



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire N série:.....
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمّة لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar - El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences
biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

Effet de la quercétine et l'extrait flavonoïdique de *Camellia sinensis* sur des rattes Wistar traitées par les nanoparticules d'oxyde de fer (NPsFe₂O₃)

Présentés Par :

Rahaim Sana & Salem Nadjett

Devant le jury composé de :

Président : Mr. Bouali N. M.A.A, Université d'El Oued.
Examinatrice : M^{me}. Toumi I. M.A.A, Université d'El Oued.
Promotrice : M^{me}. Aouimeur M. M.A.A, Université d'El Oued.

Année universitaire 2016/2017

Dédicaces

Une dédicace particulière et sincère à notre enseignant Mme AOUIMEUR Meriem

Je Dédie ce modeste travail

*À ma cher mère BEN NADJI ZOHOUR et mon cher père ABD ELMADJID pour leur
endurance et leurs sacrifices sans limites*

*À me frère: ABD ELLATIF et mes sœurs: HANA, SABRINA et KENZA, en
reconnaissance de leur affection toujours constante*

À tous mes proches, mes amis, mes camarades de promotion

Sana

Je Dédie ce modeste travail

*À ma cher mère AMMARI LUIZA et mon cher père MOHAMED, pour leur endurance et
leurs sacrifices sans limites*

*À mes frères: BOUKARI, SALIM, SAIF EDDINE et ALIN EDDINE et mes sœurs:
FARIDA et HOUDA, en reconnaissance de leur affection toujours constante*

À tous mes proches, mes amis, mes camarades de promotion

Nadjett

Remerciement

*Au terme de ce travail, nous remercions le **BON DIEU** tout puissant qui nous a donné la force et la volonté d'achever cette réalisation et nous lui rendons grâce.*

*Louanges et remerciements à **ALLAH** qui nous a permis au jour d' huit de nous rassembler pour soutenir ce modeste travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à notre maître **AOUMEUR Meriem**, pour avoir accepté de nous encadrer, pour son suivi et ses conseils.*

*Nous exprimons aussi nos remerciements à **Mr. BOUALI Noureddine**, qui nous avons fait l'honneur de présider ce Jury et à **M^{me}. TOUMI Ikram** d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux.*

*On adresse nos sincères remerciements à **Mr. DEROUCHE Samir** pour son suivi et ses conseils. Aussi pour son soutien, son attention, son qualités humaines.*

*Nous tenons à remercier profondément tout qui nous aide pour faire ce travail, et surtout tous les travailleurs du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Echahid Hamma Lakhdar d'EL-OUED, et tous les travailleurs du laboratoire d'établissement hospitalier public **DJILANI BEN OMAR** d'EL-OUED.*

Nous n'oublions pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Ainsi que tout les personnes ayant participées de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SANA

NADJETT

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'extrait flavonoïdique de la plante *Camillia sinensis* et de la quercétine sur certains paramètres biochimiques, hématologiques d'une part, et d'autre part sur le stress oxydant et structure tissulaire du foie et des reins, chez des rattes Wistar contaminées par les nanoparticules d'oxyde de fer (150µg/Kg), pendant 21 jours. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 20 rattes femelles de la souche Wistar répartissent en quatre lots de cinq rattes chacun dont le 1^{ère} lot sert de témoin, le 2^{ème} est un lot contaminé par le SPION, le 3^{ème} est un lot contaminé par le SPION et traité par la quercétine (10mg/Kg), et le 4^{ème} est un lot contaminé par le SPION et traité par l'extrait flavonoïdiques de thé vert (400mg/Kg).

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que le traitement par les SPION induit une surcharge en fer, hypoglycémie, augmentation d'urée, créatinine, et d'acide urique, aussi une augmentation de l'activité des transaminases (TGO, TGP), de phosphatase alcaline qui montre que le SPION induit une perturbation de fonction hépatique et rénale. Nos résultats révèlent également une toxicité hématologique et stress oxydatif chez les lots contaminés par le NPsFe₂O₃, une augmentation du taux des globules rouges, des Lymphocyte, des Monocytes, et une diminution du taux d'hémoglobine, aussi une diminution de GSH, l'activité des CAT, GST, GPx avec une augmentation du taux de MDA dans les tissus étudiés (foie, reins). En outre, les résultats obtenus d'après l'étude histologique, montre la présence d'une inflammation dans les tissus étudiés, et la présence d'un nécrose hépatique et rénal induit par le stress oxydatif. Cependant, l'administration orale de la quercétine et l'extrait flavonoïdique de thé vert a provoqué une diminution de l'effet toxique de NPsFe₂O₃ en maintenant l'homéostasie de fer dans l'organisme donc en inhibant les effets néfastes de la surcharge en fer.

Mots clés: NPsFe₂O₃, toxicité, stress oxydant, quercétine, flavonoïdes de thé vert, rattes Wistar.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير مستخلص الفلافونويدات لنبته الشاي الاخضر *Camillia sinensis* و الكرسيتين على بعض المعايير البيوكيميائية ، والدموية من جهة ، وعلى الاجهاد التأكسدي والبنية النسيجية للكبد والكلية من جهة اخرى عند بعض الفئران المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية (150 ميكرو غرام/ الكيلو غرام) لمدة 21 يوما. الدراسة التجريبية أجريت في المختبر على 20 فأرة من سلالة ويستار مقسمة إلى أربع مجموعات، خمس فئران في كل منها، حيث المجموعة الأولى شاهدة، الثانية معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية (SPION)، الثالثة معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية بالإضافة الى 10 ملغ/كغ من كرسيتين، و الرابعة معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية بالإضافة الى 400 ملغ/كغ من المستخلص الفلافونويدي للشاي الأخضر.

النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تبين أن المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية تسبب تراكم جزيئات الحديد في الجسم، نقص السكر في الدم، زيادة اليوريا و الكرياتينين وحمض اليوريك، ايضا زيادة النشاطية لنواقل الأمين (TGP، TGO)، وزيادة في نشاط الفوسفاز القلوي. و هذا يدل على اضطراب وظيفة الكبد و الكلى. تكشف النتائج التي توصلنا إليها أيضا سمية دموية و اجهاد تأكسدي عند المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية ، مع زيادة في معدل خلايا الدم الحمراء واللمفاويات، ووحيدات الفص وانخفاض في نسبة الهيموغلوبين، ايضا نقص في GSH ، ونشاطية CAT ، GST و GPx مع زيادة معدل MDA في الأنسجة المدروسة (الكبد والكلى).بالإضافة الى ذلك، فان النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة التشريحية تبين وجود التهاب مع وجود نخر كبدي وكلوي سببه الاجهاد التأكسدي . كما اثبتت النتائج ان تناول الكرسيتين والمستخلص الفلافونويدي لنبته الشاي الأخضر عن طريق الفم يؤدي الى تخفيض التأثير السمي لجزيئات اكسيد الحديد النانوية وذلك بالحفاظ على توازن تركيز جزيئات الحديد في الجسم وبالتالي يحول دون الاثار السلبية لتراكم الحديد الزائد.

الكلمات المفتاحية: جزيئات اكسيد الحديد النانوية، تسمم ، اجهاد تأكسدي، كرسيتين، فلافونويد الشاي الأخضر، فئران وستار.

LISTE D'ABREVIATION

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AST**: Aspartate Aminotransférase
- ALT**: Alanine Aminotransférase
- a-TH**: a- tocophérol
- ATP**: adénosine triphosphate
- CAT**: Catalase
- DMSO**: diméthyl sulfoxide
- DMT**: divalent metal transporter
- DPPH**: 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
- DROs** : dérivées réactives de l'oxygène
- EDTA** : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
- EPO** : érythropoïétine
- EOA** : Espèces oxygénées activées
- Fe** : fer
- Fe²⁺** : Fer ferreux
- Fe³⁺** : Fer ferrique
- FNS** : Formule de numération sanguine
- GPx**: Glutathion Peroxydase
- GR**: Glutathion Réductase
- GSH**: Glutathion réduit
- GS-SG**: Glutathion oxydé
- GST**: Glutathion-S-Transférases
- H₂O** : Eau
- H₂O₂**: Peroxyde d'hydrogène
- HCP** : Hème carrier protéine
- HO**: Hème Oxygénase
- IONPs** : Nanoparticules d'oxyde de fer
- IRM** : imagerie résonance magnétique
- LDL**: Low Density Lipoprotein
- MDA**: Malondialdéhyde
- NADPH**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
- NO** : Oxyde Nitrique
- NO[•]** : Monoxyde d'azote

O^{2•-} : Radical superoxyde

OH• : Radical hydroxyle

OHCl: Oxydants Chlorés

ONOO⁻ : Ion peroxydrite

ONOOH : acide peroxydriteux

PAF : facteur d'activation des plaquettes

PAL: Phosphatase Alcaline

RL: Radicaux Libres

ROO• : Radical peroxyde

ROOH : Hydroperoxyde lipidique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SOD : Superoxyde dismutase

SPION: Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques

TGO: Aspartate Aminotransférase

TGP: Alanine Aminotransférase

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Différentes orientations de dipôle magnétique. (a) paramagnétique, (b) diamagnétisme, (c) antiferromagnétique et (d) ferrimagnétique	05
Figure 02	Absorption intestinale du fer	08
Figure 03	Mécanisme de l'hepcidine	10
Figure 04	Principaux effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur la santé humaine	11
Figure 05	Principaux sites cellulaires de productions des ERO	13
Figure 06	Répartition des principales défenses antioxydants dans la cellule (Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) superoxyde dismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit.	15
Figure 07	Schéma des défenses antioxydants enzymatiques	15
Figure 08	<i>Camellia sinensis</i>	21
Figure 09	Structure chimique de la quercétine	25
Figure 10	Feuilles de thé vert (<i>Camellia sinensis</i>)	27
Figure 11	Protocole expérimentale de l'étude	29
Figure 12	Protocole d'extraction des flavonoïdes	31
Figure 13	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique de test DPPH	43
Figure 14	Valeurs IC50 de <i>Camellia Sinensis</i> et composé standard (acide ascorbique).	44
Figure 15	Poids relatif du foie et des reins chez le groupe témoin et les groupes traités.	45
Figure 16	Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités.	46
Figure 17	Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.	48
Figure 18	Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités.	49
Figure 19	Concentrations tissulaires de malondialdéhyde (MDA) glutathion réduit (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités.	50
Figure 20	Activités tissulaires de catalase, GST, et GPx chez le groupe témoin et les groupes traités.	52
Figure 21	Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, indique les changements morphométriques après traitement par la dose de SPION, agrandissement x40	53
Figure 22	Observation microscopique d'une coupe histologique de rein, indique les changements morphométriques après traitement par la dose de SPION, agrandissement x40	53

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Principales espèces oxydantes	13
Tableau 02	Mode opératoire de dosage de glycémie	34
Tableau 03	Test phytochimique de l'extrait aqueux de <i>Camellia Sinensis</i> .	43
Tableau 04	Contenu en flavonoïdes de l'extrait aqueux de <i>Camellia Sinensis</i>	43
Tableau 05	valeurs des IC ₅₀ trouvées pour les extraits des feuilles de <i>Camellia Sinensis</i>	44
Tableau 06	Poids initiale, Gain du poids et poids relative des organes chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.	44
Tableau 07	Taux d'hémoglobine, nombre des globules rouges, Lymphocyte, Monocytes, et des Plaquettes chez le groupe témoin et les groupes traités.	45
Tableau 08	Teneurs sérique en glucose, du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.	47
Tableau 09	Activité du TGO, TGP, et PAL sérique chez le groupe témoin et les groupes traités.	49
Tableau 10	Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) et glutathion réduit (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités.	50
Tableau 11	Activité de catalase, glutathion S Transférase (GST), et GPx chez le groupe témoin et les groupes traités.	51

