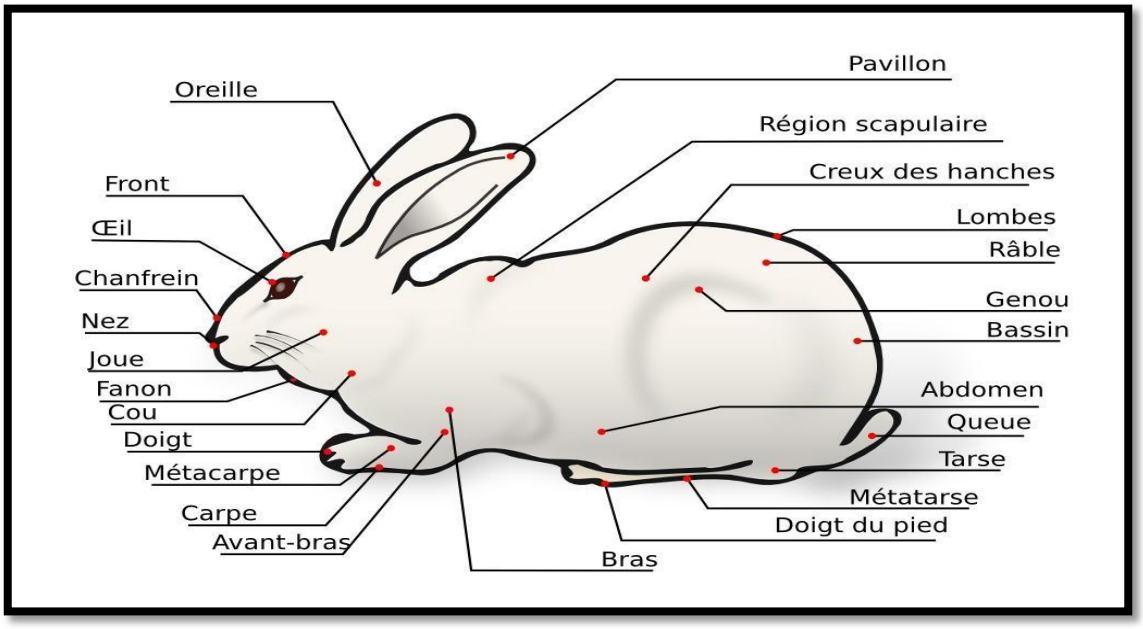


Figure (19) : Description externe du lapin **(Aoun et Merghadi, 2013).**

4-2-Anatomie interne

Le tube digestif : il est long de 10 à 11 fois la longueur du corps (fig.18)

- ✓ L'œsophage aboutit à l'estomac qui ressemble à celui du cheval en miniature
- ✓ L'estomac est toujours plein
- ✓ L'intestin grêle ne présente pas de particularités
- ✓ Le cæcum décrit sur lui-même deux tours de spire et se termine par l'appendice caecal, tube fin en cul de sac de 10 à 12 cm de long. Le cæcum est toujours plein. Son volume est six fois supérieur à celui de l'estomac. Ce type de cæcum est la particularité du tube digestif du lapin. Son importance est liée au mode alimentaire du lapin.
- ✓ Le colon est formé de 2 parties: l'une bosselée, l'autre régulièrement cylindrique qui aboutit au rectum
- ✓ Le foie trilobé est normalement rouge brun uniforme
- ✓ Le pancréas est logé dans l'anse duodénale **(Bulletin, 2009).**

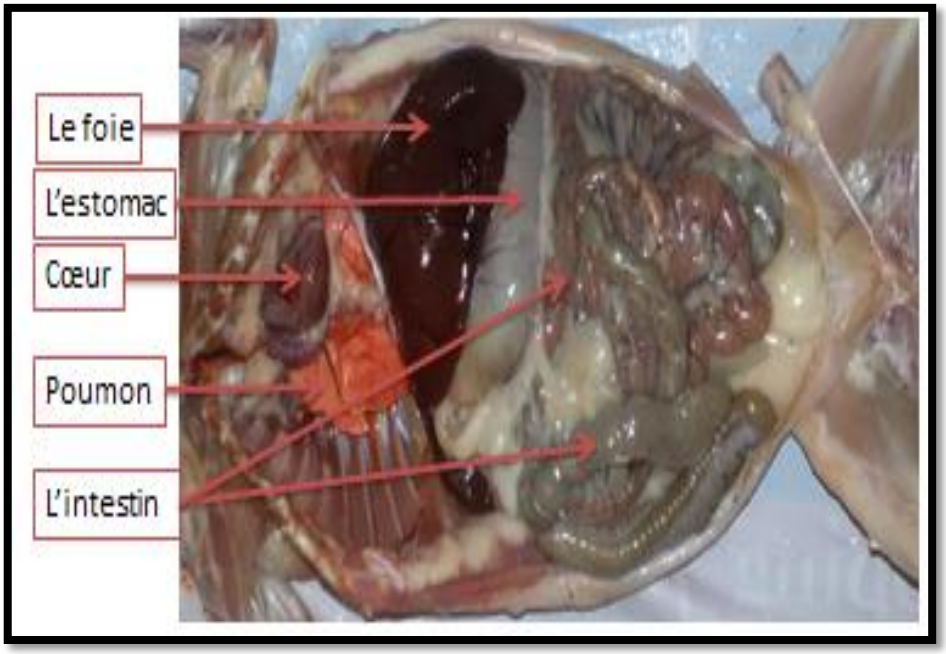


Figure (20) : L'appareil digestif du lapin **(PP).**

5. Organes sensorielles

La position latérale des yeux lui confère un champ de vision panoramique efficace pour la détection d'un prédateur éventuel. En revanche, il existe un champ mort visuel juste en dessous du menton, ce qui contraint le lapin à se fier à la sensibilité de ses lèvres et à ses vibrisses pour le tri précis de sa nourriture. Le lapin voit bien la nuit, mais distingue mal les couleurs. Ainsi, l'ouïe et l'odorat sont bien développés et les oreilles servent également à la thermorégulation **(Aoun et Merghadi, 2013).**

6. Utilisation des lapins

6.1. Substrat pour la toxicologie et l'étude des maladies infectieuses

Le lapin est souvent utilisé pour les tests de la toxicité et de la sécurité en recherche et dans l'industrie pharmaceutique, pour plusieurs raisons. Le lapin est un animal robuste avec une période de gestation courte. Comme il a été déjà mentionné **(Aoun et Merghadi, 2013),** sa petite taille rend son élevage possible dans un espace restreint et minimise la quantité de réactif à tester mais en même temps il est assez grand pour pouvoir visualiser les premières irritations et observer les fœtus. Le lapin est hypersensible aux agents tératogènes et sa réponse à ces agents est très semblable à celle de l'homme contrairement à la souris **(Aoun et Merghadi, 2013).**

Le lapin a aussi été très utilisé pour étudier la physiopathologie et l'immunologie d'un grande nombre de maladies infectieuses d'origine virale provoque par le virus Herpès simplex (VHS ; virus de l'immuno déficience humaine (VIH). **(Gasmi et Torchane, 2014)**

6.2. Intérêts du lapin pour la recherche scientifique

En plus de son exploitation comme animal d'intérêt économique Le lapin, Californien avec un poids moyen et très dociles, entre 2 kg et 5 kg **(Yanni, 2004).**
Les lapins de cette race à manipuler et à contrôler et de plus, la grandeur et l'absence de pigmentation de leurs oreilles facilitent la répétition d'interventions telles les prises de sang et les injections intraveineuses **(Aoun et Merghadi, 2013).**

Cependant même s'ils sont classés dans la catégorie de grosseur moyenne, ces lapins deviennent malheureusement très gros avec l'âge et par conséquent ils sont difficiles à manipuler et trop gros pour habiter les cages à lapins standards ; de plus, ils mangent beaucoup trop et souffrent de douleurs aux pattes **(Russell et Schilling, 1973).**

Les lapins de variétés différentes ont servi à l'établissement de modèles expérimentaux très utiles dans diverses sphères de la recherche biomédicale (embryologie, toxicologie, virologie, etc.) et constitue un bon modèle pour la chirurgie expérimentale. Et ils sont fréquemment utilisés dans des tests de toxicité (pyrogène, tératogénicité, etc.). De plus, ils sont utilisés couramment en sérologie parce qu'ils produisent facilement des anticorps contre une multitude d'antigènes. Cependant, il existe deux inconvénients majeurs à leur utilisation comme animal d'expérimentation :

- Ils réagissent mal à l'anesthésie
- Sujets à développer spontanément un très grand nombre de maladies **(Russell et Schilling, 1973).**

6.3 Autre utilisation dans laboratoire

Le lapin est de routine utilisé pour, le dépistage de substances embryotoxiques et tératogènes, l'expérimentation des contraceptifs ainsi que l'élevage des glossines. L'étude de l'hypertension artérielle, la tératologie expérimentale, l'étude de l'artériosclérose, la génétique, les études sur la reproduction, la chirurgie cardiaque sont également des domaines parmi tant d'autres qui font appel au lapin comme animal de laboratoire L'expérimentation animale nécessite une connaissance précise de l'anatomie, de la physiologie, de la biochimie bref de la biologie des mammifères utilisés. Il est donc important d'étudier ces animaux afin de mieux les connaitre **(Nchare, 1990).**

I. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Pour notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur les lapins de la race (*Oryctolagus cuniculus*), prouvent de l'animalerie de chalghom El-aid wilaya de Mila.

1.2. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé l'oxyde de fer, sous forme de poudre coloré rouge soluble dans l'eau distillé.



Figure (21): Les solutions de produit (Fe_3O_4) **(PP).**

2. Méthodes d'élevage et traitement

2.1. Description et élevage

Pour la réalisation de notre expérimentation, nous avons pris comme un modèle biologique 20 lapin (*Oryctolagus Cuniculus*). Tous les lapins sont pesés et leur poids voire entre 2.7kg et 4.8kg. Ils ont logés individuellement dans des cages métalliques pendant une période d'adaptation de 15 jours, ils sont devisés en 04 lots de 05 individus. L'alimentation des lapins était à base d'alimentation artificielle spécifique pour les lapins.



Figure (22) : L'élevage du lapin**. (PP)**

2.2. Mesure de poids : La mesure de poids est effectuée sur les lapins tout jour pendant la durée d'élevage, soit au cours de l'adaptation ou le traitement à l'aide de balance (Aston®).

2.3. Traitement

Après la période d'adaptation nous avons commencé le traitement. La période du traitement est pendant 2 moins, elle est par voie orale selon leurs poids corporel. Donc le lotissement et le traitement dans notre expérimentation réalisé comme suivant:

- ✓ *Lots n°1* **:** contient 05 lapins comme témoin ; gavage d'eau distillé seulement.
- ✓ *Lots n°2* **:** contient 05 lapins pour le traitement par Fe_3O_4 à dose de 50mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°3* **:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 75mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°4***:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 100 mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°5***:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 125mg/kg/j

2.4. Sacrifice et prélèvement

Après 2 mois du traitement, on a sacrifié les lapins. Le prélèvement des organes a été fait au niveau de laboratoire de l'université de Tébessa, les foies et le sang sont récupérés et pesés (fig. 22).

3. Méthodes de dosage

3.1. Paramètres métaboliques

3.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait au niveau de foie des lapins selon la méthode de **Dubois, (1956).** L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100mg de foie dans des tubes à essai puis à ajouter 2ml d'éthanol à 80%, le tout est laissé 48 H. Le dosage se fait par évaporation totale de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°C. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20 ml avec de l'eau distillée ensuite en prélève 1ml de la solution et on joute 1ml de phénol à 5 % en prenant soin de bien agiter, puis on ajoute 2 ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace. Enfin le tout est laissé se reposer pendant 25 min, puis on procède à la lecture au spectrophotomètre (Shimadzu mini1240), à une longueur d'onde de 490 nm. Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose **(Annexes : Courbe.01).**

3.1.2. Dosages des lipides

Les lipides hépatiques sont dosées selon la méthode **(Goldsworthy et *al*., 1972),** l'extraction est selon **shibko et *al* .(1966)** chaque échantillon constitué de 0.5g de foie est découpée et macéré dans 10ml de l'acide trichloroacétique acide TCA (20%) après broyage et filtration et une première centrifugation (centrifugeuse Sigma 2-16P) à 5000 t/min pendant 10min on verse le surnageant et on garde dans le même tube le culot, on ajoute à ce dernier 1ml du mélange Ether/Chlorophorme (1/1), et après une seconde centrifugation (5000 t/min pendant 10min) qui donne deux phases : un culot (contenant les protéines) et un surnageant (contenant les lipides), on prélève 100µl du surnageant auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et en met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min.

Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophospho-vanillinique à 85% (0.38g vanilline + 195ml acide orthphosphorique + 55ml H2O) et laisser 30 minutes à l'obscurité,la lecture spectrophotomètrique (Shimadzu-mini1240), est réalisée à une longueur d'onde 530nm. Le calcul des concentrations réelles se fait à partir de

L'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol **(Annexes : Courbe.02).**

3.1.3. Extraction et dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de **Bradford (1976)** qui utilis**e** la BSA (Sérum Albumine Bovine) comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500ml avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm. Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de boeuf **(Annexes : Courbe.03).**

3.2. Paramètres enzymatiques et non enzymatiques

3.2.1. Dosage du glutathion GSH

Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988).** Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l`homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalycilique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

Protocole expérimental

Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à0.2M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.

-Une fois prépare, l' homogénat est déprotéinisé ; 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalycilique (SSA) à 0.25%.

-Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace. -Centrifugé pendant 5min à1000 t/min.

-Prélever 0.5 ml du surnagent.

-Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), PH=9.6.

-Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) a 0.01M dissous dans le méthanol absolu.

-Laisser pendant 5min à température ambiante.

-Mesurer l'absorbance (A) à 412nm.

Calcul

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[\mathrm{GSH}] = \frac{\mathrm{DOX1X1.525}}{\mathrm{131000X0.8X0.5mgdeprotéine}}$$

DO : Densité1 optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml SSA).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris-EDTA+0.025 ml DTNB).

131000 : Coefficient d absorbance (contenant le groupement-SH à412 nm).

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

On que la concentration de GSH est mesuré par apport à 1 mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagne par le dosage des protéines.