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumés	
Liste d'abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

PARTIE I : *SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES*

Chapitre I : Nanoparticules d'oxyde de fer et l'effet toxique sur l'organisme	3
I-1. Généralité sur le fer.....	3
I- 2. Oxydes de fer et leurs propriétés physico-chimiques	3
I-3. Nanoparticules d'oxyde de fer	4
I-3-1.Définition.....	4
I-3-2.Propriété magnétique de nanoparticules	4
I-3-4.Synthèse de nanoparticules.....	5
I-3-5. Application biomédicale.....	6
I-4.Effet toxique de nanoparticules	6
I-4-1.Répartition et métabolisme de fer.....	6
I-4-1-1.Répartition	7
I-4-1-2.Métabolisme	7
I-4-2.Régulation de l'homéostasie du fer	9
I-4-2-1.Première niveau de régulation : Lors de l'absorption	9
I-4-2-2. Deuxième niveau de régulation : L'hepcidine	9
I-4-3.Effet cytotoxique de nanoparticules d'oxyde de fer	10
Chapitre II : Stress oxydatif	12
II-1.Stress oxydative cellulaire	12
II-2.Radicaux libres	12
II-2-1.Définition	12
II-2-2. Principale sources des radicaux libres : La mitochondrie	13
II-2-3. Production du ROS.....	14

II-2-4. Cibles de radicaux libres	14
II-3. Systèmes antioxydants.....	14
II-3-1.Systèmes antioxydants enzymatiques	15
II-3-1-1. Superoxyde dismutase (SOD).....	16
II-3-1-2. Catalase	16
II-3-1-3. Glutathion peroxydase (GPX) et réductases	16
II-3-1-4. Glutathionne-S-transférase	17
II-3-2. Système antioxydants non enzymatiques	17
II-3-2-1. Antioxydants endogènes	17
II-3-2-2. Antioxydants exogènes	19
Chapitre III : <i>Camillia sinensis</i> et la quercétine	20
III-1.Plantes médicinales	20
III-2 Thé vert	20
III-2-1.Description botanique	20
III-2-2.Classification.....	21
III-2-3.Composition chimique du thé vert	21
III-2-4. Activité thérapeutique du thé vert.....	22
III-2-4-1. Mécanisme moléculaire de l'effet bénéfique de thé vert.....	23
III-2-4-2. Prévention des maladies cardiovasculaires.....	23
III-2-4-3. Prévention du cancer	23
III-2-4-4.Prévention de l'obésité et du diabète.....	23
III-2-4-5. Activité antioxydant	24
III-2-4-6. Activité antimicrobienne	24
III-2-4-7. Activité cognitive	24
III-2-4-8. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.....	24
III-3.Quercétine	25
III-3-1.Ddéfinition	25
III-3-2.Structure de la quercétine.....	25
III-3-3. Absorption et la Biodisponibilité de la quercétine.....	26
III-3-4. Importance pharmacologique de la quercétine	26

PARTIE II : *PARTIE EXPERIMENTALE*

Chapitre I : MATERIELS ET METHODES.....	27
I. Matériels.....	27

I-1. Matériel végétal	27
I-2 .Animaux.....	27
I-2-1. Condition d'élevage	27
I-2.2. Traitement des animaux	28
I-2-3. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes.....	28
I-3 .Réactifs et produits utilisés	29
I-4 .Matériels de laboratoires.....	30
II. Méthodes.....	30
II-1.Méthode d'extraction des flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle et 1-butanol).....	30
II-2. Analyse phytochimique	31
II-3.Dosage de flavonoïdes totaux.....	32
II-4.Evaluation l'activité antioxydante de l'extrait de Camellia sinensis	32
II-5. Méthode de dosage des paramètres hématologiques	33
II-6. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique	33
II-6-1.Dosage de la glycémie	33
II-6-2. Méthode de dosage de fer sérique	34
II-6-3. Méthode de dosage de bilirubine totale.....	34
II-6-4. Méthode de dosage d'acide urique	34
II-6-5. Méthode de dosage d'urée sérique	35
II-6-6. Méthode de dosage de créatinine	35
II-6-7. Dosage du protide sérique	35
II-6-8. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)	35
II-6-9. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT).....	36
II-6-10. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	36
II-7. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif	36
II-7-1. Préparation de l'homogénats des organes	36
II-7-2. Méthode de Dosage des protéines tissulaire	37
II-7-3. Méthode de dosage des Malondialdéhyde (MDA)	37
II-7-4. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH).....	38
II-7-5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase.....	38
II-7-6.Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs)	39
II-7-7. Méthode de dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)	39
II-8. Technique histologique	40
II-8-1.Fixation des échantillons	40

II-8-2.Déshydratation	41
II-8-3. Inclusion	41
II-8-4. Confection des coupes histologiques	41
II-8-5. Colorations	41
II-8-6.Montage et observation	41
II-9. Méthode d'analyse statistique	42
Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	43
II-1. Résultats.....	43
II-1-1. Étude phytochimique et dosage de flavonoïdes	43
II-1-2.Evaluation de l'activité antioxydante	43
II-1-3.Effet de traitement par la quercétine et <i>Camellia Sinensis</i> sur la croissance corporelle, et le poids relative des organes	44
II-1-4.Effet de traitement par la quercétine et <i>Camellia Sinensis</i> sur des paramètres hématologiques, biochimiques et enzymatique chez les rattes contaminées par la Dose de SPION.....	45
II-1-4-1.Étude des paramètres hématologiques	45
II-1-4-2.Étude des paramètres biochimiques	47
II-1-4-3.Étude des enzymes sériques	49
II-1-5.Effet de traitement par la quercétine et <i>Camellia Sinensis</i> sur des paramètres de stress oxydant chez les rattes contaminées par la Dose de SPION	50
II-1-5-1. Etude de la peroxydation lipidique (MDA) et le glutathion réduit (GSH)	50
II-1-5-2. Etude de l'activité de de catalase, Glutathion S Transférase (GST), et GPx	51
II-1-6. Étude histologique.....	52
II-2.Discussion.....	54
Conclusion générale.....	64
Références bibliographiques.....	66
Annexes.....	83
resumé et mots-clés	

Introduction général

Les nanotechnologies concernent l'étude des matériaux de l'ordre du nanomètre. Leur taille leur confère une réactivité accrue, car le nombre de particules par gramme s'accroît considérablement, démultipliant la surface de contact avec l'environnement. Par ailleurs, ces particules relèvent des lois quantiques ce qui leur apporte des propriétés optiques ou électriques différentes (**Zhendre., 2010**). En plus des applications pour l'électronique, l'informatique et les télécommunications (**Kruis et al., 1998 ; Kwok et al., 2002**), les nanotechnologies se retrouvent dans des domaines aussi variés que la médecine et les cosmétiques (**Gupta et al., 2005 ; Emerich et al., 2006**), l'environnement et l'énergie (**Wei-xian et al., 2003 ; Bottero et al., 2006**), l'agroalimentaire ou les transports (**Pereira et al., 2007**).

La nanomédecine est l'utilisation médicale des nanostructures pour le diagnostic et le traitement des maladies. En diagnostic, les nanostructures sont utilisables tant pour le diagnostic *in vivo* que pour le diagnostic *in vitro*. *In vitro*, les nanoparticules (NPs) et les dispositifs de manipulation ou de détection permettent la reconnaissance, la capture et l'accumulation des biomolécules alors qu'*in vivo* ces NPs sont utilisées comme agent de contraste pour l'imagerie. En thérapie, ces NPs sont utilisées pour la vectorisation ou la délivrance de certains médicaments (**Osseni., 2012**). Parmi les nanomatériaux les plus importants : les nanoparticules d'oxyde de fer sont le premier choix en raison de leur biocompatibilité, de leur stabilité chimique et leur propriété superparamagnétique (**Hyeon., 2002**). Par ailleurs, ces nanoparticules présentent actuellement un grand débat quant à leurs risques toxicologiques. En effet, elles peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé (**Nel et al., 2006 ; Cao et Wang., 2011**).

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (**Boyard., 2009**). Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante. La quercétine est un bioflavonoïde qui a été largement étudiée par les chercheurs au cours des 30 dernières années. (**Ross & Kasum., 2002**). La quercétine est un pigment végétal, se produit en abondance dans de nombreuses plantes ethniques (**Moskuag et al., 2004**). Elle a une importance en termes d'ethnopharmacologie tels que son utilisation comme antioxydant, anticancéreux et

neuroprotecteur (**Dajas., 2012**). Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes mais également les produits transformés comme le chocolat, le thé et le vin rouge (**Bahorun., 1997**). Le thé vert est le thé le plus consommé en Chine, les feuilles sont simplement roulées et séchées après la cueillette. En Europe, même si la consommation de thés verts est en forte augmentation suite aux nombreuses publications reprises dans les médias vantant leurs propriétés bénéfiques pour la santé, dont les extraits de thé vert ont considérablement inhibé les dommages des radicaux libres déclenchés par le fer (**Aurélié., 2007**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des flavonoïdes de thé vert et de la quercétine sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer chez les rattes wistar.

Ce travail est divisé en deux parties. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui comporte trois chapitres. Le premier chapitre concernant les nanoparticules d'oxydes de fer et leur effet toxique sur l'organisme, le deuxième chapitre concernant le stress oxydatif, et la dernière chapitre sur la plante *Camellia sinensis* et la quercétine. La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui contient le chapitre des matériels et méthodes utilisées durant ce travail et le chapitre des résultats et discussion qui contient la présentation des résultats et leur interprétation en se basant sur ce qui était dit dans la partie bibliographie.



Première Partie

Synthèse Bibliographique

Chapitre I

*Nanoparticules d'oxyde de
fer et l'effet toxique sur
l'organisme*

I-1. Généralité sur le fer

Le Fer (Fe) est un métal essentiel, entre dans la composition de nombreux alliages dont les aciers inoxydables. Il est utilisé dans les machines et ustensiles divers utilisés quotidiennement ainsi que dans les infrastructures du monde moderne. Le Fer est classé au quatrième rang des éléments de la croûte terrestre par ordre d'abondance, sa présence dans l'eau peut avoir diverses origines : lessivage des terrains avec dissolution des roches et des minerais contenus dans le sous-sol (**Lacoue-Labarthe., 2007**) ; rejets industriels (pollutions minières, métallurgiques, sidérurgiques) ; corrosion des canalisations métalliques (en fonte ou en acier) ou existence de dépôts antérieurs (**Bendada et Boulakradeche., 2011**).

Le Fer existe sous deux forme, le fer ionique (le fer ferreux: Fe^{2+} et le fer ferrique: Fe^{3+}), et le fer minéral qui inclut les sulfures (pyrite), les sulfates, les oxydes et hydroxydes (hématite, magnétite) ainsi que les silicates et les carbonates (sidérite) (**Christelle., 2006**).

L'oxydation du fer ferreux a d'abord été mise en évidence comme étant un processus chimique s'effectuant en présence d'oxygène à pH neutre. Il y a seulement quelques dizaines d'années qu'il a été observé le même processus mais en présence de bactéries ferro-oxydantes neutrophiles (**Croal et al., 2004**). L'oxydation du fer ferreux à pH neutre est donc un processus compétitif entre l'oxydation abiotique (via l'oxygène) et l'oxydation biotique (via les bactéries ferro-oxydantes) (**Emerson & Moyer., 2002**).

I-2. Oxydes de fer et propriétés physico-chimiques

L'oxyde de fer peuvent être considérés, en première approximation, comme de solides ioniques constitués d'anions oxygène et de cations métalliques. L'oxygéné se trouve dans son état d'oxydation **-II**, tandis que le fer existe dans ses états d'oxydation **+II** et **+III** (**Nadour., 2012 ; Babadi., 2013**).

Les oxydes de fer existent sous de nombreuses formes. La magnétite (Fe_3O_4), la maghémite ($\gamma-Fe_2O_3$) et l'hématite ($\alpha-Fe_2O_3$) sont les plus courantes (**Lakhal., 2016**). La magnétite (Fe_3O_4) est un minéral ferrimagnétique noir contenant à la fois Fe II et Fe III, tandis que La maghémite ($\gamma-Fe_2O_3$) est un minérale rouge-brun, ferromagnétique, isostructural de maghémite, elle formé par oxydation de la magnétite est bien ordonné, tandis que l'amorçage d'autres oxydes de fer produit un maghémite mal ordonnée (**Schwertmann & Cornell., 2003**).

La plupart des oxydes de fer ont une structure cristalline où le degré de la structure ainsi que la taille des cristaux dépend des conditions de formation (**Cornell & Schwertmann., 2003**). La magnétite et la maghémite possèdent une structure spinelle presque similaire (**Cudennec & Lecerf., 2005**). Tandis que la structure de l'hématite est constituée par des ions oxygène occupant un arrangement hexagonal avec des ions Fe³⁺ occupant des sites octaédriques (**Teja & Koh., 2009**).

I-3. Nanoparticules d'oxyde de fer

I-3-1. Définition

Les nanoparticules (NPs) d'oxyde de fer superparamagnétiques désignées par le terme SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine (**Alexiou et al., 2000 ; Bulte et al., 1992 ; Pankhurst et al., 2003**). La propriété des SPIOs provient du fort moment magnétique qu'ils acquièrent en présence d'un champ magnétique externe. Leur moment magnétique élevé engendre un fort contraste en imagerie IRM. En plus elles possèdent d'excellentes propriétés magnétiques, les SPIOs sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer (**Weissleder et al., 1989**). Les nanoparticules d'oxyde de fer sont très intéressantes en raison de leurs propriétés superparamagnétiques et leur large application (**Zhang & Olin., 2012**).

I-3-2. Propriété magnétique de nanoparticules

Le magnétisme est un phénomène physique au cours duquel des forces attractives ou répulsives se manifestent entre deux matériaux. A l'échelle de l'atome, le magnétisme résulte du mouvement des électrons. En effet, une charge électrique en mouvement est une source de champ magnétique et on peut lui associer un moment magnétique (**Lévy., 1997**).

Deux sources sont à l'origine du moment magnétique : le mouvement des électrons autour du noyau appelé le moment orbital, et le mouvement intrinsèque de l'électron autour de lui-même appelé le moment de spin. L'application d'un champ magnétique extérieur a comme effet d'orienter les moments magnétiques dans une direction déterminée. Selon l'arrangement de ces moments, en l'absence et en présence d'un champ magnétique, les matériaux magnétiques sont classés en quatre catégories en fonction de leur type de magnétisme (**fig.01**) ; le diamagnétisme, le paramagnétisme, l'antiferromagnétisme et le ferrimagnétisme (**Ida., 2004**).

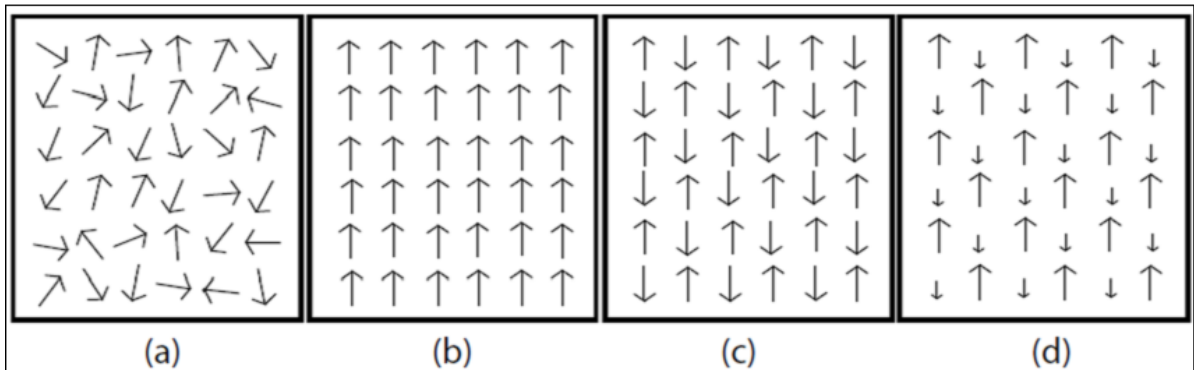


Figure 01: Différentes orientations de dipôle magnétique. (a) paramagnétique, (b) diamagnétisme, (c) antiferromagnétique et (d) ferrimagnétique (**Salazar-Alvarez., 2004**).

I-3-4. Synthèse de nanoparticules

La voie classique de synthèse de ces nanoparticules est la voie chimique. Des nombreuses méthodes chimiques peuvent être utilisées pour synthétiser des nanoparticules magnétiques :

A) microémulsions : synthèses sol-gel, procédé hydrothermal, hydrolyse et thermolyse de précurseurs. Le contrôle de la taille, la forme et composition des nanoparticules dépend du type de sels utilisés, du ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} , le pH et la force ionique du milieu (**Gupta & Gupta., 2005**).

B) Co- précipitation : la méthode la plus commune est la Co- précipitation de sels de fer (**Lee et al., 1996**). 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 :



Cependant, avec cette méthode, la distribution de taille des nanoparticules obtenues est trop grande c'est-à-dire comprise entre 2 et 16nm (**Sophie et al., 2008**).

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 et d'atteindre une température supérieure à 200°C (**Elsaesser & Howard., 2011**).

I-3-5. Application biomédicale

Les nanoparticules d'oxyde de fer de type magnétite et maghémite ont des applications diverses dans le domaine de la biomédecine (vecteurs biomédicaux, hyperthermie, imagerie par résonance magnétique). Ces nanoparticules sont utilisées dans ce domaine en raison de leur biocompatibilité et de leur faible toxicité pour le corps humain (**Haw et al., 2010**).

Des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique ont été utilisées comme vecteurs biomédicaux. Le fonctionnement de ces vecteurs consiste à délivrer, sous l'effet d'un champ magnétique, le médicament externe vers la zone à traiter où il sera libéré localement (**Neuberger et al., 2005**).

Une autre application des nanoparticules d'oxyde de fer est le traitement de tumeurs par hyperthermie. Ce type de thérapie a la même finalité que celle présentée précédemment, mais utilise une élévation de la température, entre 42,5 et 44 °C, induisant ainsi la destruction des cellules malades. Cela consiste à provoquer, par un champ magnétique, un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter (**Malekigorji et al., 2014**).

Ces nanoparticules sont aussi utilisées comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technique d'imagerie médicale permet d'observer les tissus mous du corps (**Wang et al., 2015**).

I-4.Effet toxique de nanoparticules d'oxyde de fer

I-4-1.Répartition et métabolisme de fer

Dans l'organisme, le fer existe sous deux formes: le fer héminique et le fer non héminique. Le fer héminique (incorporé dans la structure de l'hème) entre dans la constitution de l'hémoglobine, de la myoglobine et des enzymes hémoprotéiques; le fer non héminique (non

incorporé dans la structure de l'hème) est présent dans certaines enzymes et correspond aux formes de transport (par la transferrine) et de réserve du fer (**Bossuyt & Boeynaems., 2001**).

I-4-1-1.Répartition

Le fer est distribué dans de nombreux organes au niveau de multiples localisations Sub-cellulaires et par là-même, intervient dans des fonctions métaboliques variées. Les réserves en fer de l'organisme sont localisées au niveau du système réticulo-endothélial, notamment dans le foie, la rate, la moelle osseuse et les muscles squelettiques (où les réserves sont plus particulièrement sous la forme d'hémosidérine) et dans le parenchyme hépatique (où c'est la ferritine qui prédomine) (**Ganong., 2004**).

I-4-1-2.Métabolisme

L'originalité du métabolisme du fer tient au fait qu'il s'effectue quasiment en circuit fermé. L'organisme est particulièrement économe de son fer. Le pool du fer de l'organisme (4 g chez l'homme adulte ; 2,5 chez la femme adulte) est en renouvellement permanent : le fer ayant servi à la synthèse de l'hémoglobine est récupéré après la destruction des globules rouges et réutilisé (**Jaap., 2011**).

Au niveau de l'estomac, les sécrétions acides et la pepsine permettent de libérer le fer non hémique lié aux protéines, ou aux autres constituants de la matrice alimentaire, et favorisent la solubilisation du fer en le réduisant de l'état ferrique à l'état ferreux. Ces deux formes d'oxydation du fer peuvent être absorbées de façon équivalente, mais les ions ferriques, qui précipitent plus facilement que les ions ferreux, sont moins solubles et donc moins facilement absorbables au pH intestinal (**Gallati., 2002 ; Parkkila et al., 2001**).

✚ L'hème pourrait être transporté dans l'entérocyte duodénal par l'HCP1 (Hème carrier protéine1). Elle peut alors être métabolisée par hème oxydase et libérée le fer. Elle pourrait aussi transiter de façon intacte grâce à deux transporteurs, le BCRP et Le FLVCR.

✚ Le fer solubilisé à partir des aliments est absorbé par les entérocytes matures situés au sommet de la villosité Intestinale (**fig.02**), dont la captation du fer se fait comme suivant :

- Le fer est réduit sous forme bivalente par une réductase membranaire.
- Il est capté par le DMT1 (divalent metal transporter 1).
- Il est stocké dans la cellule dans la ferritine.

- Il peut être réoxydé en basolatéral par l'héphaestine.
- Il est exporté par la ferroportine.
- Il est transporté dans le sang par la transferrine (Gallati et al., 2002 ; Parkkila et al., 2001).

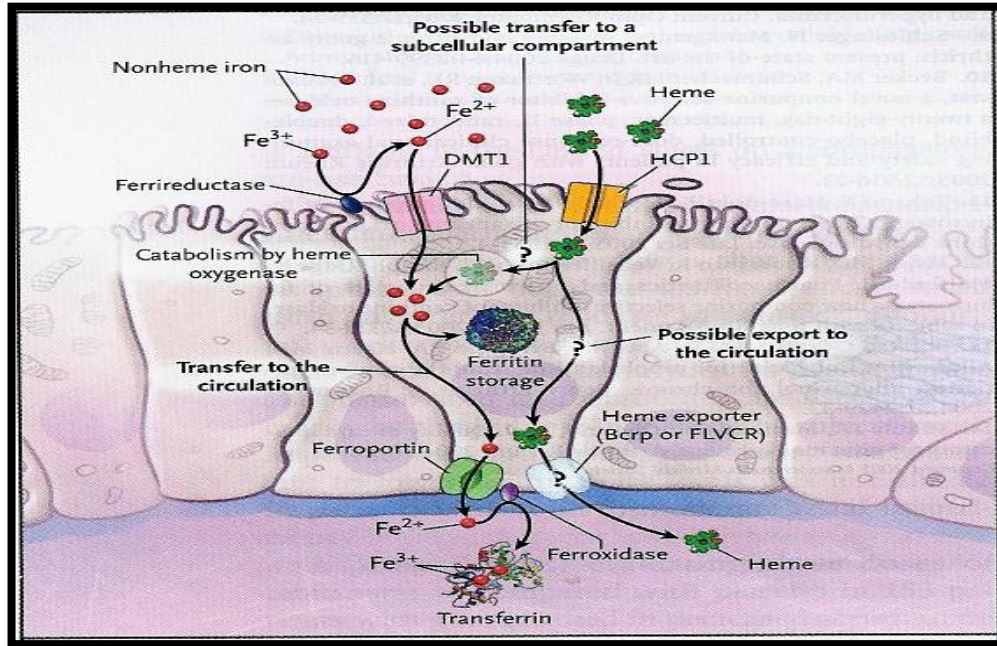


Figure 02 : Absorption intestinale du fer (Andrews., 2002).