3.2.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). En utilisation l'H_2O_2 comme substrat.

- L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH7.8.
- Centrifugation 10 min a 3000t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a0.1 MM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H_2O_2 (1.3MM) pour initier la réaction.

- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na2HPO4 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans le 05 min.
- La détermination (calcule) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant :
    - Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.
    - Blanc=0.04 micro mole de GSH réduit →DOb
    - Extrait=0.04 micro mole de GSH réduit → DOe

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue)= DOe-DOb

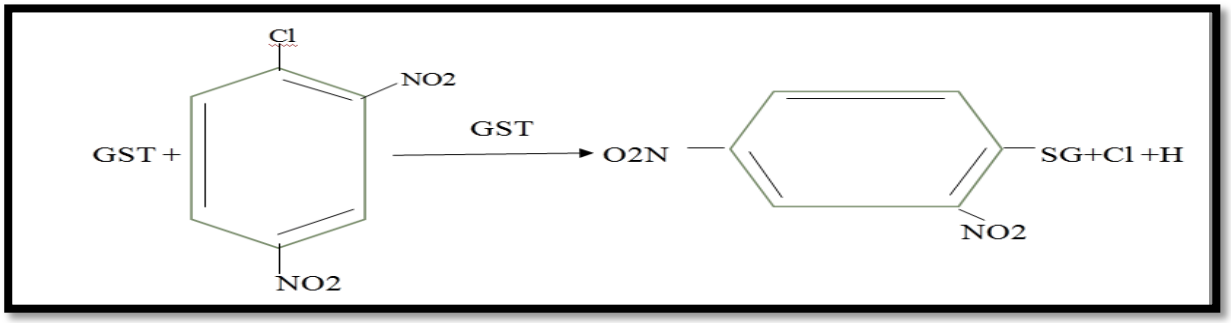
X= $(DOe-DOb)$ 0.04 DOb = quantité de GSH réduit disparue (oxydée) dans 0.2 extrait dans 1ml

L'activité de la GPx = la quantité de GSH réduit oxydée disparue X/5[*Protéine*]

3.2.3. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)

Principe

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et *al.* (1974),** Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule novelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



Protocole

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST .Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH6).L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65mg GSH, 1 ml ethanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, Ph 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST(nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9{,}6 \times \text{mg de protéine}}$$

Do : Densité optique de l'échantillon /min.

Do/min blanc : Densité optique du blanc /min

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm

3.2.4. Dosage du malondialdéhyde MDA

La MDA Peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'**Esterbauer et *al* (1992)**

Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose).Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à530 nm.

Protocole

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl150mM pH7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO =E.C.L) :

$$[\mathrm{C}](\mathrm{nmol/mg\ protéine}) = \frac{\mathrm{DO}.106}{\varepsilon.\mathrm{L}.\mathrm{X}.\mathrm{Fd}}$$

C : Concentration en nmoles/mg de protéines ; DO : Densité optique lue à530nm ;

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA =1.56 $105M{-}1cm{-}1$;

L : Longueur du trajet optique=0.779 cm ;

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;

Fd: Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

3.2.5. Dosage de l'activité Catalase (CAT)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de **Cakmak et Horst (1991).** La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire ε =39400 µM-1.cm-1.L pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100µl de l'extrait enzymatique brut, 50µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2à 0,3% et 2850µl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique (Jenway 6300).La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité de catalase est calculée selon la loi suivant :

$$Acat = \frac{\Delta\mathrm{A}\,.\,\mathrm{Vt}}{\varepsilon\,.\,\Delta\mathrm{t}.\,\mathrm{L}.\,\mathrm{Ve}.\,\mathrm{p}}$$

Act: Activité enzymatique en µmole/min/mg de Protéines.

ε : Coefficient d'extinction linéique molaire en. µM-1. cm-1

ΔA : pente de la droite de régression (variation de la densité optique en fonction du temps)**.**

Vt : Volume total du mélange réactionnel en ml.

Ve : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

L : Largeur de la cuve de mesure en cm.

P : Teneur en protéines en mg

T : temps de lecture en min.

4- Dosage des transaminases TGO, TGP

TGO (Transaminase Glutamate Oxaloacétique) **: Selon la méthode Biomaghreb**

Principe : détermination cinétique de l'activité aspartate aminotransferase, la réaction est initiée par addition de l'échantillon de patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\text{ oxogluturate} + \text{L-Aspartate} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{Glutamate} + \text{oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malate} + NAD^+$$

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate aminotransferase dans l'enchantion **(Berghmeyer et *al.*, 1976).**

TGP (Transaminase Glutamate) **: Selon la méthode Biomaghreb**

Principe : détermination cinétique de l'activité alanine aminotransferase, la réaction est initiée par addition de l'échantillon de patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\text{ oxogluturate} + \text{Alanine} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité Alanine transferase dans l'enchantion **(Berghmeyer et *al.*, 1978).**

5-Etudes statistique

Les résultats obtenus à partir d'un test à un critère présent sous forme (moyenne de cinq répétitions ± l'écart type), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Excell'office 2013.

Nous avons déterminé les paramètres statistiques pour chaque lot expérimental. Chaque paramètre mesuré à fait l'objet d'une analyse de variance avec un taux de signification $\alpha \leq 0.05$. Et comparer par rapport au témoin par test de Dunett si $P \leq \alpha$ / $\alpha = 0.05$ il y a des différences significatives entre les moyennes, ces calcules ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB 17.

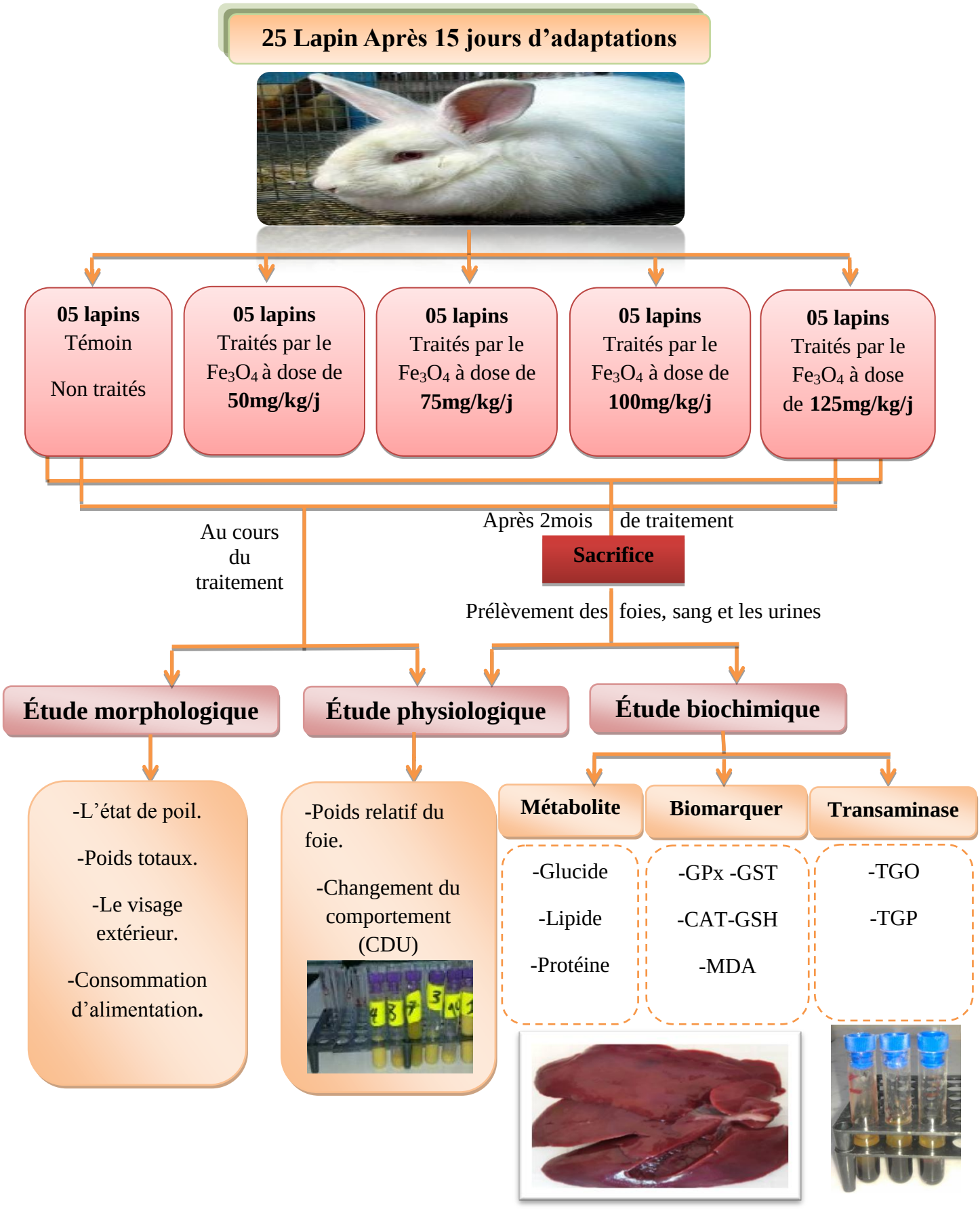


Figure 23 : Schéma Récapitulatif du Protocol Expérimental. **(PP.)**

II. Résultats

1. Paramètres physiologies

Les résultats obtenus montrent que : L'oxyde de fer entraîne une diminution de poids du foie, des changements morphologiques : chute de poil, couleur des urines sombre jaune gluant et l'inflammation cutané, stress et anxiété par rapport au témoin.

1-1 -Action d'oxyde de fer sur le poids du foie chez les lapins traités pendant 2 mois

Nous avons suivi l'évolution des poids du foie chez les lapins témoins et les lapins traités par l'oxyde de fer.

- ✓ **Action sur le poids du foie**

Les résultats obtenus montrent qu'il y'a une diminution non significative (P >0,05) du poids de foie chez les lots traité par l'oxyde de fer à différent doseselon le poids corporel. (P >0,05) (Tab. 02, Fig. 24).

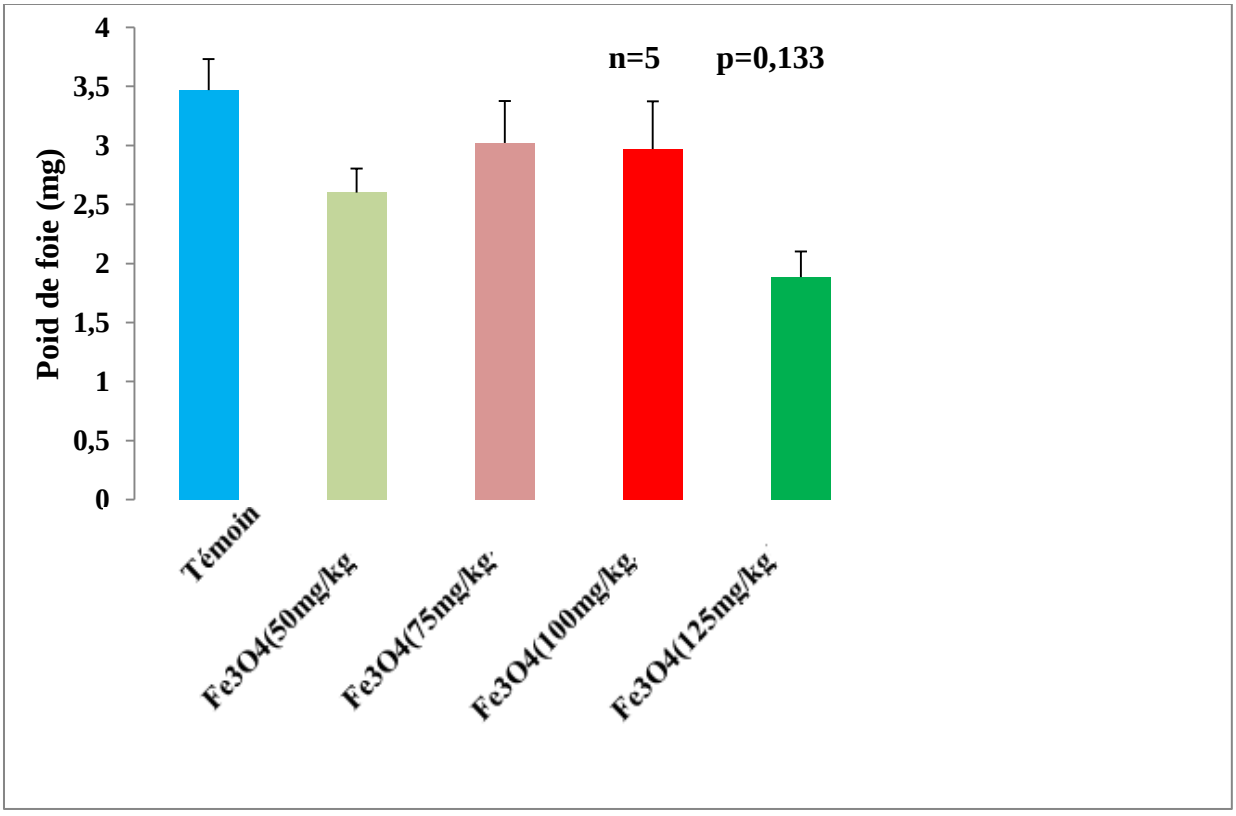


Figure (24) : Variation des poids du foie (mg) des lapins témoins et traités pendant 2 mois (P >0,05).

2. Paramétrés biochimiques et enzymatiques

2.1- Action d'oxyde de fer (NPs.) sur les paramètres biochimique chez les lapins durant 2 mois de traitement

Les résultats des paramètres biochimique (glucide- protéine et lipides) dans le foie chez les lapins traite et témoins après 2 mois de traitées sont montres sur le tableau.

Tableau 02 : Variation des métabolites (protéines, glucides et lipides) hépatique des lapins témoins et traités par l'oxyde de fer après 2 mois.