La transferrine (sidérophilline) peut fixer un ou deux atomes de fer ferrique, pour former à partir d'une molécule désaturée (apotransferrine), une molécule monosaturée ou saturée.

La pénétration du fer dans toutes les cellules à partir du fer transporté dans le sang sur la transferrine, la captation du fer se fait par endocytose, induit par le récepteur de la transferrine. Le fer est ensuite libéré dans la cellule pour être incorporé sur les ferroprotéines. La protéine HFE forme un complexe avec le récepteur à la transferrine selon les besoins en fer de la cellule (Gallati., 2002).

Le fer transporté par la transferrine vers le foie et le système réticulo-endothélial où il est incorporé dans la ferritine et l'hémosidérine à des fins de stockage, ou utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine, de la myoglobine ou des cytochromes (Bossuyt & Boeynaems., 2001). Très peu de fer est filtré par le glomérule rénal, ce fer est totalement réabsorbé le long du néphron (Beaumont & Canonne-Hergaux., 2005).

I-4-2. Régulation de l'homéostasie du fer

Le pool de fer de l'organisme est généralement bien contrôlé grâce à des procédés de régulation de son absorption. Ainsi, l'absorption du fer diminue quand les réserves sont adéquates et, inversement, augmente lorsque les réserves deviennent insuffisantes.

Les protéines HFE et l'hepcidine interviendraient de façon prépondérante dans ces deux types de régulation, bien qu'avec des mécanismes encore mal connus (**Beaumont., 2004**).

I-4-2-1. Première niveau de régulation : Lors de l'absorption

La protéine HFE, synthétisée localement, modifie l'affinité du récepteur à la transferrine pour la transferrine. Elle participe aussi à la régulation de l'entrée et au contenu du fer dans les cellules. Cette protéine s'associerait avec le récepteur de la transferrine, facilitant l'endocytose du complexe fer-transferrine et modulant la quantité de fer reçue par les cellules (**Loréal et Brissot., 2003**).

En effet lors de l'absence ou de la déficience de la protéine HFE, le DMT1 n'est plus régulé. Il s'exprime de façon importante, permettant une entrée trop élevée de fer. Elles sont, à des degrés plus ou moins importants, responsables de l'hémochromatose ou maladie de surcharge ferrique génétique, ou « diabète bronzé » (**Pietrangelo et al., 2004**).

I-4-2-2. Deuxième niveau de régulation : L'hepcidine

L'hepcidine est un peptide d'origine hépatique et sécrété dans le sang. Il inhibe l'absorption du fer au niveau de l'intestin et la libération du fer recyclé à partir de macrophages. Sa production et concentration sanguine est inversement proportionnelle à la quantité de fer de l'organisme, via la saturation de la transferrine. Elle régule au niveau de diverses cellules, et en particulier au niveau des entérocytes des villosités, la synthèse des transporteurs (DMT1 et Ferroportine) (**Duvallet., 2008**).

Pour limiter l'exportation de fer, hepcidine blocs le ferroportine (**fig.03**), le seul exportateur connu de fer, en se liant à elle et provoquant son neutralisation (**Nicolas et al., 2002**).

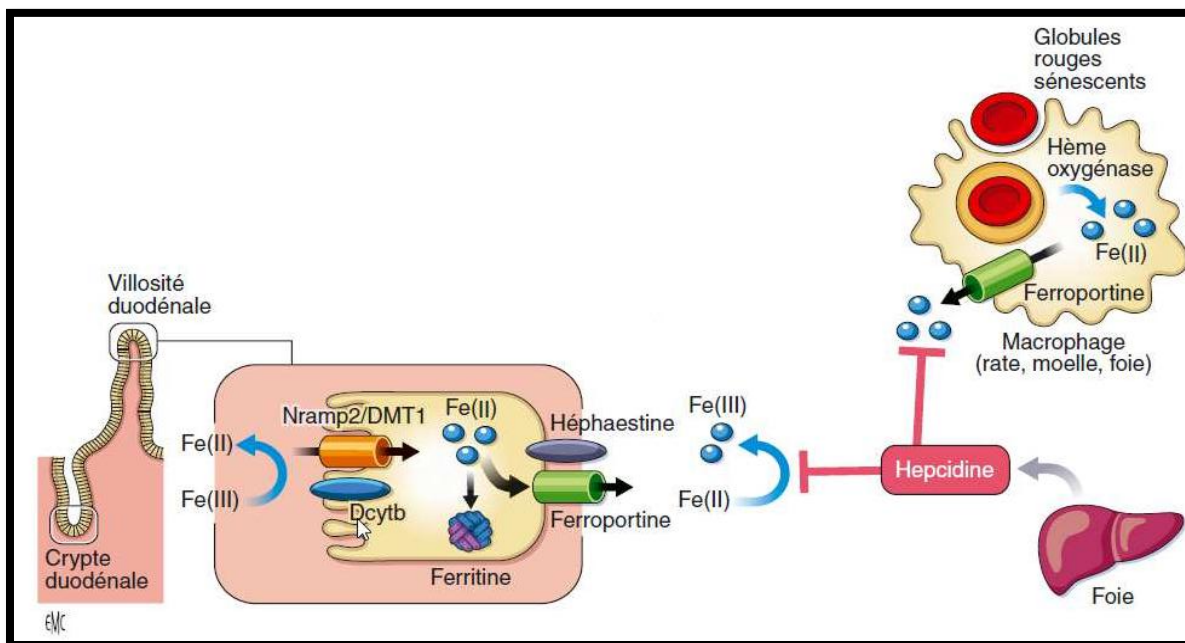


Figure 03: Mécanisme de l'hepcidine (Sylvie., 2015).

En cas de carence en fer, la production d'hepcidine serait inhibée, entraînant une augmentation de l'absorption du fer par le duodénum (Beaumont., 2004).

Sa synthèse est stimulée par l'inflammation et les surcharges en fer. Elle est un régulateur négatif de l'absorption du fer au niveau du duodénum, du placenta et des macrophages.

On en trouve aussi une faible expression dans le rein, le cœur, le muscle squelettique et le cerveau (Peyssonnaud et al., 2007).

I-4-3. Effet cytotoxique des nanoparticules d'oxyde de fer

Une étude montre que la cytotoxicité des NPs d'oxyde de fer (IONPs) est due à une induction de stress oxydant et par conséquent à une apoptose (Naqvi et al., 2010). Il est alors important de connaître leur biocompatibilité et d'étudier leur toxicité, notamment cellulaire (Hofmanni et al., 2010).

Les IONP est probablement dégradés en ions fer dans les lysosomes par des enzymes efficaces à faible pH (Arbab et al., 2005). Les ions de fer libérés à partir IONP peuvent être intégrés dans les voies métaboliques de fer endogènes. Ils sont métabolisés dans le foie et ensuite utilisée dans la formation des globules rouges ou excrétée par les reins. (Lei et al., 2013). L'excès en Fer peut être potentiellement toxique pour les cellules, c'est pourquoi son transport est rigoureusement contrôlé (Kraemer., 2004).

Le mécanisme toxique principal du Fer réside dans sa capacité à induire la formation de radicaux libres, avec, pour conséquence, une peroxydation lipidique. Classiquement, l'intoxication au fer est décrite comme évoluant en cinq phases : troubles digestifs, amélioration clinique transitoire, toxicité systémique avec choc, acidose métabolique, coma, toxicité hépatique avec coagulopathie, séquelles digestives à type de sténose (Gunnar et al., 2007).

Ce fer libre peut potentiellement traverser la membrane nucléaire ou mitochondrial, par conséquent, les radicaux hydroxyles générés par le fer libre pourraient endommager l'ADN, des protéines, des polysaccharides et des lipides in vivo, ce qui peut initier la cancérogenèse (fig.04) ou avoir une influence significative sur les générations futures (Singh et al., 2010).

L'exposition chronique au fer est principalement d'origine professionnelle et se traduit par une pneumoconiose de surcharge consécutive à l'inhalation de poussières et d'oxydes de Fer. La sidérose oculaire est une pathologie chronique grave pouvant aboutir à la perte de la vision de l'œil touché. Elle survient lorsqu'un corps étranger contenant du Fer se retrouve dans l'œil ou à son contact (Nestel & Davidsson., 2003).

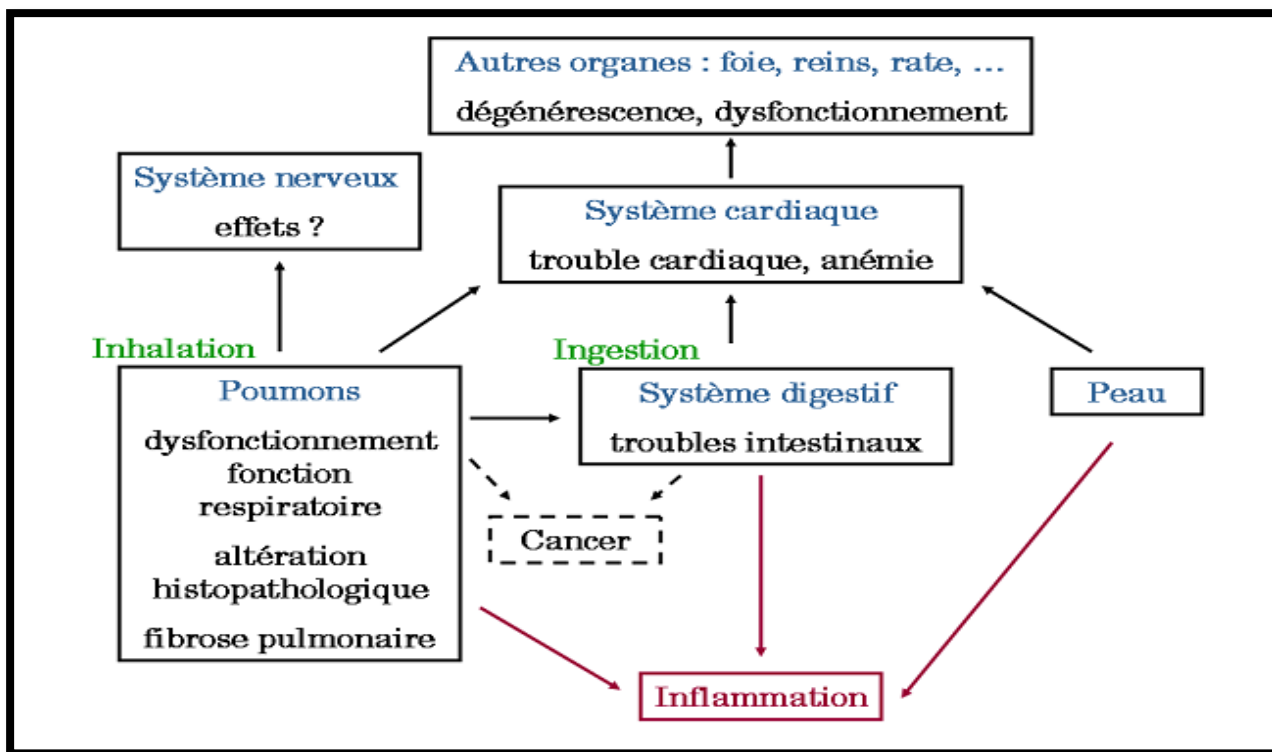


Figure 04 : Principaux effets des nanoparticules de oxyde de fer sur la santé humaine (Ostiguy et al., 2008).

Chapitre II

Stress oxydatif

II-1. Stress oxydative cellulaire

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les peroxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (**Pincemail., 1998 ; Angelos et al., 2005**).