Lots expérimentaux					
Paramètres	**Témoin**	**Fe3O4 (50mg/kg)**	**Fe3O4 (75mg/kg)**	**Fe3O4 (100mg/kg)**	**Fe3O4 (125mg/kg)**
Protéine (mg)	0,249 ±0,021	0,260 ±0,025 ***	0,204 ±0,016 ***	0,314 ±0,006 ***	0,125 ±0,0375 ***
Glucide (µg)	123,3 ±0,49	112,637 ±20,95	119,263 ±33,349	166,832 ±31,839	195,758 ±13,1062 ***
Lipide (µg)	126,024 ±16,64	21,187 ±84,456	362,951 ±91,38 *	345,514 ±111,228 *	103,474 ±85,578 *

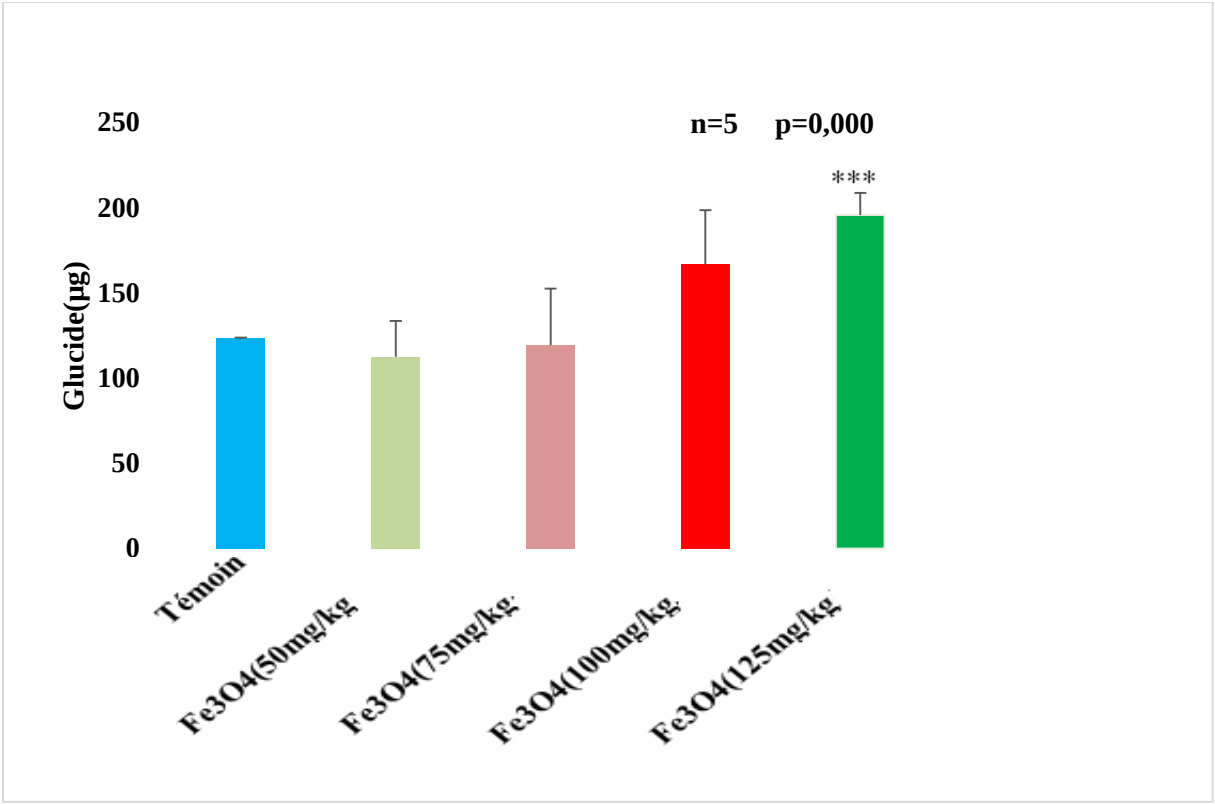
*: Différence significative comparant au témoin (P≤0,05).

***: Différence très hautement significative comparant au témoin (P≤0,001).

P: Seuil de signification

2.1.1- Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des glucides chez les lapins traites pendent 2mois

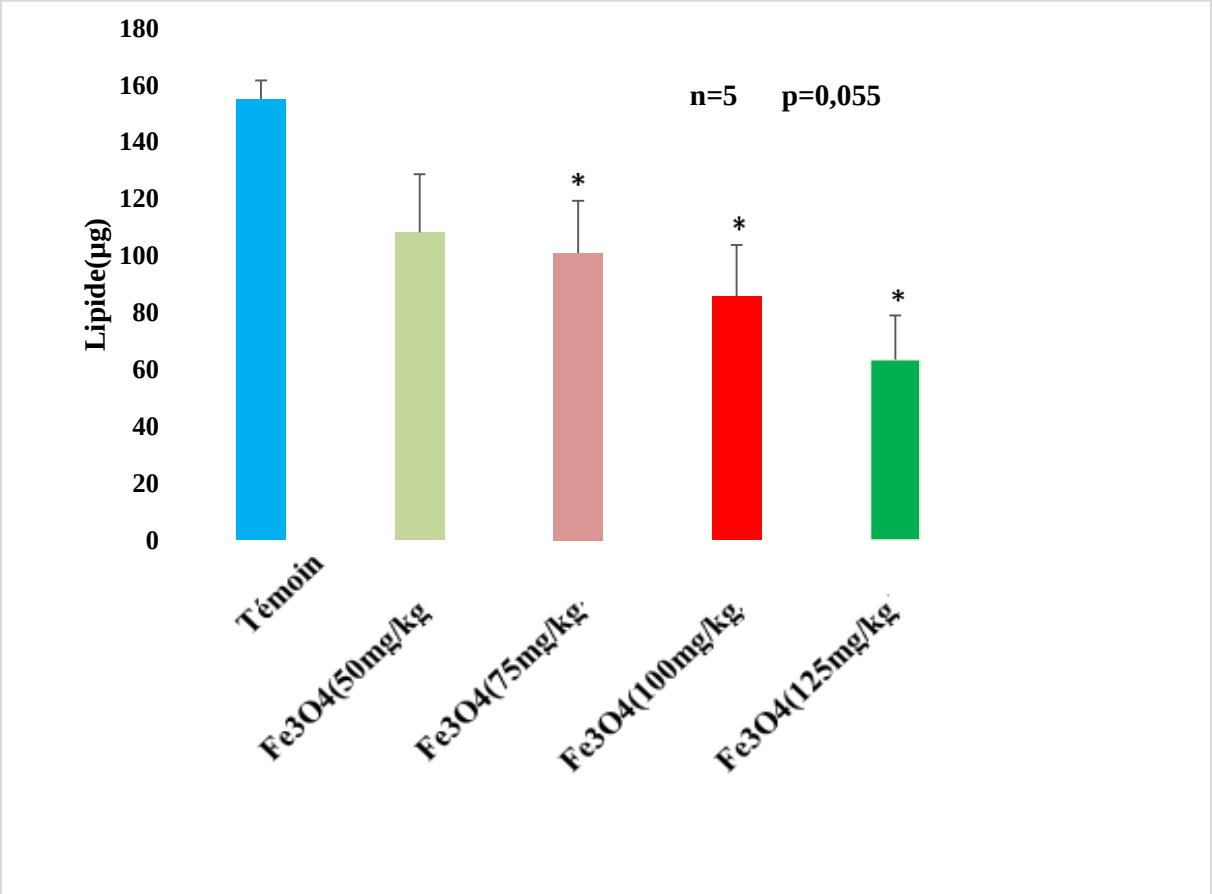
D'après les résultats obtenus on observe une diminutionnon significative de taux de glucide dans le foie chez le lot traité par l'oxyde de fer de dose (50, 75 mg/kg/j) comparant au lot témoin par contre les autres lots traité par les doses «100 et 125mg/kg/j » observe une augmentation très hautement significative en comparaison avec le témoin. (tab.02, fig. 25).



Figure(25): Variation de taux cellulaire en glucide (µg) chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).

2.1.2- Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des lipides chez les lapins traites pendent 2mois

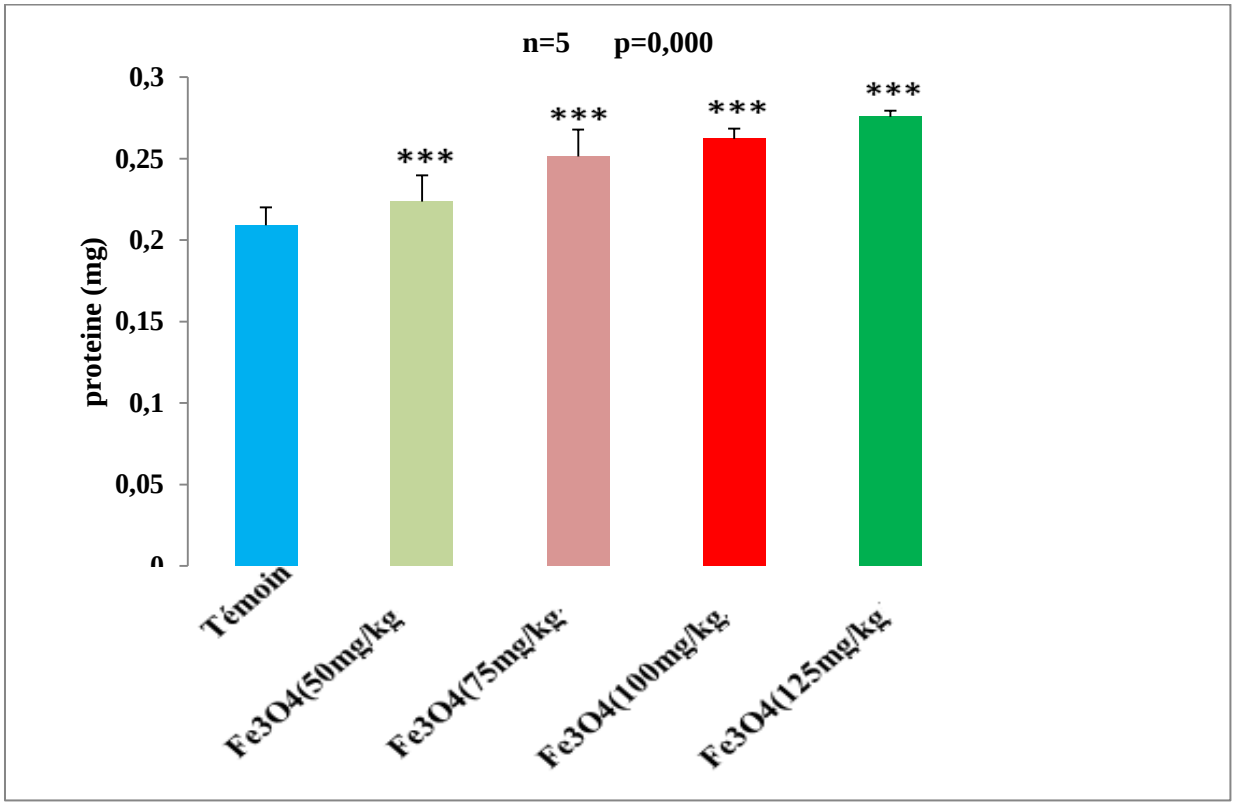
D'après les résultats obtenus on observe une diminution significative (P≤0,05) de taux de lipide hépatique chez les lots expérimentaux qui traité par l'oxyde de fer par les doses (50, 75 et 100 mg/kg/j) par rapport au lot témoin. (Tab.02, Fig. 26).



Figure(26) : Variation de taux cellulaire en lipide (µg) chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,05)

2.1.3- Action d'oxyde de fer (NPs.) sur le taux des protéines chez les lapins traites pendent 2mois

D'après les résultats obtenus on observe une augmentation très hautement significative (P≤0,001), de taux de protéine hépatique chez les lots expérimentaux traité par l'oxyde de fer au dose (50, 75,100 et 125 mg/kg/j) comparant au lot témoin. (Tab.02, Fig. 27).



Figure(27) : variation de teneur cellulaire en protéine (mg) chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).

2.1.4. Action d'oxyde de fer (Fe3O4) (NPS.)sur les paramètres enzymatiques chez les lapins pendant 2mois de traitement

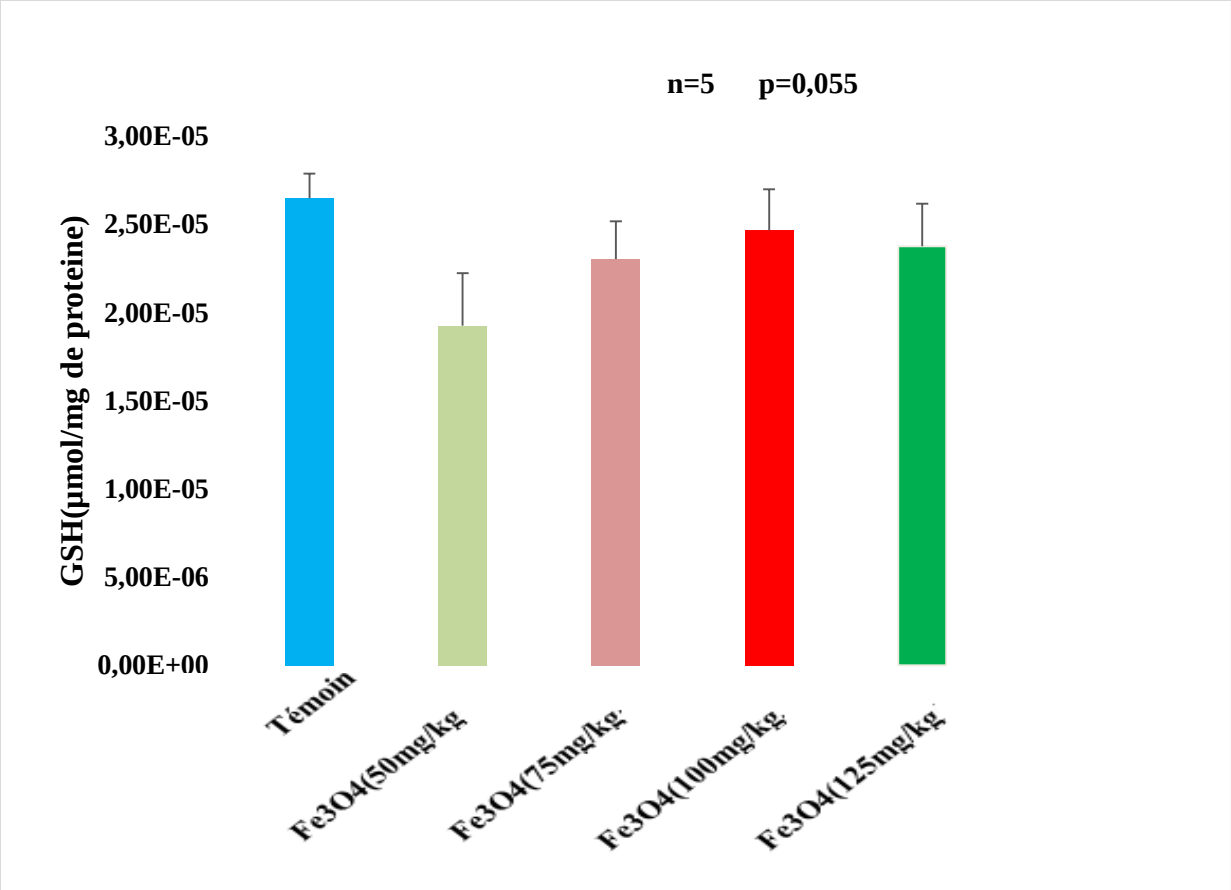
Les paramètres du stress oxydant **(GSH, MDA, GPX, CAT,** et **GST)** dans le foie des lapins témoins et traité après 2 mois de traitement sont montrées dans le tableau (n° 03)