II-2. Radicaux libres

II-2-1. Définition

Le radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur son orbitale externe. Du fait de sa très grande réactivité, un radical libre a une durée de vie très courte (**Leverve et al., 2001**). Parmi ceux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le NO sont peu réactifs mais peuvent déclencher des réactions en chaînes qui formeront des radicaux libres beaucoup plus réactifs. Les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) et les hydroxyles (OH^{\bullet}) sont très réactifs et sont issus respectivement de l'oxydation des lipides (peroxydation) et du clivage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$). Il existe aussi d'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l' H_2O_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et l'acide peroxy-nitrique (ONOOH), qu'ils ne sont pas des radicaux libres au sens propre, sont très réactifs et peuvent donc conduire à l'oxydation de molécules (**Droge., 2002**).

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 , les espèces réactives de l'oxygène (ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes ROOH et H_2O_2) (**Tab.01**). L' H_2O_2 , produit de la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$, est beaucoup plus stable que ce dernier et à la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques (contrairement à l' $O_2^{\bullet -}$) (**Thannickal & Fanburg., 2000**).

Tableau01 : Principales espèces oxydantes (Buettner., 1993).

Reactive oxidant species			
Radicals		Non-radicals	
Hydroxyl	$\bullet\text{OH}$	Peroxynitrite	ONOO^-
Alkoxy	$\text{L(R)}\text{O}\bullet$	Hypochlorite	$^- \text{OCl}$
Hydroperoxy	$\text{HOO}\bullet$	Hydroperoxide	$\text{L(R)}\text{OOH}$
Peroxy	$\text{L(R)}\text{OO}\bullet$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide	$\text{NO}\bullet$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxide	$\text{O}_2^{\bullet-}$		

II-2-2.Principale sources des radicaux libres : La mitochondrie

Les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (notées ERO) (Shahrokhian et Ghalkhani., 2006). Les ERO sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogénés, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ERO qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P)H-oxydase et les NO synthase (fig. 05).

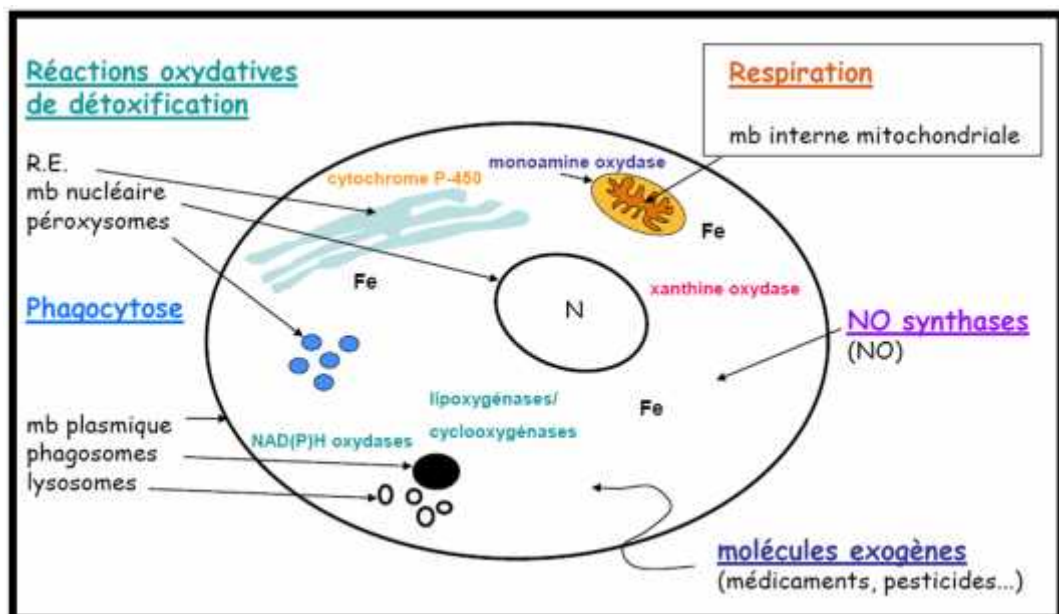


Figure 05: Principaux sites cellulaires de productions des ERO (Sekli-Belaidi., 2011).

Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (**Balaban et al., 2005**).

II-2-3. Production du ROS

La chaîne respiratoire mitochondriale est le principal site de production de radicaux libres (**Rahman., 2007**). Environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent de la chaîne (**Liu et al., 2002**), et réagissent directement avec l'oxygène pour former des (**Barouki., 2006 ; Han et al., 2003**).

II-2-4. Cibles de radicaux libres

Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaire, elle est surtout la principale cible (**Servais., 2004**). Les ROS peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l' $O_2^{\cdot -}$ peut réagir avec NO, et produire le ONOO⁻ qui peut inhiber la chaîne respiratoire (**Shiva et al., 2004**), et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...) (**Boher., 2002 ; Stevnsner., 2002**).

Les dérivées réactives de l'oxygène (DROs) sont capables d'oxyder les composants cellulaires (tels que les lipides membranaires, les protéines et l'ADN), ce qui pourra provoquer l'apoptose ou la nécrose. La nécrose est caractérisée par la mort cellulaire tandis que l'apoptose est caractérisée par les changements nucléaires qui conduisent à la mort cellulaire programmée (**Lutzler et al., 2007 ; Pincemail et al., 2002; Delacourte, 2006; Amieva et al., 2005**).

II-3. Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont des produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants (**fig.06**). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (**Droge., 2002**).

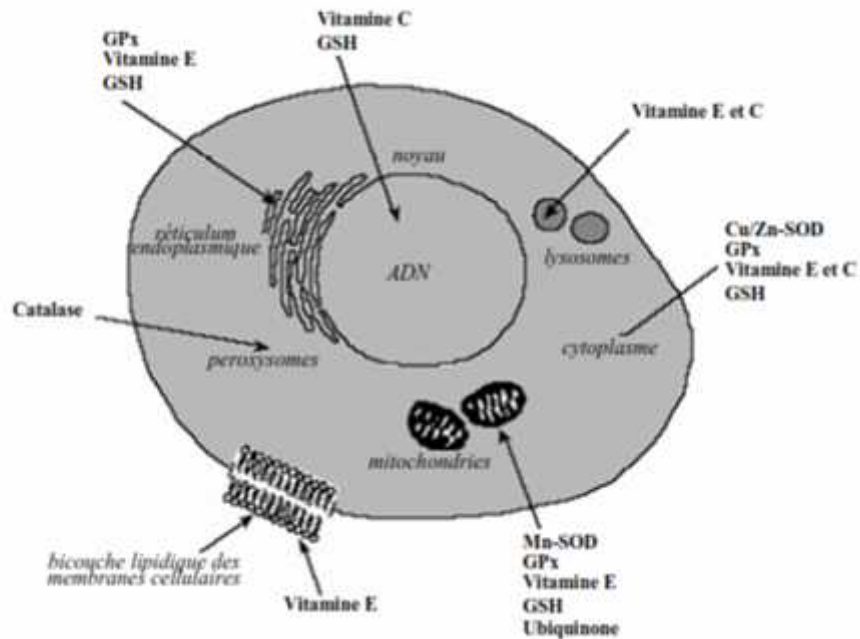


Figure 06 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxyde dismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit (Garait., 2006).

II-3-1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS (fig.07). Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

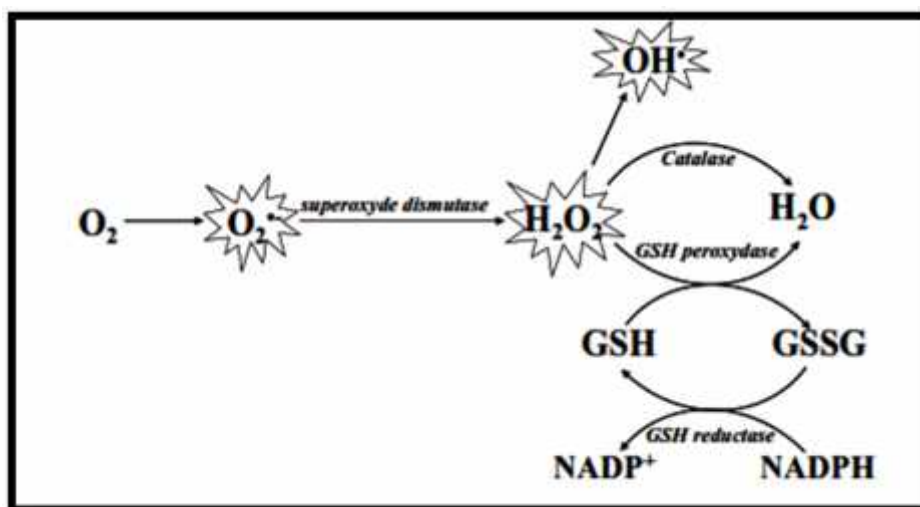
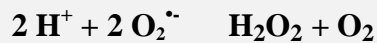


Figure 07 : Schéma des défenses anti-oxydantes enzymatiques (Garait., 2006).

II-3-1-1. Superoxyde dismutase (SOD)

Est la première ligne de défense cellulaire contre le stress oxydatif, transforme l'ion superoxyde en deux produits moins toxiques; le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène moléculaire (Gaté & *al.*, 1999 ; Valko et *al.*, 2007).



Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. (Salvayre et *al.*, 2003 ; Soullère et *al.*, 2002).

II-3-1-2. Catalase

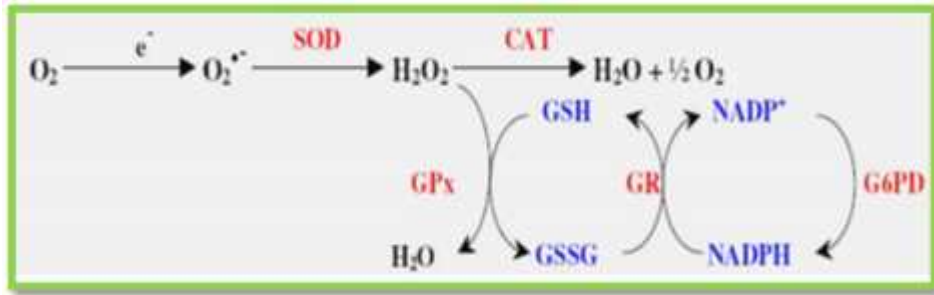
Est la deuxième enzyme qui agit dans la détoxification cellulaire, transforme le H_2O_2 (généralement produit par la SOD) en eau et en oxygène (Gaté & *al.*, 1999 ; Powers et *al.*, 2003; Seifried et *al.*, 2007).



Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Garait., 2006).

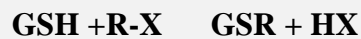
II-3-1-3. Glutathion peroxydase (GPX) et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx), elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Desport et Couratier., 2002; Gaté & *al.*, 1999). La glutathion réductase (GR), joue un rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Sorg., 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



II-3-1-4. Glutathionne-S-transférase

Glutathion S-transférase (GST EC 2.5.1.18) est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka *et al.*, 2003). GST est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Zhihua *et al.*, 2004). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



II-3-2. Système antioxydants non enzymatique

Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation. Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories, les endogènes (molécules issues de la biosynthèse), et les exogènes (vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse).

II-3-2-1. Antioxydants endogènes

A)-Glutathion

Le glutathion est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (Favier., 2003). Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire (Baudin., 2006 ; Gardès *et al.*, 2003).



B)-Acide urique

L'acide urique est un piègeur de $^1\text{O}_2$, des radicaux peroxydes et hydroxydes (RO_2^\cdot et HO^\cdot), de l'ozone et de HClO . La réaction de l'acide urique avec ces ROS génère des radicaux moins réactifs que HO^\cdot (**Haleng *et al.*, 2007**).

C)-Bilirubine

La bilirubine représente un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine. La bilirubine est un puissant agent réducteur et un antioxydant physiologique potentiel. Au niveau des fluides extracellulaires, elle est principalement liée à l'albumine, ce qui rend ce pigment hydrophobe, hydrosoluble. La molécule libre et celle liée à l'albumine ont la capacité de réduire la vitamine E et d'inhiber la peroxydation lipidique dans le plasma et les lipoprotéines (**Rabovsky *et al.*, 2006**).

D)-Protéines de stockage des métaux de transition

Des protéines liant les métaux (transferrine, céruloplasmine, etc.), l'albumine ou l'haptoglobine diminuent le taux des ions métalliques libres en les complexant avec en conséquence, une diminution de leur pouvoir oxydant. A titre d'exemple, la réaction de Fenton entre le fer (cuivre) et l'eau oxygénée ne se fait pas en absence du métal. (**Sekli-Belaidi., 2011**).

E) Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (**Power & Lennon., 1999**). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (**Packer *et al.*, 1997**).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de H_2O (**Skulachev., 1998**).

II-3-2-2. Antioxydants exogènes

A)-vitamine E ou α -tocophérol

L' α -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDLs. Chaque particule LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules d' α -tocophérol (**Lopez et al., 2005**). Elle peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), inhibant ainsi la formation du radical $\text{RO}_2\cdot$. La réaction de la vitamine E avec l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TocH peut aussi réguler à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GPx, la catalase du foie, la GST et la NAD(P)H réductase (**Kebieche., 2009**).

B)-Vitamine C ou acide ascorbique

L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS et/ou RNS (majoritairement l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et l' $\text{ONOO}\cdot$) (**Gardes et al., 2003**). De plus, elle est muni d'une propriété importante: la réparation de deux autres antioxydants, le glutathion (GSH) et l' α -tocophérol (α -TH) à partir de leurs formes radicalaires (**Halliwell & Gutteridge., 2007; Vertuani et al., 2004**).



C)-Oligoéléments

Ces oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les RL (l'homéostasie radicalaire) (**Milane., 2004**). Parmi ces oligo-éléments, le zinc, Manganèse, le sélénium, cuivre...etc., ont une action définie (**Favier & Hininger-Favier, 2005 ; Collard., 2010**).

Un manque d'oligo-éléments comme le cuivre, le manganèse, le zinc, le sélénium ou de vitamines comme la riboflavine, conduit à l'inactivation de ces enzymes antioxydants (**Desport et Couratier, 2002; Gaté & al., 1999**).

D)- Flavonoïdes

Les polyphénols sont des antioxydants, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Collard., 2010**).

Chapitre III

*Camellia Sínensis et la
Quercétine*

III-1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes des maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeurs thérapeutiques.

Toutefois malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de temps en temps à l'exception de ces cents dernières années les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner qu'il s'agisse des maladies rhume, toux ou plus sérieuses tel que la tuberculose et la malaria (**Eddouks., 2007**).

Le Thé, boisson la plus populaire au monde, est consommé sous trois formes de base; thé vert, thé noir et thé oolong (**Wachira & al., 2001**). Le thé contient plus de 4.000 produits chimiques dont certains sont bioactifs. Ces dernières années il y a eu un intérêt croissant dans la compréhension des avantages cardiovasculaires et métaboliques de flavonoïdes poly phénoliques dans le thé, qui peut être utilisé comme un supplément chez les patients. Divers effets cardio-protecteurs de thé ou des polyphénols de thé ont été décrits sur les conditions pathologiques, comme : l'hypertension, l'athérosclérose, diabète, hypercholestérolémie, l'obésité, et sont attribués à antioxydants, anti-thrombogène, anti-inflammatoires, hypotension et les propriétés des polyphénols du thé hypocholestérolémiant (**Kabouche., 2010**).

III-2. Thé vert

Le thé vert (*Camillia sinensis*) est connu depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques qui lui attribuent des propriétés médicinales. Il est consommé en raison de sa saveur, ses caractéristiques aromatiques et effets bénéfiques pour la santé. Aujourd'hui la recherche clinique et fondamentale confirme et précise ses propriétés préventives et curatives (**Nkhili., 2009**).

III-2-1. Description botanique

Le théier, ou *Camellia Sinensis*, est un arbuste de la famille des Camelliacées, de 1 à 6m de haut, aux fleurs blanches et odorantes. Ses feuilles caduques, vert foncé, sont minces, lancéolées, longues de 5 à 10 cm, larges de 2 à 4 cm (**fig.08**). On obtient le thé à partir de ces feuilles. Leur mode de préparation lui conférera sa couleur : il deviendra vert si elles ne sont pas transformées, juste traitées à la vapeur puis rapidement chauffées à haute température. Ceci a

pour effet d'inactiver le polyphénol oxydase et ainsi d'éviter tout processus de fermentation et de dégradation des polyphénols (Pei-Gen & Zhen-Yu., 2002).



Figure 08 : *Camellia sinensis* (Kabouche., 2010).

III-2-2. Classification

Règne	plantae
Division	magnoliophyta
Classe	magnoliopsida
Ordre	theales
Famille	Theaceae
Genre	camellia
Espèce	<i>camellia sinensis</i> (Kabouche., 2010).

III-2-3. Composition chimique du thé vert

Peu de gens savent que le thé n'est pas uniquement une façon de terminer un bon repas en buvant un liquide chaud, le thé est aussi une plante qui renferme différentes substances actives utilisées en phytothérapie. Actuellement, de nombreuses recherches scientifiques montrent que le thé est une source d'antioxydants qui renforcent les défenses naturelles (Landau., 2006 ; Pastore & Fratellone., 2006; Ozercan., 2008 ; Dufresne & Farnworth., 2001). La feuille du thé ne contient pas moins de 350 constituants. Généralement, à l'état frais, le thé vert renferme les constituants chimiques qui sont :

-30% à 40% de polyphénols :

Les propriétés pharmacologiques du thé vert sont dues principalement à la présence des polyphénols. Près de trois-quarts de ces derniers appartiennent au groupe des flavanols,

couramment appelés les tannins, et largement représentés par des catéchines (Scalbert & williamson., 2000). Le thé est aussi une source de flavonols, principalement la quercétine, le kaempferol et la myricétine (2-3% de la composition des polyphénols de thé) (Gramza & Korczak., 2005). Il contient aussi une quantité significative d'acides phénoliques (acide gallique, acide coumarique,...).

- 1 à 5 % de caféine:

La caféine ou la théine sont une seule et même substance appelée triméthylxanthine. Dans le thé, l'action stimulante de la caféine est significativement modifiée par la présence des polyphénols qui génèrent un effet prolongé et modéré (Hua-fu & al., 2002).

-Sources des vitamines :

Le thé est riche en vitamines du groupe B telles que thianine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3). La vitamine C se trouve aussi en quantité significative dans le thé vert. Enfin l'infusion de thé contient la vitamine P qui favorise la perméabilité capillaire et l'élasticité de la paroi des vaisseaux sanguines (Banerjee & Chaudhuri., 2005).

- Autres composants:

A l'état frais, le thé renferme 27% de matières sèches dont, en moyenne :

*40% de glucides, 15 à 23 % de protides et 2 à 3% de lipide, de faible quantité de chlorophylles et de caroténoïdes. Ces substances sont faiblement extraites lors de l'infusion ;

* 9% de matières minérales. 5 à 6 tasses de thé par jour permettent de couvrir une partie des besoins physiologiques quotidiennes. 45 % pour le manganèse, 10 % pour le potassium et 5 % pour le magnésium (Matsuura & al., 2001).

Par ailleurs, le thé est une boisson riche en fluor qui favorise la prévention des caries. La consommation d'une tasse apporte en moyenne 0,1 mg de fluor (Zong-mao & al., 2002).

III-2-4. Activité thérapeutique du thé vert

De nombreuses propriétés pharmacologiques du thé vert ont été démontrées par plusieurs auteurs. On peut dénombrer un effet antioxydant, antimutagénique, antiviral, un effet antiulcère, inactivation des virus, réduction de glucose dans le sang, induction de l'apoptose, anti-inflammatoire, et un effet antimicrobien (Nkhili., 2009).

III-2-4-1. Mécanisme moléculaire de l'effet bénéfique de thé vert

L'activité bénéfique de thé vert sur la santé est essentiellement attribuée aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols.

Les polyphénols du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénées réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatant les ions des métaux de transition sous des complexes inertes (**Nurulain & Zaveri., 2006; Roy., 2005**).

III-2-4-2. Prévention des maladies cardiovasculaires

Les agents qui inhibent l'agrégation anormale des plaquettes réduisent aussi les risques de maladies cardiaques. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation du thé est liée à une baisse importante des maladies cardiovasculaires (**Hamer., 2007**).

Le thé inhibe l'agrégation des plaquettes et aussi le facteur d'activation des plaquettes (PAF).

Des études de laboratoire ont montré que les flavonols de thé réduisent le taux de cholestérol (*in vivo*) et inhibe l'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) (*in vitro*) (**Ulrike., 2001**).

Le thé vert peut aussi diminuer la tension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Les inhibiteurs de l'ECA sont les médicaments de choix utilisés pour combattre l'hypertension artérielle (**Riemersma & al., 2001**).

III-2-4-3. Prévention du cancer

Des recherches plus récentes ont montré que la consommation du thé pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate, de la peau, du colon et du pancréas (**Takashi & al., 2008 ; Hirota., 2005**).

Des expériences sur l'animal ont démontré que le thé vert peut empêcher la carcinogénèse à toutes les étapes, à savoir initiation, propagation et terminaison (**Santosh & al., 2000 ; Vaqar & Mukhtar., 2006; Emma & al., 2006; Hirotav & al., 2002**).

III-2-4-4. Prévention de l'obésité et du diabète

Des études d'intervention ont montré que la consommation de thé vert pouvait réduire le poids corporel et la masse grasse abdominale, ainsi qu'accroître l'oxydation des graisses et les dépenses d'énergie.

Le flavonoïde régule les gènes impliqués dans l'oxydation et le stockage des graisses, ainsi que ceux de la signalisation de l'insuline et du métabolisme du glucose.

En abaissant la production de glucose dans les cellules du foie et en réduisant l'activité des gènes stimulant la production du glucose, le flavonoïde imite l'insuline.

Chez des souris diabétiques, le thé vert diminuait les niveaux de glucose sanguin, deux à six heures après son absorption, sans affecter les niveaux d'insuline sérique (Tsuneki., 2004).

III-2-4-5. Activité antioxydant

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. Le thé en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libre (Shu-jun., 2002; Shengmin., 2005).

III-2-4-6. Activité antimicrobienne

Des études scientifiques ont révélé que le thé vert a de puissants effets antimicrobiens sur les bactéries de la bouche, lesquelles sont communément incriminées dans la carie dentaire et le tartre (Mukhtar & Nihal., 2000).

III-2-4-7. Activité cognitive

Le thé est un stimulant bien connu du système nerveux central. Cet effet, il le doit à la caféine, qui favorise aussi bien le travail intellectuel que l'effort musculaire (Nkhili., 2009).

III-2-4-8. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer

Plusieurs chercheurs ont commencé à s'intéresser aux propriétés du thé vert à la suite d'études épidémiologiques montrant que des personnes qui consommaient plus de trois tasses par jour avaient moins de risque de développer les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Weinreb & al., 2004; Yukiaki & Yukihiro., 2004).