Tableau : **(03)** Variation de teneur non enzymatique de GSH, MDA et l'activité enzymatique de GPX, GST, et CAT hépatique chez les lapins dans les différents lots expérimentaux **(Moyen ±Ecartype).**

Lots expérimentaux					
Paramètres	**Témoin**	**Fe3O4 (50mg/kg)**	**Fe3O4 (75mg/kg)**	**Fe3O4 (100mg/kg)**	**Fe3O4 (125mg/kg)**
GSH	2,65E-05 ±1,40E-06	**1**,92773 E-05 ±2,98046E-06	2,3056 E-05 ±2,1368E-06	2,46951 E-05 ±2,31937E-06	2,37853 E-05 ±2,40113E-06
MDA	96,56 ±9,57	99,6769331 ±11,8055953 ***	100,6892066 ±11,5390081 ***	120,154671 ±12,1931074 ***	125,9073527 ±11,0392738 ***
GPx	0,15 ±0,018	0,131978673 ±0,00840718 ***	0,1137601 ±0,038147052 ***	0,11211897 ±0,03260706 ***	0,10779166 ±0,02115434 ***
GST	0,369 ±0,0072	0,03689598 ±0,00651988	0,01102882 ±0,0128661 *	0,00832031 ±0,00802231 *	0,01782849 ±0,00958486 *
CAT	0,016 ±0,00023	0,01408892 ±0,00011594 ***	0,01355245 ±0,0002019 ***	0,01225985 ±0,00074182 ***	0,0141987 ±0,00090343 ***

2.1.5-Action d'oxyde de fer sur le teneur de glutathion réduit (GSH) chez les lapins traité pendant 2 mois

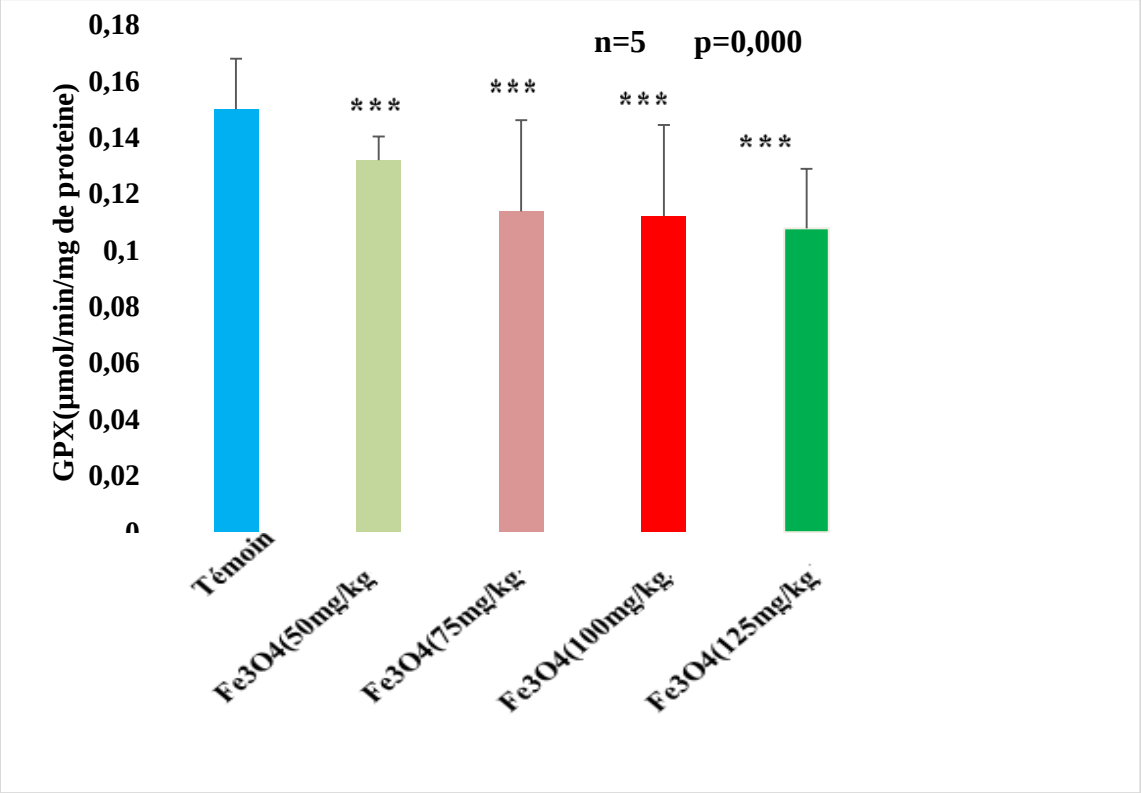
D'après les résultats obtenus on observe une diminution non significative de la teneur cellulaire en glutathion réduit (GSH) chez les lots expérimentaux traités par l'oxyde de fer à des doses (50, 75,100,et 125 mg/kg/j) pendant 2 mois comparant au lot témoin.(Tab : 03, Fig. 28)



Figure(28) : Variation du taux de GSH (µmol/mg de prot.) dans le foie chez les lapins témoins et traités après 2 mois (P≥0,05).

2.1.6.Action d'oxyde de fer sur le teneur de Glutathion peroxydase (GPX) chez les lapins traité pendant 2 mois

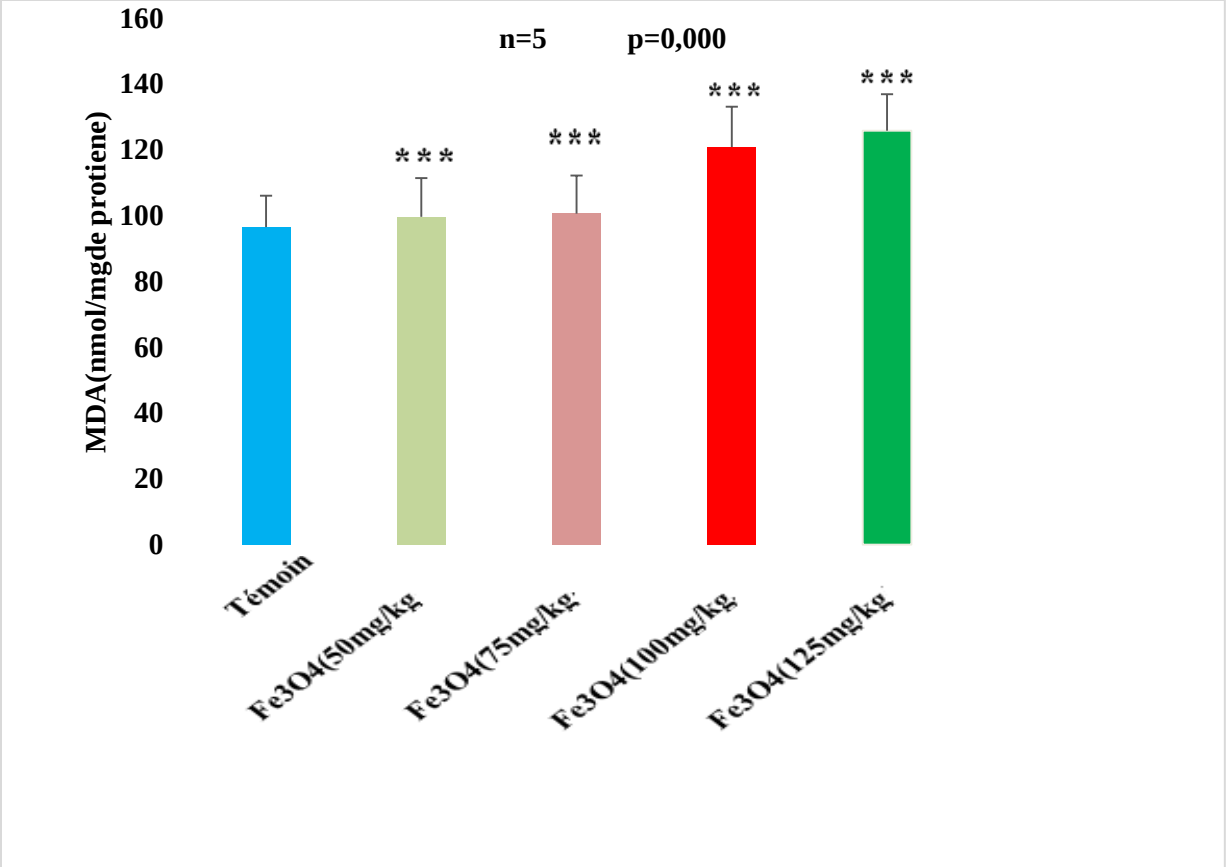
D'Après le traitement des lapins par l'oxyde de fer a des dose différent (50-75-100 125mg/kg/jour) pendant 2 mois entraîne une diminution très hautement significative (P≤0,001) de la teneur en glutathion peroxydasedans le foie, dans tous les lots, de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase (GPX) hépatique par rapport au lot témoin (Tab. 03, Fig. 29)



Figure(29) : variation de l'activité de GPX (µmol/min/mg de protéine) dans le foie des lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,001).

2.1.7. Action d'oxyde de fer sur le taux de malondialdéhyde (MDA) hépatique des lapins traité pendant 2 mois

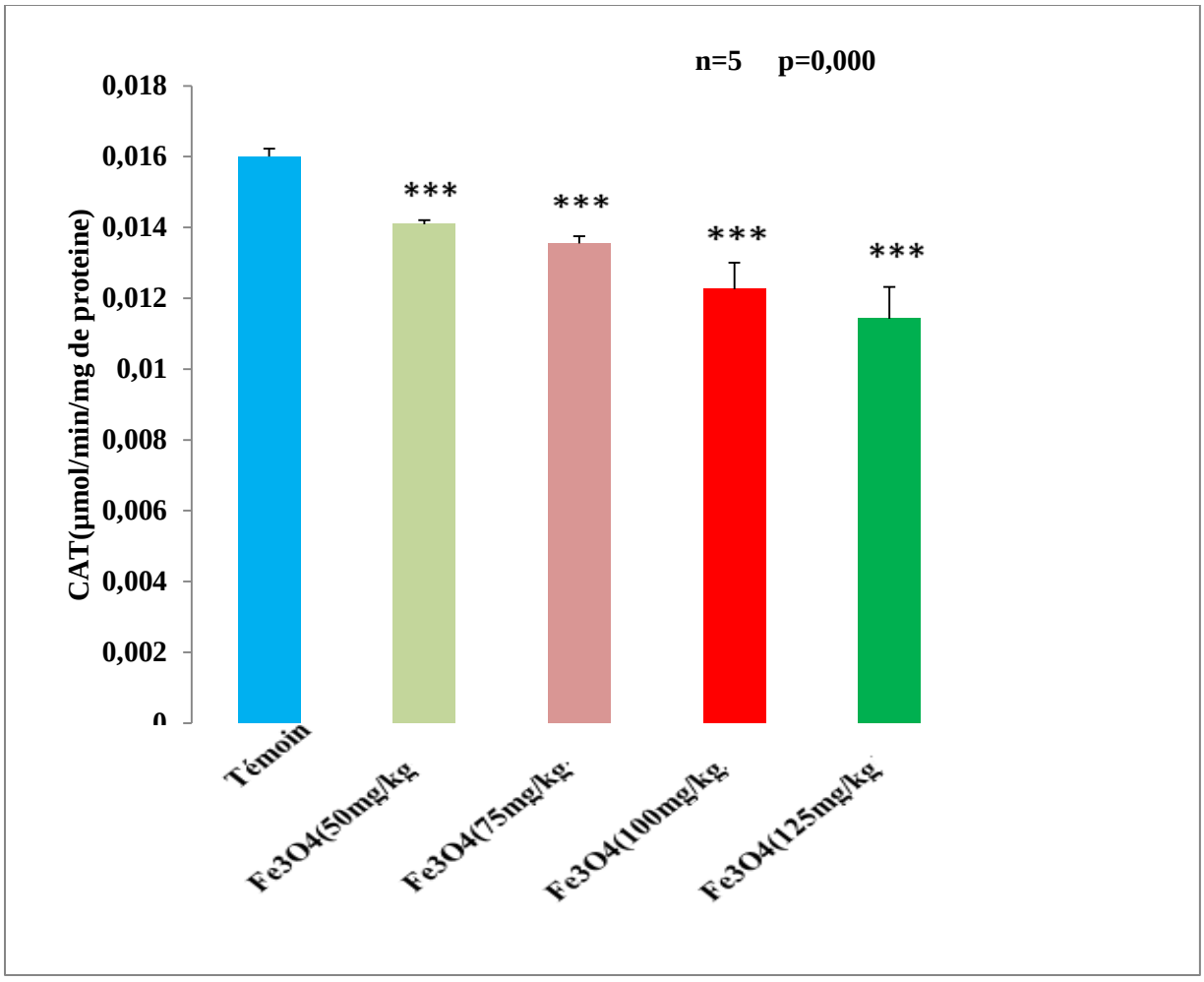
D'Après le traitement des lapins par l'oxyde de fer a des dose différent (50-75-100 125mg/kg/jour) pendant 2 mois entraîne une augmentation très hautement significative (P≤0,001) de la teneur en malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg/de protéine) hépatique, dans tous les lots,par rapport au lot témoin.(Tab 03, Fig. 30)



Figure(30) : Variation de la teneur tissulaire en MDA (nmol /mg de protéine) hépatique des lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,001).