III-3. Quercétine

III-3-1. Définition

La quercétine est un membre de la classe des flavonols, qui appartient au flavonoïde. Cette molécule peut être retrouvée en grande quantité dans le thé vert, la pomme, les oignons et les arachides. On estime que notre consommation quotidienne en quercétine est de quelques centaines de milligrammes (Ross & Kasum., 2002). La quercétine possède de très bons effets biologiques, tels que la capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire, elle fournit une bonne protection cardio-vasculaire, possède un bon pouvoir anti-inflammatoire et aurait même de bonnes propriétés antiviral (Formica & Regelson., 1995). Elle a une importance en termes d'ethnopharmacologie tels que son utilisation comme antioxydant, anticancéreux et neuroprotecteur (Dajas., 2012).

III-3-2. Structure de la quercétine

L'Union internationale de chimie Pure et appliquée (UICPA) nomenclature de la quercétine est 3,3', 4', 5, 7 pentahydroxyl-flavone. Cela signifie que la quercétine a un OH groupe lié aux positions 3, 5, 7, 3' et 4' (fig. 09) (Gregory & Kelly., 2011). La quercétine est une molécule omniprésente dans la plupart de plantes, de fruits et de légumes qui peuvent atteindre des niveaux dans l'alimentation humaine aussi haute que 16 – 25 mg/jour (Hertog et al., 1993).

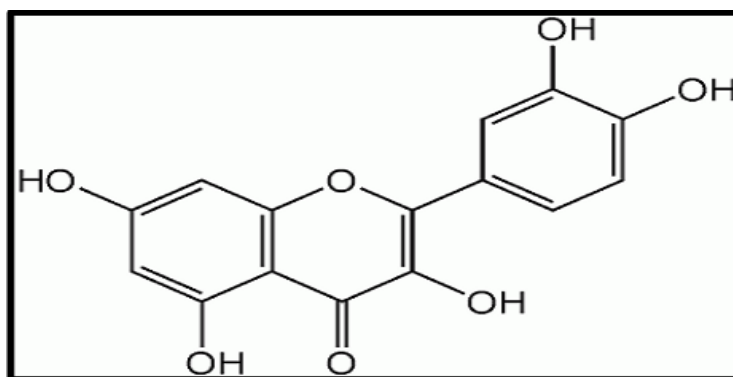


Figure 09: Structure chimique de la quercétine (Wina & Feng., 2006).

III-3-3. Absorption et la Biodisponibilité de la quercétine

Dans les aliments, quercétine se produit principalement sous une forme délimitée avec du sucre, des acides phénoliques, des alcools... etc. Le contenu et la forme de tous les dérivés de la quercétine dans les aliments est importante pour leur biodisponibilité (**Williams et al., 2004**).

Après ingestion, dérivés de la quercétine sont hydrolysée dans le tube digestif et ensuite absorbés. Après avoir été absorbé dans l'intestin grêle, la quercétine est transportée vers le foie par la circulation portale, où il subit un métabolisme de premier passage. Ensuite, elle est distribuée avec ses métabolites dans différents tissus du corps. Elle est fortement lié à l'albumine dans le plasma avec un niveau plasmatique maximale atteint en 0,7 h à 7,0 heures après son ingestion. et un demi-vie d'élimination d'environ 25 heures (**Young et al., 1999**).

III-3-4. Importance pharmacologique de la quercétine

La quercétine est reconnue pour ses propriétés d'antioxydant. Les propriétés antioxydants des composés phénoliques sont liées par leur capacité à transférer un atome d'hydrogène ou un électron, ainsi la chélation d'ions métalliques et l'inhibition de l'activité des oxydases. La quercétine est aussi capable de chélater des métaux de transitions, comme le fer. On sait que le fer est impliqué dans la réaction de type Fenton avec le H_2O_2 pour produire les radicaux libres la section. Ainsi, la capacité de la quercétine à capter le fer permet de réduire la formation de radicaux libres et il semble que le groupe cathécol de la quercétine participerait à la chélation des métaux (**Brown et al., 1998**). De plus, la quercétine est capable d'inhiber la peroxydation lipidique (**Terao & Piskula., 1999**). Ainsi, la quercétine est un neuroprotecteur, elle a des effets bénéfiques contre les maladies neuro-dégénératives. Aussi, elle est un hépato-protecteur, et anticancéreuse, et joue un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (**Lekic et al., 2013 ; Di Santo et al., 2003**).



Deuxième Partie

Etude expérimentale

Chapitre I

Matériels et Méthodes

I. Matériels

I-1. Matériel végétal

Le plante utilisée dans ce travail sont les feuilles de thé vert (*Camellia sinensis*), a été acheté du marché local, et pulvérisé avec un mixeur jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre de *Camellia sinensis* est conservée à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à le début de l'expérimentation (**fig. 10**).



Figure 10 : Feuilles de thé vert (*Camellia sinensis*) (**photo originale**).

I- 2. Animaux

I-2.1. Condition d'élevage

Notre étude a été réalisée sur vingt (20) rattes femelles Wistar Albinos âgés de 8 à 10 semaines et pesant entre 165g et 210g. Ces animaux amenés de l'institut pasteur d'Alger, et élevés à l'animalerie au niveau de la faculté de sciences de la nature et de vie de l'université Echahid Hamma Lakhdar d'El-oued. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie, 15 jours d'environ à une température ambiante (T° de chambre), et une photopériode de 12 h/12 h. Les rattes sont logées dans des cages en plastique. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture par un régime standard (**Southon et al., 1984**).

I-2.2. Traitement des animaux

Après la période d'adaptation, les rattes ont été réparties en quatre groupes gardés dans les mêmes conditions, et elles ont été traitées comme suit :

- **Groupe 1 (T):** 5 rattes saines (**Témoin**)
- **Groupe 2 (D):** 5 rattes, recevant chaque jour 150 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours.
- **Groupe 3 (D + Q):** 5 rattes, recevant chaque jour 150µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours et traité par 10mg/kg de quercétine (Q) pendant 15 jours.
- **Groupe 4 (D + Ca):** 5 rattes, recevant chaque jour 150 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours, et traité par 400mg/Kg de flavonoïdes de *C.sinensis* (Ca) pendant 15jours.

I-2-3. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes

Les rattes sont anesthésiées par chloroforme (94%) après 16h de jeûne et sont sacrifiées (par décapitation). Le prélèvement sanguin s'effectue le moment de sacrifice des rattes dans des tubes EDTA pour FNS et des tubes secs pour les analyses biochimiques. Après, centrifugation du sang à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques (l'urée, acide urique, créatinine, bilirubine totale, fer sérique, protide, phosphatase alcalin, TGO, TGP).

Après la dissection, le foie et les reins sont soigneusement prélevés, rincés avec NaCl, et ensuite pesés. Une partie des organes est utilisée pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé pour faire des coupes histologique. Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, MDA, GSH, catalase, glutathion-s-transférase, et, GPx).

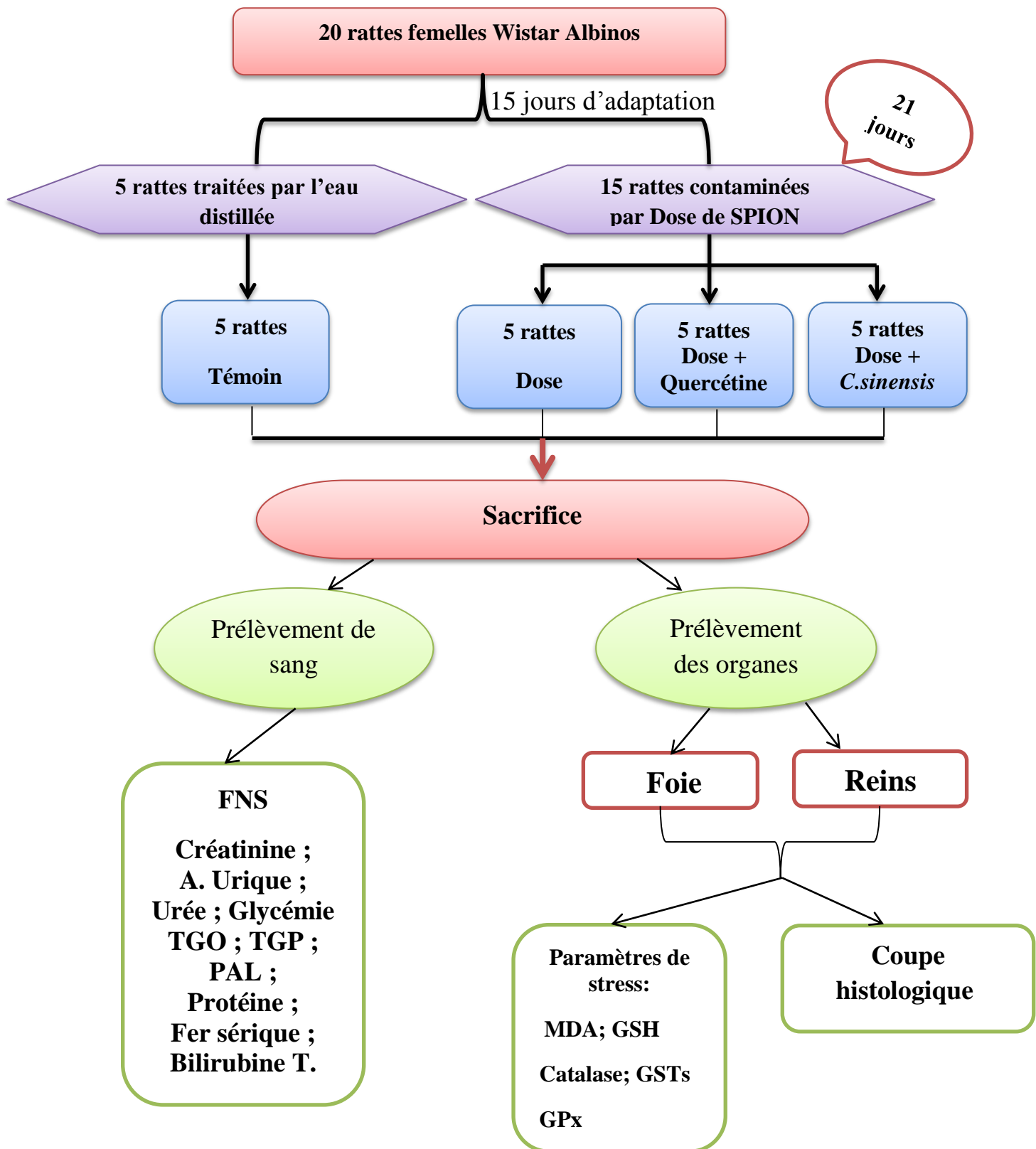


Figure 11: Protocol expérimentale de l'étude.

I-3 .Réactifs et produits utilisés

Nanoparticules d'oxyde de fer, Quercétine, l'acide ascorbique, Chlorure de sodium (NaCl), le 1-butanol, l'acétate d'éthyle, Méthanol, Bleu de Comassie, Tris, H₂SO₄, Ammoniac,

ALCL₃-ethanol, DPPH, Chlorure d'hydrogène (HCl), sérum bovin albumine (BSA), acide trichloroacétique (TCA), d'acétate de sodium, acide thiobarbiturique (TBA), Butylhydroxytoluène (BHT), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), Tampon phosphate (KH₂PO₄), acide salicylique, 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB), GSH, 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB).

Kit de réactif de l'urée, Kit de réactif de créatinine, Kit de réactif l'acide urique, Kit de réactif de protide, Kit de réactif de bilirubine totale, Kit de réactif de Fer sérique, Kit de réactif de l'aspartate aminotransférase, Kit de réactif de l'alanine aminotransférase, Kit de réactif de PAL.