2.1.8-Action d'oxyde de fer sur l'activité de catalase (CAT) chez les lapins traité pendant 2 mois

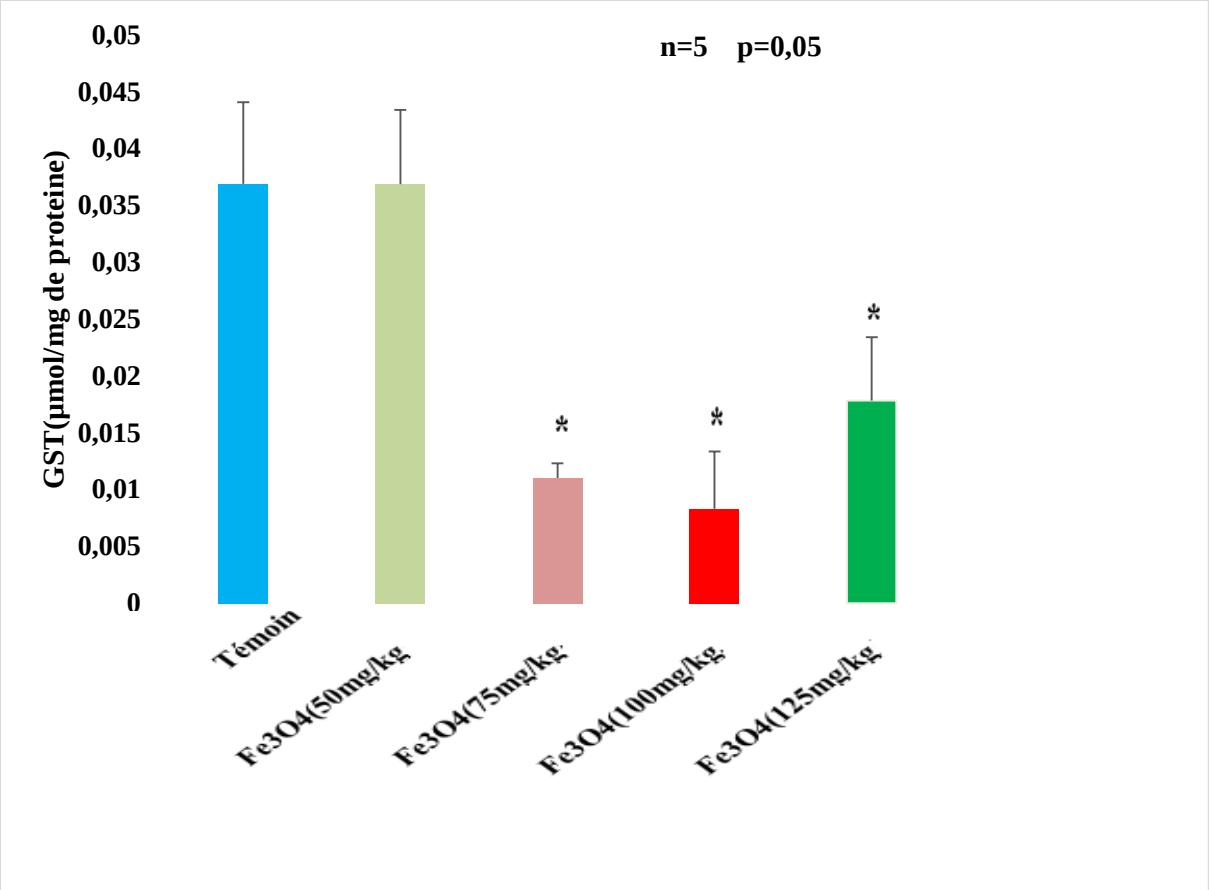
D'Après le traitement des lapins par l'oxyde de fer à des doses différentes (50-75-100 et 125 mg/kg/jour) pendant 2 mois entraîne une diminution très hautement significative (P≤0,001) de l'activité du catalase (CAT) dans le foie, dans tous les lots,par rapport au lot témoin (Tab 03, Fig. 31).



Figure(31) : Variation de l'activité de CAT (µmol/min/mg de protéine) dans le foie chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).

2.1.9. Action d'oxyde de fer sur l'activité enzymatique de glutathion -S-transférase (GST) hépatique des lapins traités pendant 2 mois

L'administration du l'oxyde de fer a des doses différents (50-75-100 et 125mg/kg/jour) pendant 2 mois chez les lapins induit une diminution significative (P≤0,05), par contre le lot traité par la dose « 50mg/kg/j » ne présente aucune différence significative par rapport témoin (Tab 03. fig. 32).



Figure(32) : Variation de l'activité de GST (µmol/mg de protéine) dans le foie des lapins témoins et traités après 2 mois (P≤0,05).

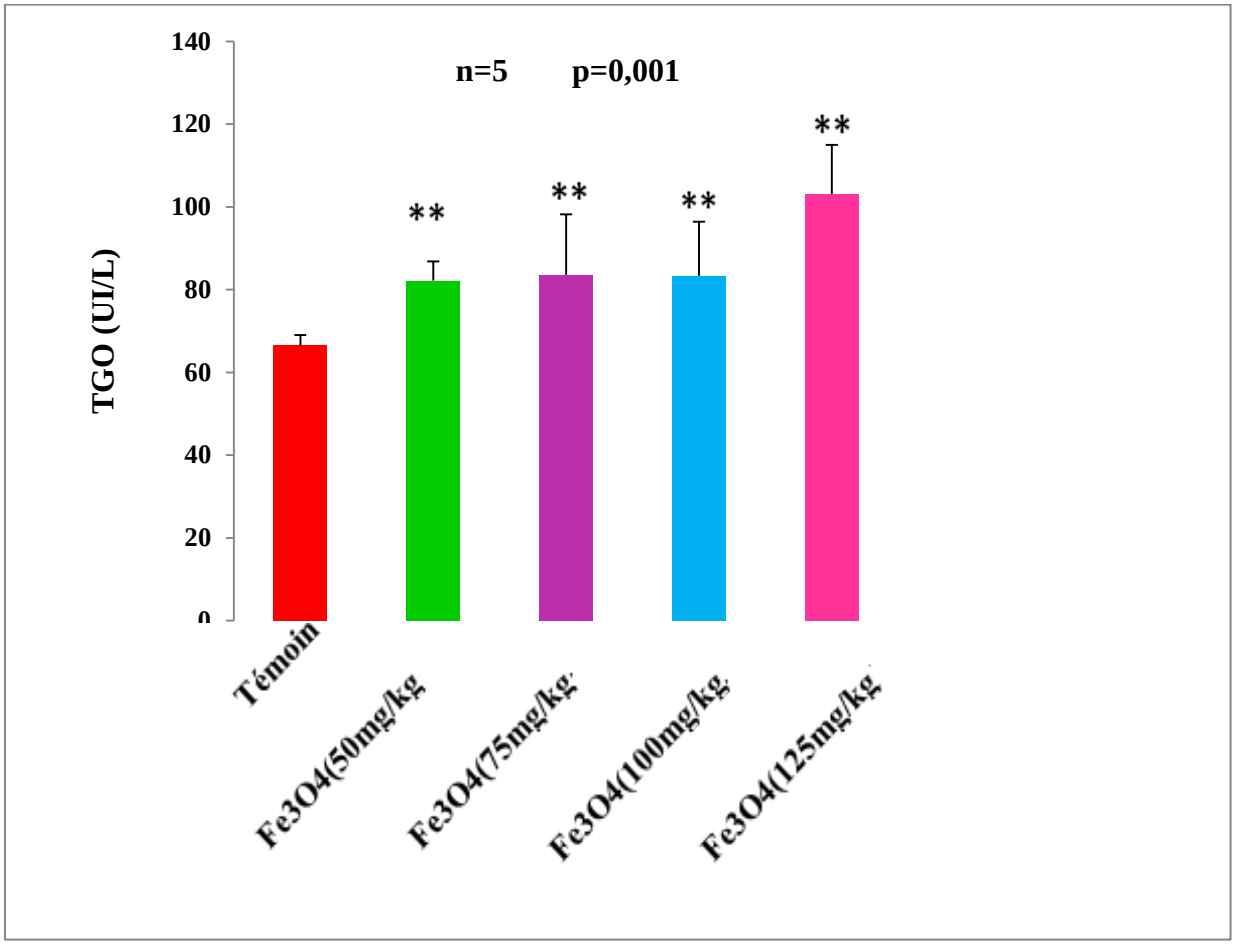
3-Effet de traitement par l'oxyde de fer sur l'activité enzymatique des transaminases (TGO et TGP) des lapins

Tableau 04 : Variation des transaminases **(TGO, TGP)(UI/L)** des lapins témoins et traités par l'oxyde de fer après 2 mois.

Lots expérimentaux					
Paramètres	**Témoin**	**Fe3O4 (50mg/kg)**	**Fe3O4 (75mg/kg)**	**Fe3O4 (100mg/kg)**	**Fe3O4 (125mg/kg)**
TGO(UI/L)	66,6 ±2,408	82,168 ±2,806 **	83,566 ±2,922 **	83,362 ±2,613 **	103,16 ±2,373 **
TGP(UI/L)	28,5 ±1,118	39,74 ±0,749 ***	41,542 ±0,992 ***	24,45 ±0,654 ***	42,116 ±0,735 ***

3.1. Activité de TGO

Les résultats obtenus révèlent une augmentation hautement significative (P≤0,01) de l'alanine aminotransférase (TGO) chez les lots traites par les doses (50-75-100-125 mg/kg/J) par rapport aux témoins (tab 04, Fig. 33).



Figure(33) : Variation des transaminases **(TGO) (UI/L))** hépatique chez les lapins témoins et traités après 2 mois. (P≤0,01).

3.2. Activité de TGP

Les résultats obtenus révèlent une augmentation très hautement significative (P≤0,001) de (TGP) dans tous les lots traites par les doses (50-75-100 et 125 mg/kg/J) par rapport aux témoins (Tab.04, Fig.34).

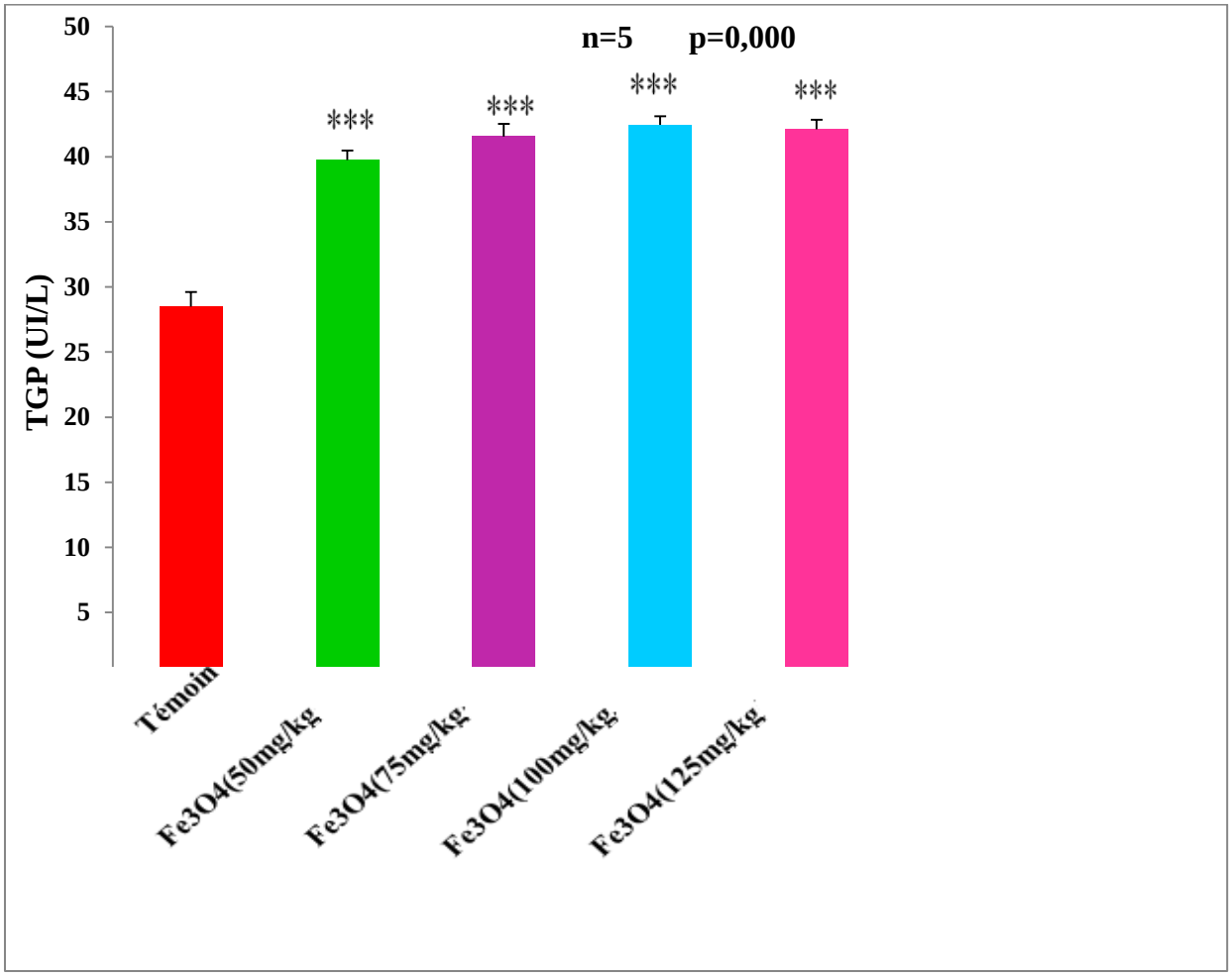


Figure (34) : Variation des transaminases (**TGP (UI/L))** hépatique chez les lapins témoins et traité après 2 mois (P≤0,001).

Discussion

Les nanoparticules peuvent se retrouver dans tous les compartiments environnementaux (eau, sol et air). Par conséquent, l'ensemble des espèces de la Chaîne alimentaire, peut être exposé aux nanoparticules. L'accumulation des polluants anthropogéniques dans le réseau trophique avait déjà été montrée (**Thomann, 1989),** il est important d'évaluer le comportement des nanoparticules manufacturées dans les populations d'organismes constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire
(Angélique, 2008).

Les paramètres biochimiques chez les organismes exposés aux contaminants toxiques ont été utilisés comme biomarqueurs et peuvent constituer un importante outil de diagnostic pour évaluer l'exposition et les effets des xénobiotiques **(Forbes *et al*., 1997; McLoughlin et al., 2000).**

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les RL sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique) **(Boussekine, 2014).**

1- Effet d'oxyde de fer Fe3O4 (NPs) sur le poid relatif de foie et les paramètres biochimiques sanguins (transaminase : TGO et TGP)

Les transaminases (ou amino transférases) sont des enzymes hépatocytaires (originaire du foie), dont la fonction est de catalyser des réactions de transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé à un acide alphacétonique.

- ✓ Transaminase Glutamate Oxaloacétique (TGO) ou AspertateAminotransférase (ASAT).
- ✓ Transaminase Glutamate pyruvate (TGP) ou Alanine Aminotransfirase (ALAT) Ces transaminases se trouve dans le foie, les reins, le cœur les muscles squelettiques. **(Astier- the fenne *et al*., 2001) (Ardle *et al*., 2004).**

Notre étude a montré que l'exposition au nanoparticule de Fe_3O_4 (NPs) à des doses différentes pendant 2 mois de traitement. Diminution non significative de poids relatif du foie ($p>0,05$) par rapport au témoin. Ceci explicable ; d'une part par l'hypertrophie tissulaire ou hépatomégalie et la destruction des cellules hépatiques, L'infracteur de myocarde et de myopathie. Aussi l'augmentation de TGP résulte d'une hépatite virale ou microbienne et l'hépatite toxique ou médicamenteuse **(Saidi, 2007).**

Associe à une augmentation modéré des transaminases (TGO) signe d'une inflammation, nécrose, cirrhose et altération hépatique, ces résultats qui confirmé par les travaux de **Yu-Mei *et al*. (2009)**

D'après les analyses médicales des transaminases TGO, TGP sériques on observe une augmentation très hautement significative dépendant de la dose.

Aussi la diminution des poids relatifs des organes des animaux est indicatrice de la toxicité de la substance utilisé au cour du traitement. Nos résultats sont accord avec les données bibliographiques de **Aouachria et Aounalla, (2015)** et l'augmentation significative observée dans le taux de ces enzymes indique une lésion des cellules hépatiques et l'accumulation des acides aminés comme l'alanine dans le sang provenant de la dégradation des protéines du corps.

Cette suggestion été appuyé par les résultats de **Aicha et Elham, (2000)** qui ont attribué ces augmentation dans les activités de TGO et TGP sérique aux changements dégénératifs et les effets destructeurs Fe_3O_4 (NPs) sur les tissus hépatiques par conséquent, libérant leur enzymes intracellulaire dans la circulation sanguine.

Autre étude qui explique cette résultat: le mécanisme de cytotoxique induit par le cadmium, dans les hépatocytes qui a démontré que le cadmium induit une augmentation des transaminases ce qui induit une lésion hépatique et s'explique par la fuite des enzymes de tissu vers le plasma due à l'altération de perméabilité membranaire.

Et aussi ces résultats sont ont accord avec les donnés bibliographiques de **pari et Murugavel, (2005)** chez les poulets et **Tandon, *et al*., (1992),** chez les rats qui ont déclaré l'augmentation de ces enzymes.

2- *Effet d'oxyde de fer Fe_3O_4 (NPs) sur les métabolites tissulaires (glucides, lipides et proteines)*

Les glucides, communément appelés sucres, sont une source essentielle d'énergie pour l'organisme. Ils sont apportés via l'alimentation grâce à la destruction des aliments en nutriments par les enzymes digestives et absorbés au niveau intestinal. Ils peuvent être utilisés directement par l'organisme ou stockés sous forme de glycogène dans les muscles et le foie pour constituer des réserves rapidement mobilisables.

Le traitement par le Fe_3O_4(NPs) a diffèrent dose (50, 75, 100 et 125 mg/kg/J) pendant 2 mois chez les lapins est capable de modifier les taux généraux des métabolites hépatiques en comparaison avec de témoin, ces modification reflètent une perturbation générale de métabolisme qui est en encorde avec le travail de **(Rouabhi, 2007).**

L'augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) de taux des glucides hépatiques chez les lapins traité par la dose 50mg/kg/j par contre les autres lots en observe une augmentation non significative, en explique augmentation par les effets inhibiteur Fe_3O_4(NPs) sur l'activité enzymatique et l'arrêt de la chaine de transport. Résultant une accumulation endocellulair du glucide.

Les lipides sont des molécules organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme benzène, chloroforme, éther…, ils sont caractérisés par la présence dans la molécule d'au moins un acide gras ou chaîne grasse. Sont rattachés aux lipides, en raison de leur insolubilité dans l'eau, le cholestérol, les stéroïdes, la vitamine D.

Nos résultat révèlent une diminution significative($P \leq 0.05$) chez les lapins traite par Fe_3O_4 (NPs) a diffèrent dose par rapporte au témoin. Cette diminution expliquée par la dégradation des lipides hépatiques par l'activation de la peroxydation lipidique. Celle voie stimule par les radicaux libres en cas de stress oxydatif génère par le Fe_3O_4 (NPs) notre résultat confirmé par le taux de l'MDA dans le foie (augmentation significative) **(Ferrat et *al*., 2003)** chez les lots traite par rapport au témoins.

Il montre également les résultats de l'utilisation du cadmium mêmes résultats **(Gasmi, Torchane, 2014)**

Dans notre travail, nous avons mis en évidence que le taux des protéines dans le foie augmente très hautement significative d'une manière dose –dépendante en présence

deFe_3O_4(NPs), ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Peccini et *al*,. 1994, Masaya et *al*., (2002*)*** qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins).

Les effets expliqués par l'induction de la synthèse des protéines de stress par les effets de la peroxydation lipidique généré par ROS **(Michaet et al., 1982).**
Notre hypothèse est que l'augmentation du taux de protéines totales pourrait être liée au déclenchement du processus de détoxication mis en jeu par ce système de régulation, qui se compose d'enzyme, des protéines et de molécules antioxydants **(Nzengue, 2008).**

3- Effet d'oxyde de fer Fe_3O_4 (NPs) sur les paramètres biochimiques tissulaires (MDA, GSH, GST, GPx et CAT)

L'MDA C'est un marqueur génère secondairement par la peroxydation lipidique provoquée par une altération de la membrane plasmique à travers l'attaque des acides gras polyinsaturé.

Cette lipoperoxydation membranaire semble dépend de l'organe qui accumule le plus de métal, et due à un effet indirect de Fe_3O_4 (NPs) par les radicaux libres **(Aouachria et aounallah, 2015).**

Au cours de notre travail nous avons enregistré une augmentation très hautement Significative de taux de MDA hépatique chez les lapins traite par le Fe_3O_4(NPs) par rapport au témoin.

Ce résultat est confirmé par les études de ***El –Sharaky, et al*., (2007)** ; qui présent le rôle de sélénium dans le traitement d'intoxication rénal par le cadmium.

Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés (souvent endogènes), et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion. Cette propriété réside dans sa grande capacité de détoxifier un grand nombre de composés dont l'organisme vivant n'a pas besoin. Ces composés nuisibles peuvent être endogéniques (métabolites actifs des hormones), ou exogéniques (métabolites toxiques des xénobiotiques).

De notre travail le traitement par les différentes doses d'oxyde de fer Fe_3O_4 (NPs) chez les lapins pendant 2 mois résulte une diminution non significative de taux de GSH dans tous les lots expérimentaux par rapport au témoin.

En explique cette diminution probablement par :

- L'absence d'utilisation de GSH par l'enzyme GPX et GST inhibée.
- Ou d'une modification structurale au niveau de GSH (effet directe d'oxyde de fer ; fixation de Fe_3O_4 (NPs) aves le substrat GSH).

La diminution du taux de la GSH a été également signalée chez plusieurs espèces animales traitées par divers xénobiotiques : Selon **Drarja-Beldi et Soltani, (2003) ; Zaidi, (2005),** l'exposition des poissons femelles de *G.affinis*au diflubenzuron provoque également une réduction du taux de GSH hépatique. **Wistar (*Ratusratus)*, Merzoug, (2005)**, a observé également après 45 jours de traitement, une diminution de la teneur hépatique en glutathion. Une diminution de la GSH a été rapportée par **Thoma** et **Wofford, (1984)** chez le Mulet (*Mugilcephalus*) après une exposition à un mélange de cadmium et de mercure.

La GST est une enzyme qui catalyse dans le cytosol la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère électrophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire qui est le glutathion **(Habig et *al*.1974).** Cette enzyme a été employée dans le laboratoire et dans les études sur terrain comme biomarqueur pour plusieurs contaminants **(Alman*et al.*, 1998 ; Fenet, 1998 ; Yu*et al*., 2000 ; 2002).** En marge de la GST cytosolique, il existe la GST membranaire, une isoenzyme qui est activée par les espèces réactives de l'oxygène. Elle participe à la protection cellulaire vis-à-vis des dommages induits par des molécules oxydantes **(Aniya et Anders, 1989).**

De notre travail le traitement par les différentes doses d'oxyde de fer Fe_3O_4 (NPs) chez les lapins pendant 2 mois résulte une diminution significative de taux de GST dans tous les lots expérimentaux par rapport au témoin.

L'induction de l'activité de la GST a été observée par **Leinio *et al*. (2005)** chez *Perna viridis*exposé aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et aux pesticides organochlorés et par **Yao *et al.*, (2002)** chez *Sogatellafurcifera,* un insecte ravageur de riz récolté au niveau du site pollué de Zhejianj (Chine).

D'après les résultats de notre travail, nous constatons que la diminution significative de l'activité de GST est accompagnée de la diminution non significative du taux de GSH.
L'inhibition de l'activité de GST s'explique par la carence et l'absence de biotransformation des xénobiotiques et des substances androgéniques. La GST joue donc un rôle important dans la neutralisation et la détoxication de certains xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité et en facilitant ainsi leur élimination **(Vander et *al*., 2003).**

La catalase est une enzyme du système antioxydant. Elle est majoritairement localisée dans le cytosol et dans les péroxysomes principalement du foie et des reins où elle catalyse la réduction du péroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Sa rapidité est l'une de ses caractéristiques, elle peut convertir 40 millions de molécules de péroxyde d'hydrogène en une seule seconde.

Elle apporte une information importante quant à l'exposition des organismes à des polluants inducteurs de stress oxydant et à leur capacité de défense vis-à-vis de ce dernier. Elle peut être mesurée soit par détermination monomérique de l'oxygène dégagé soit par dosage par le permanganate du H_2O_2 non transformé.
Dans notre travail les résultats ont montré que les différentes doses de Fe_3O_4 (NPs) utilisées ont causé une diminution très hautement significative de l'activité de catalase dans le foie des lapins.

D'autres études montrent une diminution de l'activité CAT **(Ognjanovie et al, 2008.)** chez les rats après la contamination par (15mg/kg de masse corporelle sur jour) de cadmium, une augmentation de la CAT a été aussi observée chez les poissons R*hamdia quelen* après 7 et 14 jours du traitement par le cadmium **(Pretto, *et al*., 2011)**.

L'activité du système antioxydant subit une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress (**Winston. 1991).**

Parmi ces systèmes de défense enzymatiques le glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx) joue un rôle principal dans la protection de l'organisme contre les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, mais aussi des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. Une diminution très hautement significative dans le taux de GPx a été observée chez les lots traités par le Fe_3O_4 (NPs) de diffèrent dose en comparaison avec le témoin **(Zhu et al. 2010).**

En explique cette diminution par :

- La modification structurale de substrat GSH
- Ou l'inhibition d'enzyme GPx exacte le site actif

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **(Zhu et al. 2010),**utilisant l'oxyde de titane (5 et 10 mg / L) sur *Daphnia magna*, qui montre une augmentation progressive de l'activité GPx en fonction de la concentration de NPs. les mêmes effets ont été observé chez '*Helix pomatia* traités par le Cu (100 µM), ceci serait dû au mécanisme de défense primaire contre les espèces réactives de l'oxygène «ERO» qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O dans les cellules de l'hépatopancréas (**Halliwell et Chirico, 1993).**

4- Changements comportementaux et morphologiques

L'analyse des résultats a montré des changements comportementaux qui touchent les lapins après l'administration de Fe_3O_4(NPs) à diffèrent dose par rapport au temoin. Ces effets sont la réponse des résultats passés (poids relatif, GSH, CAT, MAD, GPx, GST, TGO, TGP…), parce que Fe_3O_4(NPs) capable d'induit un cas de stress par l'augmentation des radicaux libres, l'inhibition enzymatiques et la dégradation cellulaire, elle est capable de changer le comportement de ces lapins et causer plusieurs symptômes et maladies.

Le fer soit un élément essentiel à la vie, une augmentation de sa concentration en milieu cellulaire peut générer la formation de ROS **(Alberts et *al*., 1983).** Or, dans la plupart de leurs applications, les nanoparticules d'oxyde de fer sont en contact avec les cellules voire le milieu intracellulaire. Il est donc probable que les interactions nanoparticules d'oxyde de fer/cellules ne soient pas anodines. C'est notamment le cas des nanoparticules de magnétite dont la toxicité vis-à-vis des cellules humaines a été démontré **(Berry et *al*., 2003 ; 2004).** Les nanoparticules d'oxyde de fer utilisées à des fins biomédicales **(Gupta et *al*., 2005)** sont généralement fonctionnalisées en surface via le greffage de composés organiques **(Kim et *al*., 2001 ; Goetze et *al*., 2002 ; Lacava et*al*., 2002 ; Chunfu et *al*., 2004 ; Xu et *al*., 2005 ; Kim et *al*., 2005).** Cette couche organique limite les contacts directs entre le fer des nanoparticules et les composants cellulaires.

Conclusion

Apprendre de ce travail expérimental ; l'administration d'oxyde de fer (Fe_3O_4) à des doses différentes (50, 75, 100, 125mg/kg/j) de poids corporel, par gavage orale chez les lapins européen de la race (*Oryctolagus cuniculus*) pendant 2 mois de traitement. Et à en juger par les résultats obtenus à cette molécule de nanométriques d'oxyde de fer négativement affecter la machine défensive de l'organisme où vous vous couchez et inhibant l'activité enzymatique et non enzymatique comme suit :

- ✓ Une augmentation très hautement significative de taux de glucide hépatique.
- ✓ Une diminution significative de taux de lipide hépatique.
- ✓ Une augmentation très hautement significative de taux de protéine hépatique.
- ✓ Une inhibition de la teneur cellulaire en glutathion réduit (GSH).
- ✓ Une diminution très hautement significative de la teneur en glutathion peroxydase (GPx) dans le foie.
- ✓ Une augmentation très hautement significative du taux de MDA dans le foie
- ✓ Une diminution significative de l'activité enzymatique de glutathion -S-transférase (GST).
- ✓ Une diminution de l'activité enzymatique de catalase (CAT).

Suite aux changements cités on a remarqué les effets indésirables suivant :

- ✓ Une perturbation du poids corporel des lapins durant la période de deux mois de traitement.
- ✓ Infections et irritations de la peau
- ✓ Stress et nervosité et agressivité.

En perspectives, il sera souhaitable de développer cette recherche par :

- ❖ De réalise une étude histopathologique du foie.
- ❖ L'étude de la génotoxicite
- ❖ De doser d'autres paramètres de la défense antioxydant : SOD, le rapport GSH/GSSG

Bibliograpgique

A

Aisha M., Elham A. 2000. Interaction of iron, zinc and calcium with cadmium toxicity in rats and goats. J. Egypt. Vent. Med.Ass. 6: 203-218.

Aitken RJ., Creely KS., Tran CL., **2004**. Nanoparticles: anoccupationalhygienereview. Sudbury, Suffolk, Grande-Bretagne. HSE, 100p. Page d'accueil visionnée le 2/11/2004. http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr274.pdf.

Alberts B., Johnos A., Lewis Jea. 1983. The extracellular matrix of the animals. In *Molecular Biology of the cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 692-713.

Alberts, B., Johnos, A., Lewis J. 1983. The extracellular matrix of the animals. In albuminderivatisedironoxidenanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Molecular Biology of the cell*. 4 thedition. New York: Garland Science page 692-713.

Almar M., Otero, L., Santo C. GanzalezT., Gallego J. 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. J. Environ. Sci. Health., 33: 769-783.

Amara S. 2007. Effets d'une exposition subchronique au champ magnétique statistique sur le métabolisme du zinc et la toxicité du cadmium chez le rat : Rôle du stress oxydant. Thèse de doctorat. Université du 7 novembre à Carthage. Tunisie.

Angélique, S. 2008. Effets biologiques des nanoparticules manufacture: influence de leur caractéristique. 5-18.

Aniya. Y., Anders, M. 1989. Activation of rat liver microsomal glutathione S transférase by reduced oxygen species . Journal of Biological chemistry264:1998-2002.

Aouachria N., **Aounallah S. 2015**. Réponses enzymatique et biochimique après stress par le cadmium et effet oppose de selenium chez les lapins (Oryctolagus Cuniculus). Mémoire de fin d'étude (Master). Université de Tébessa. Algérie.

Aoun H., Merghadi H. 2013.Effet des vitamines E et D sur l'hématotoxicité avec le cadmium chez les lapins. Mémoire de fin d'étude(Master). Université de Tébessa. Algérie.

Astier-théfenne H., prévosto J.M.,Renard C., Cheminel V., Monnier G. 2001. l'infractus du myocard. Lyon pharmaceutique 52 pp.108-136.

B

Barouki R. 2006.Stress oxydant et vieillissement. *M/S.* 22.p.266-272

Baudin B. 2007 Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *2*. p. 43-52

Berry, C.C., Charles, S., Wells, S., Dalby, M.J. and Curtis, A.S.G. 2004. The influence of transfer in stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. International Journal of Pharmaceutics, 269(1), 211-225.

Berry, C.C., Wells S., Charles C., Aitchison S., Curtis G., A.S.C. 2003. Dextran and Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. Biomaterials, 24(25), 4551-4557.

Boczkowski J., Lanone S. 2010.Nanoparticules : une prévention est-elle possible ?, faculté de médecine de Créteil, université Paris-Est.

Borm P.J. 2002. Particle toxicology: from coal mining to nanotechnology. Inhal Toxico;14: 523.

Boussekine S. **2014**. Contribution a l'étude de l'effet du sélénium sur le mécanisme biochimique chez le diabète expérimental. Université Badji Mokhtar annaba.

Brunekreef B. 1997. Air pollution and life expectancy: is there a relation? Occup Environ Med, 54(11), 781-784.

C

Carles C. 2011. Nanotechnologies et Nanoparticules Leurs effets sur la santé**.**

Chaterjee S. and Bhattacharya S. 1984. Detoxification of industrielpolluants by the Gluthatione-S-transferasesysteme in the live of Anabas testideneus (bloch). Toxicol. Lett., 22:187-198.

Cohu G., jarry I., Arnould J., PIERRE J., Chaussade M., Legrand P. 2009. Option Générales en matière de développement et de régulation des nanotechnologies, Cahier d'docteur de l'AFNOR.

Chunfu Z., Jinquan C., Duanzhi Y., Yongxian W., Yanlin F. and Jiaju T. 2004.

Preparation and radio labeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles Formagne tically targeted therapy. Applied Radiation and Isotopes.61(6): 1255

Chuto G. Chaumet-Riffaud P.,et le Groupe Oncologie de la Société française de médecinenucléaire et imagerie moléculaire (SFMN) 2010. Les nanoparticules.

D

Debbage P., Jaschke W.sd. Molecular imaging with nanoparticles: Giant roles for dwarf actors. Histochem Cell Biol;130 p.845–75.

Delattre J., Claude jardillier J., Durand G. 2003. Biochimie pathologique aspects moléculaires et cellulaire. p60-70.

Descamps O. 2004. Stress oxydant et vieillissement : as pecs mitochondriaux et stratégies nutritionnelles anti-cancer et antivieillissement nt chez la souris OHI. Thèse effectuée au laboratoire NVMC.

Djamel Eddine B 2006. Elaboration et étude de nanoparticule au/TiO2 ET Ag/TiO2.

Dominique Larrey. 18 Novembre 2006. Réunion Paris, Service d'Hépato-gastroentérologie et Transplantation CHU Montpellier dom-larrey@chu-montpellier.fr

Donaldson K., Poland C. A. 2009. Nanotoxicology: New insights into nanotubes. Nat Nanotechnol. 4: p 708–710.

Drarja- Beldi H.et Soltani N. 2003. Laboratory evaluation of dimilin on growth and Glutathione activity in mosque to fish, a non-target species. Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, 68 (4a): 299-304.

E

Egerszegi O. C. 2005. Une recherche de qualité, moins d'expériences sur les animaux. Conseillère nationale, vice-présidente de la Fondation Recherches 3R. p19.

Elsaesser A., Howard CV. 2011. Toxicoloy of nanoparticles.

Elsaesser A., Howard CV. 2011. Toxicology of nanoparticles Adv Drug Deliv Rev. et du zinc : place des métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat, Université JOSEPH foodchains. *Environmental Science &Technology*, 23 : 699-707.

F

Favier A. 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur, 55 (1). Pp. 9 – 16.

Favier A. 2003. Le stress oxydant. *L'actualité Chimique. P.*108-115

Favier A. 1990 Métabolisme du cuivre 10359 C 10 et métabolisme du zinc (10359 D 10), Encyclopédie Médico-chirurgicale. Édité par Éditions Techniques.

Favier A., Arnaud Fauve J. 1986. Le zinc en médecine et biologie. Ed. Médicales Internationales. Pp 301.

Fenet H., Casellas C., Bontoux J. 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow tout. Ecotoxicol. Environ. Saf. **40:** 137-143.

Ferrat L., Pergent martini C., Romèo M. 2003. Assessement of the use of biomarks in aquatic plants for the evaluation of environment quatity: Application to sea grasses. Aquatic. Toxico. 65: 187-207.

Fontan J., Blanc D., Bouville A. 1965. Détermination du rendement de collection des filtres à fibres pour des particules ultrafines. Health Physics, vol. 11, p 15-20.

Fontan J., Tymen G. 2003.Propriétés mécaniques et physiques d'un aérosol. Pollution Atmosphérique, n°178, p 167-176.

Forbes, V.E., Depledge M.H. 1992. Cadmium effects on the carbon and energy balance of mudsnails. *Marine Biology*, 113, 263-269.

G

Garait B. 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse du doctorat. Université Joseph Fourier. Grenoble. France. Pp 74-99.

Garait B. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse du doctorat. Université Joseph Fourier. Grenoble. France. **2006.** Pp 74-99.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique,* -novembre-décembre. Pp 91 -96.

Gasmi S., Tourchane M. **2014.** Effet opposé de Sélénium sur la toxicité de Zinc sur les paramètres biochimiques chez les lapins *(Oryctolagus cuniculus)* Mémoire Master. Université de Tébessa. Algérie.

Gilles L. 2006. les nanoparticules connaissance actuelle sur les risque et les mesure de prévention en sante et en sécurité du travaille**.** Page 6-9.

Goetze T., Gansau C., Buske N., Roeder M., Gornert P. and Bahr, M. 2002. Biocompatible magnetic core/shell nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic

Greedon J.E. 1994. « *Magnetic oxides in Encyclopedia of Inorganic chemistry* » Ed. R. Bruce King, John Wiley& Sons.

Gupta K. and Gupta, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 26(18): 3995

Gupta K., Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. Jun; 26(18):3995-4021.

Materials. 252: 399

H

Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jacoby, W.B. 1974. Glitathion S- trasferases: the first enzymatic step in mercapturic. 249, Pp: 7130-7139.

Haleng J., Pinccmail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J. P. Le stress oxydant. *R*ev *Med Liège.* 62 (10). **2007. P**p 628-638.

Hett A. 2004. Swiss Re on risk: nanotechnology. Armonk, N.Y. Corporate Communications. Page d'accueil visionnée le 28/06/2004. http://www.swissre.com/INTERNET/pwsfilpr.nsf/vwFilebyIDKEYLu/FSTN5Z4MTD/%24FILE/Nanotechnology_US_brochure.pdf.

Hininger-Favier I., Roussel A.M. 2009.Éléments-trace essentiels en nutrition humaine : chrome, sélénium, zinc et fer. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris),- Endocrinologie Nutrition. 10-359-B-10. 1 -16.

Hofmann M., Amten b., Hofmann H., Montet X. 2010. Superparamagnetic nanoparticles at olfor early diagnostics**.**

Hofmann., Amtenbrink M., Hofmann H., Montet X. 2010. Superparamagnetic nanoparticles a tool for early diagnostics. Swiss Med Wkly.: 140: w 13081. doi: 10.4414/smw. 13081.

Holister P., Roman V., Harper T. 2003. Bottom-up production techniques.Technology White Papers Cientifica, 9 p. Page d'accueil visionnée le **26/04/2004**

K

Kim D., El-Shall H., Dennis D. and Morey T. 2005. Interaction of PLGA nanoparticles withhumanblood constituents. Colloid Surface B. 40(2): 83

L

Laurent S., Delphine F., Marc P., Alain R., Caroline R., Luce Vander E., et *al*., 2008. MagneticIron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and BiologicalApplicationsChem.Rev. 108; 2064-2110.

Leineo S., Lehtoten K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in tfe bivalves Mytilus edilus and MacomaBalthica from the northen Baltic sea. Comp.Biochem.Physiol.C Toxicol.Pharmacol., 140: 408-21.

M

chemistry. **19:** 2085-2092.

Marchal F., Pic E., Pons T., Dubertret B., Bolotine L., Guillemin F. 2008. Quantum dots in oncological surgery: The future for surgicalmar ginstatus.**;** 95:p.1149–53.

Mavon A., Miquela C., Lejeune, O. et *al*., 2007. In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen, Skin Pharmacol Physiol, 20, 10-20.

Maynard A., Maynard R. 2002. A derived association between ambient aerosol surface area and excess mortality using historic time series data, Atmospheric Environment, 36, 5561-5567.

Mcloughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M and Yu H. 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environmental toxicology and

Merzoug S., 2005. Effet de la toxicité mercurielle chez le rat male Wistar ratusratus: Aspect pondéral, biochimique et histologique.Université d'ANNABA. Algerie.

Muriel C. 2010. Les maladies transmissibles des lapins de garenne *(Oryctolagus cuniculus)* en liberté. Thèse en médecine de l'université Claude-Bernard - Lyon I.

Myriam R., Olivier W., 2012. Les Nanomatériaux **,2e édition, INRS.** p11

N

NaqviM S., Abdin M., Ahmed F.J., Maitra A., Prashant C., Dinda AK. 2010. Concentration dépendent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. IntJ Nanomedicine**.**

Nchare A. 1990. Les organes thoraciques des lapins domestiques, anatomie descriptive et topographique.Université Cheikh AntaDiop Dr Dakar. Sénégal. Pp03.

Norman N., Green w., Alan E. 1997. « *Chemistry of the Elements* » 2eédition, Butterworth-Heinemann, Oxford.

Nzengue, Y. 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionines et de P53. Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France. 299 p.

O

Ognjanonie B.I., Markovité S.D., Pavlovité S.Z., Zikic R.V., Stajn .A. S., Saicié Z.S. 2008. Effet de l'exposition chronique de cadmium sur le systéme de défense antioxidant dans certain tissus de rats .effet protecteur du sélénium. Physiol Res. 57(3) : 403-11

Orsay C., proust N. 2013. Ingénieur de Recherches Consultante, nanoparticules dans les produits de la vie quotidiennepage 6-7.

Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., and Ménard, L. 2008. les effets sur la santé relies aux nanoparticules. Technical report, IRSST-Intitut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.

P

Pari L., Murugavael P. 2005. Role of diallyltetrasulfide in ameliorating the cadmium induced biochemical changes in rats. Environ. Toxicol.Pharmacol. 20: 493-500.

Pastre J. 2005. Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire, Toulouse. Pp 55-42.

Peters A., Wichmann H. E., Tuch T., Heinrich J., and Heyder J. 1997. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles, Am J Respir Crit Care Med, 155(4), 1376-1383.

Pinccmail J., Haleng J., Defraigne O., Charlier C., Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. *R*ev *MedLiège.* 62 (10)**.,** Pp 628-638.

Pretto A., Lovo V. Baldisserotto B. pavanato M. A., Moraes B.S. Menezes C., et al., 2011. Effet of Water Cadmuim Concentration on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parametrs in Rhamdia quelen. Arch ENVIRON Contam. Toxicol. 60: 309-318

R

Rossi F. *et al*., 2006.Recherche in vitro sur la toxicologie des nanoparticules au Joint Research Center. Université d'Italy.

Rouabhi R. 2007. Impact de deux pesticides de diflubenzuron et le Flucycloxuron sur trois modèles cellulaires alternatifs: Paracemium. Sp,Tetrahymenapyriformis, Tetraselmissuccica et sur le développement embryonnaire de la poule domestique (Gallus domestics). Diss. Thèse doctorat, Option : Toxicologie appliquee. UniversiteBadji Mokhtar Annaba : 130 pages.

Russell R.J., **Schiling P.W**. **1973.** The Rabbit.Aeromed. Reus. 21. No: 6. USAF School of Aerospace Medicine, P10.

S

Saidi S. 2007. Thèse de Doctorat en Médecine : etude de la variation des parametres biochimiques et hematologiquesdans le district de bamako.

Senden TJ., Moock KH., Gerald JF., Burch WM., Browitt RJ., Ling CD. 1997. The physical and chemical nature of technegas **;** 38 p. 1327–1333.

T

Tandon S. K., Singh S., Dhawan M. 1992. Preventive effect of vitamin E in cadmium intoxication. Biomed. Environ. Ssi.5: 39-45.

Thomann V. 1989. Bioaccumulation mode of organic-chemical distribution in aquatic.

Tomalia DA. 2004. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry, AldrichimicaActa 37 (2): 39-57. Page d'accueil visionnée le 8/06/2005. http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/3760/Acta_37_2.pdf

V

Verwey E., 1939. « *Electronic Conduction of Magnetite (Fe_3O_4) and its Transition Point at Low Temperatures* »**,** p. 327-328.

W

Wang H.C., Kasper G., 1991.Filtration efficiency of nanometer-size aerosol particles.J. aerosol Sci., , vol 22, n°1, pp 31-40

Wang X., Yang L., Chen ZG., Shin DM. 2008. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging ; 58 p.97–110.

Wolf F.S.P., B axal Z.A., w Hunt J.V. 1989. Autoxidative glycosynation: free radicals and glycation theory. Frog. Clin. Res. 304:259-750



Xu M., Deng G. F., Liu S. S., Chen S., Cui D., Yang L.M. and Wang Q. Q. 2010. Free cadmium ions released from CdTe-based nanoparticles and their cytotocity on phaeodactylum tricornutum. Metallomics. 2(7), 469-473.



Yao H., Jiang C., Ye G., Cheng J. 2002. Insecticide resistance of different populations of white-backedplanthpper, Sogatellafurcifera (Horvath) (Homoptera: Delphacidae). Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. **13**:101-5.

Yezhelyev V., Gao X., Xing Y., Al-Hajj A., Nie S., Oregan RM. 2006. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. Lancet Oncol.p657–667.

Yu S.J. 2002. Substrate specificity of glutathione S-transférase from the fall armyworm. Pesticide Biochemistry and physiology., **74**: 41-51

Yu S.J. and Abo-elghar G.E. 2000. Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione Stransférasein the fall armyworm. Pestic.Biochem.And Physiol., **68:**173-183.

Yu-mei Z., Xue-zhong L., Hao L., Li M., and Zong-ping L. 2009. Lipid peroxidation and Ultrastructural Modifications in Brain after perinatal Exposure to Lead and/or Cdmium in Rat Pups1.biomedical and enviremental sciences (22): 423-429.



Zaidi N. 2005. Effets secondaires d’un insecticide sélectif (Dimilin) sur un organism non ciblé, Gambusia affinis: croissance, activités enzymatiques et analyse par CLHP des résidus. Mémoire de Magistére. Université d’ANNABA. Algérie.

1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatiques

Tableau 05: *Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatiques*

	Tubes					
Solutions	1	2	3	4	5	6
Solution mère (glucose) (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

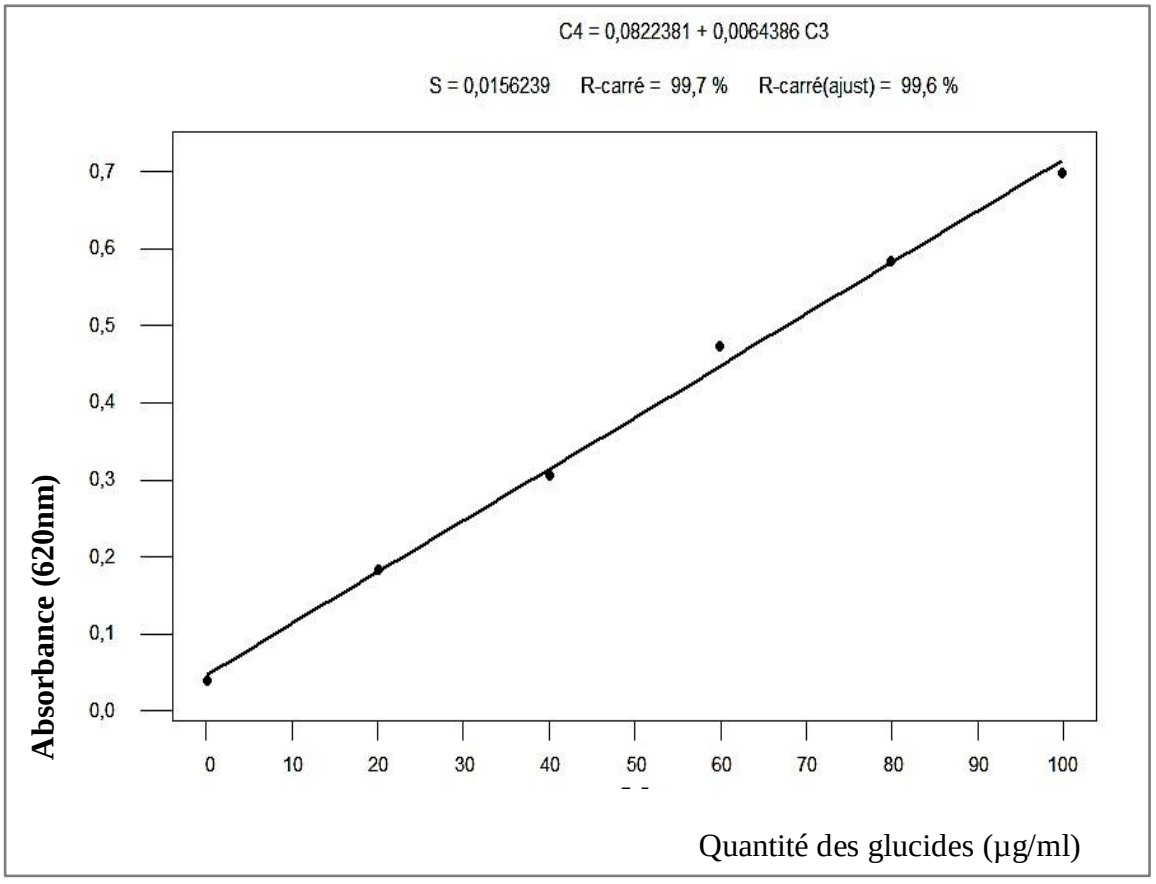


Figure 35: *Courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides hépatiques.*

2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatiques

Tableau 06: *Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides hépatiques*

	Tubes					
Solutions	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

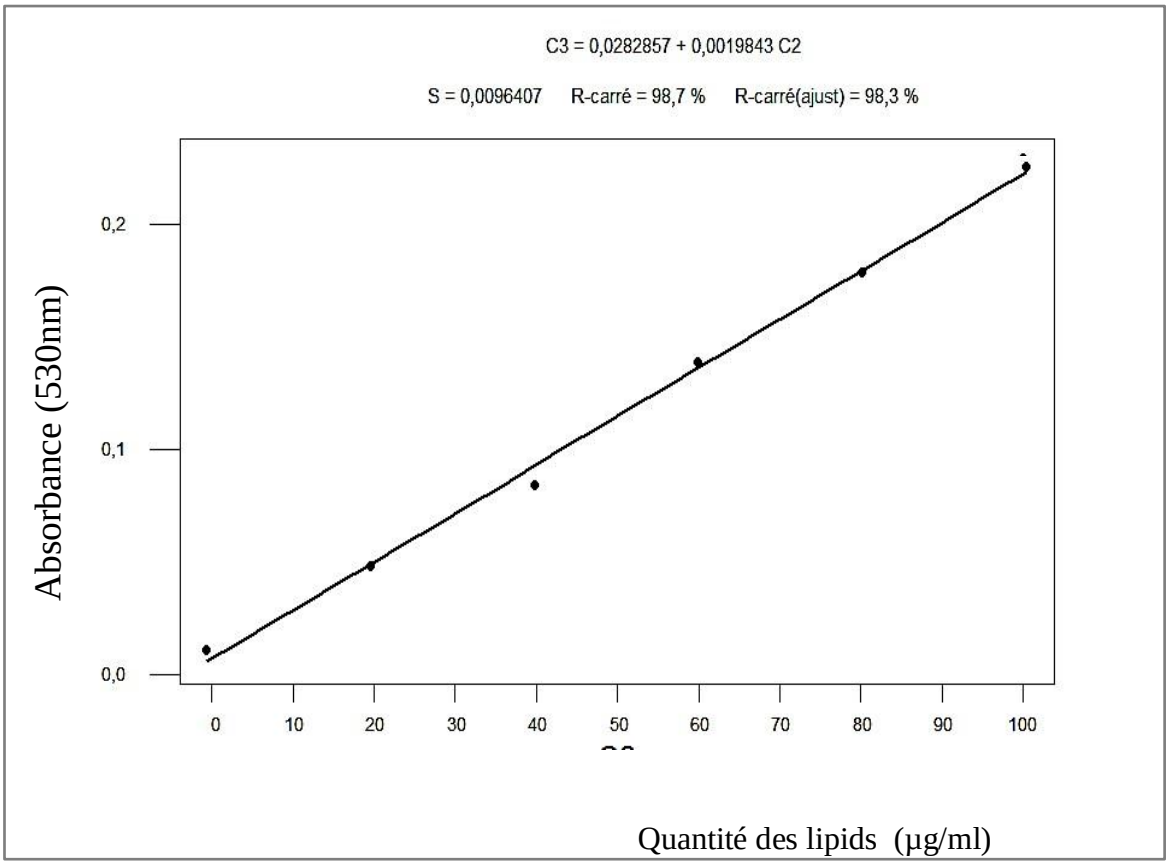


Figure: 36 *Courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides tissulaires.*

.

3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines tissulaires

Tableau 07: *Réalisation de courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines tissulaires*

	Tubes					
Solutions	1	2	3	4	5	6
Solution mère de l'Albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

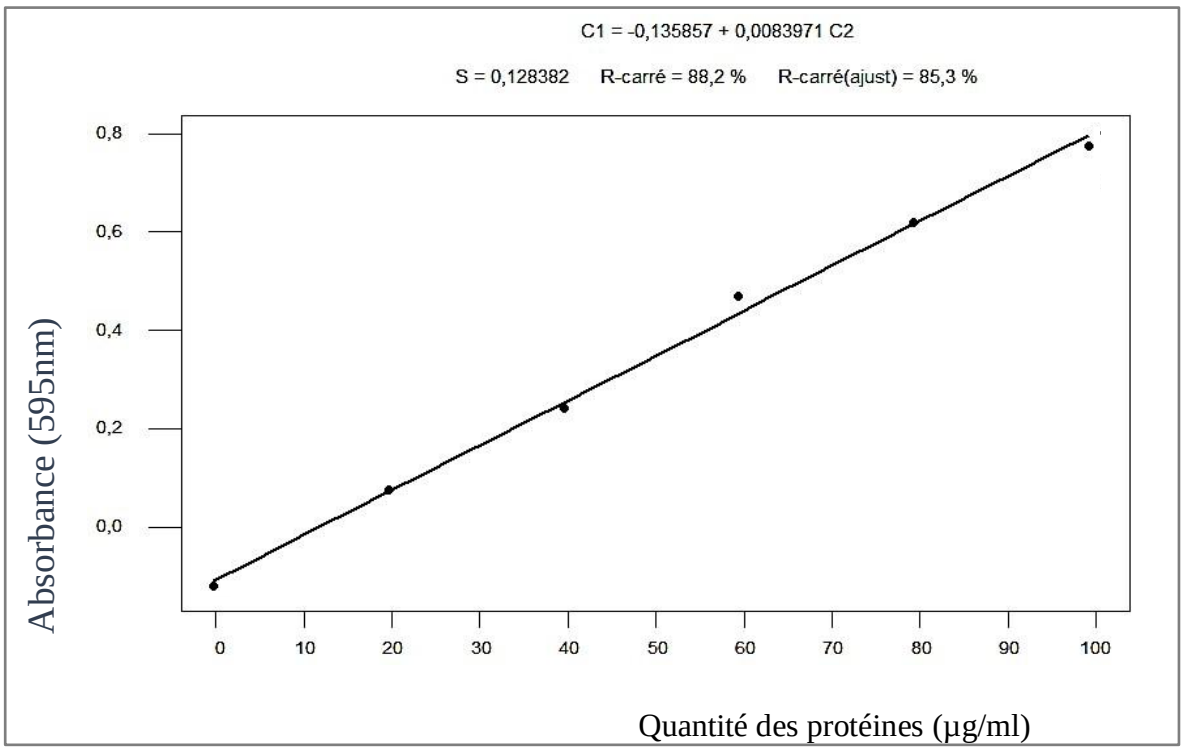


Figure 37: *Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines tissulaire*