I-4 .Matériels de laboratoires

- Évaporateur rotatif de type Büchi Rotavapor R-200.
- ampoule à décanter.
- Centrifugeuse horizontale de type SIGMA.
- Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240.
- Glycomètre de type Contour Ts.
- Bain-marie de type MEMMERT.
- Balance électrique de type KERN EMB 2200-O.
- Balance analytique de type KERN ABJ/ABS.
- Agitateurs magnétiques à plaque chauffante.
- Analyseur clinique automatisé de type BIOLIS 24I.
- Analyseurs d'hématologie de type Medonic.
- Microscope optique de type OPTIKA lié à un appareil photo.
- Micropipette.
- Hown.
- Verreries (bucher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).

II.Méthodes

II-1.Méthode d'extraction des flavonoïdes (fractions acétate d'éthyle et 1-butanol)

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée par la méthode décrite par **Bekkara et al., 1998**. Les solvants que nous avons employé pour le partage liquide-liquide sont : l'acétate d'éthyle et le 1-butanol .

Le résidu sec obtenu par évaporation du filtrat méthanolique de feuilles de la plante étudiée, est partagé entre 500 ml d'acétate d'éthyle et le même volume d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée et la phase aqueuse est à nouveau partagée avec 500 ml d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate d'éthyle est récupérée, additionnée à la précédente et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à 60°C. Cette fraction est la phase d'acétate d'éthyle.

La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est, quant à elle partagée avec 500 ml du 1-butanol. L'opération est répétée deux fois et la phase 1-butanol est séchée au rotavapeur à 60°C. Cette fraction est la phase butanolique (fig. 12).

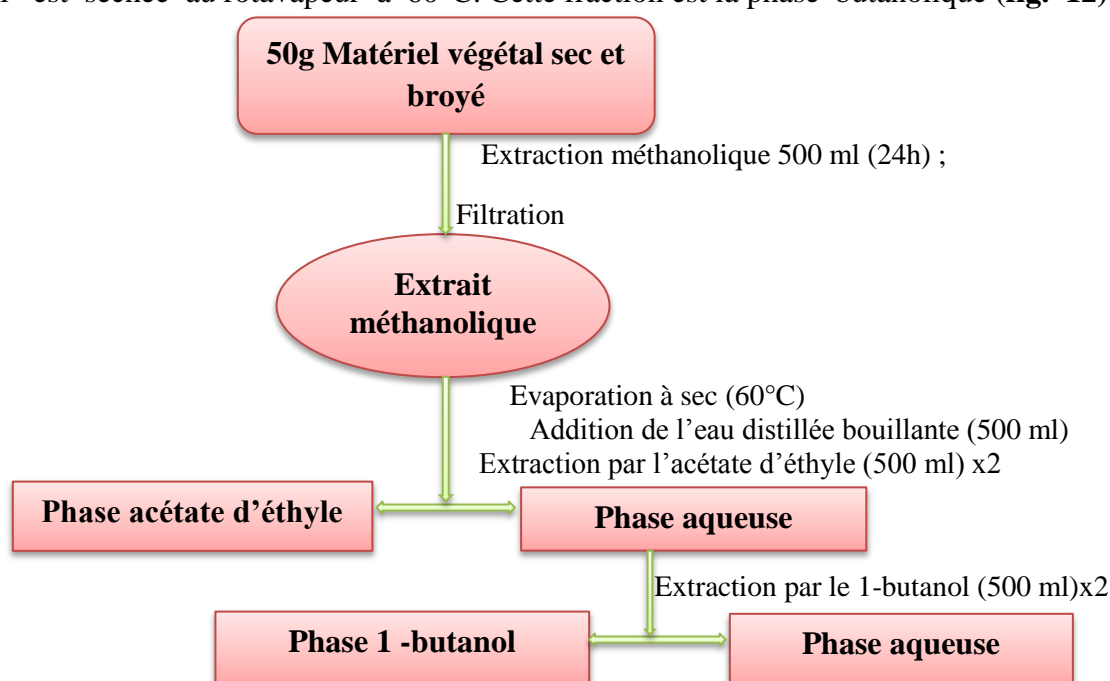


Figure 12: Protocole d'extraction des flavonoïdes.

II-2. Analyse phytochimique

Le test phytochimique a été réalisé sur le extrait préparé de la plante *Camellia sinensis* en milieu aqueux par de technique de caractérisation qualitative, selon les méthodes de (Evans., 2009; Harborne., 1998; Wadood et al., 2013).

✚ Détection des flavonoïdes

Ajouter dans un tube à essai, 5ml d'extrait à tester, 5ml ammoniac dilué et 1ml H₂SO₄. L'apparition d'une coloration jaune prouve montre que la présence des flavonoïdes.

II-3. Dosage de flavonoïdes totaux

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par **Dehpeur et al (2009)** : 500 µl de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 1500 µl de méthanol à 95 %, 100 µl de AlCl₃ à 10 % (m/v), 100 µl d'acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d'eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95 % et l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

La courbe d'étalonnage de la quercétine est effectuée par quercétine à différentes concentrations (0.625 - 1.25 - 2.5 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage.

II-4. Evaluation l'activité antioxydante de l'extrait de *Camellia sinensis* (l'extrait brut, fractions acétate d'éthyle, et 1-butanol)

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres (**Hemmami et Guezei., 2013**).

Les tests proposés pour la mise en évidence du pouvoir antioxydant et antiradicalaire de nos extraits phénoliques ont été réalisé par de test DPPH.

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune (**Parejo et al., 2002**).

L'activité de piégeage radicalaire des extraits contre les radicaux DPPH a été mesurée comme suit: une aliquote (1ml) d'une solution méthanolique contenant différentes quantités ont été ajoutés à 2ml d'une solution méthanol quotidienne DPPH préparée (0,1mM). Le mélange a été agité doucement et on laisse reposer à la température ambiante dans l'obscurité pendant 15min. Ensuite, l'absorbance a été lue à 515nm.

L'activité de piégeage a été mesurée par la diminution de l'absorbance des échantillons par rapport à une solution étalon DPPH (**Dziri et al., 2012**). Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant standard: l'acide ascorbique avec de concentration 0.001

jusqu'à 0.03ml/mg. dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons testés (Talbi et al., 2015).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage (%) du radical selon la formule DPPH:

$$\mathbf{I\% \text{ DPPH radical scavenging} = [(A_0 - A_s) / A_0] * 100}$$

Où: **I %**: Pourcentage d'inhibition

A₀: est l'absorbance du contrôle.

A_s: est l'absorbance de l'échantillon (Dziri et al., 2012).

✓ Détermination de la concentration inhibitrice IC 50%

Le paramètre IC50 qui indique le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait et qui est défini comme étant la concentration de l'extrait exprimée en mg/ml nécessaire pour balayer 50% du radical DPPH. La valeur d'IC50 de chaque extrait est déduite à partir des équations des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC50 est petite plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Bokhari et al., 2013).

II-5. Méthode de dosage des paramètres hématologiques

Le dosage des paramètres hématologique se fait par un analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800. On a basé sur la mesure des paramètres suivants: Globules blancs, globules rouges, hémoglobine, et plaquettes.

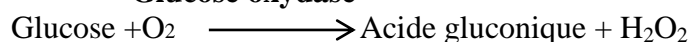
II-6. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique

II-6-1. Dosage de la glycémie

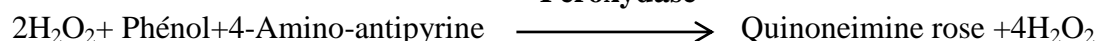
✚ Principe

La glycémie est la détermination enzymatique du glucose se fait selon les réactions suivantes:

Glucose oxydase



Peroxydase



✚ Mode opératoire

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif
- Doser selon le tableau ci-après. En suite lire les DO après une incubation de 10 minutes à 37°C ou 30 mn à 20-25 °C la coloration est stable 30 minutes.

Tableau 02 : Mode opératoire de dosage de glycémie

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	10µl	--
Echantillon	--	--	10µl
Réactif de travail	1ml	1ml	1ml

II-6-2. Méthode de dosage de fer sérique

❖ Principe

Le dosage de fer sérique se fait selon une méthode colorimétrique. A pH 4,8 le fer Ferrique (Fe⁺⁺⁺) est libéré instantanément de la transferrine. L'acide ascorbique le réduit en fer ferreux (Fe⁺⁺). La ferrozine forme avec le fer ferreux, un complexe coloré soluble, mesurable de 560 à 580 nm. La présence de thiourée permet d'éliminer l'interférence des ions cuivreux (Williams., 1977).

II-6-3. Méthode de dosage de bilirubine totale

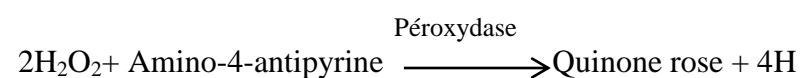
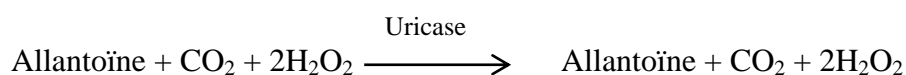
❖ Principe

La bilirubine totale a été déterminée suivant la méthode d'acide sulfanilique. Réaction entre la bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté qui conduit à un composé, l'azobilirubine, coloré en milieu très acide ou basique. Principe de Malloy-Evelyn modifié par Walters et al : en solution aqueuse, seule la BD réagit. Pour doser la BT il est nécessaire de rompre la liaison entre la bilirubine indirecte et l'albumine. Cette étape est réalisée par l'addition de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est proportionnelle à la concentration en bilirubine et est mesurée à 550 nm (530-580) (Walters & Gerarde., 1970).

II-6-4. Méthode de dosage d'acide urique

❖ Principe

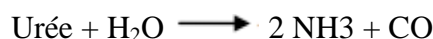
Le dosage d'acide urique est par l'utilisation de test colorimétrique Uricase-PAP. L'acide urique est dosé selon les réactions suivantes (Barham & Trinder., 1972):



II-6-5. Méthode de dosage d'urée sérique**❖ Principe**

Le dosage d'urée sérique se fait selon la méthode de Berthelot modifiée. L'urée est dosée en cinétique selon la réaction suivante :

Uréase



Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée (Mac Key & Rackeyll., 1927).

II-6-6. Méthode de dosage de créatinine**❖ Principe**

La créatinine a été déterminée suivant une méthode cinétique colorimétrique sans déprotéinisation. La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine (Larsen., 1972).

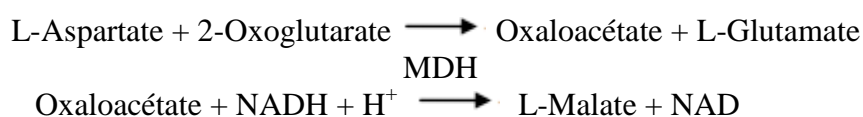
II-6-7. Dosage du protide sérique**❖ Principe**

Dans notre étude, le protide a été déterminé suivant une méthode colorimétrique par un Autoanalyseur de type (BIOLIS24j) en utilisant le Kit de réactif de protide sérique (Koller., 1984). En milieu alcalin, les protéines donnent une couleur violette/bleue en présence de sels de cuivre; ces sels contiennent du iodure qui agit comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéines totales dans l'échantillon testé, l'absorption est mesurée à 540 nm.

II-6-8. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)**❖ Principe**

Le dosage de l'activité de l'Aspartate aminotransférase (AST ou TGO) est selon une méthode développée par Karmen et optimisée par Henry (Conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant:

AST

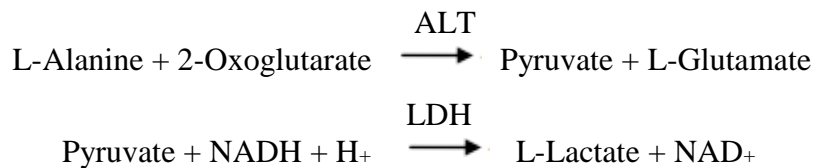


La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD et proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P₅P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (**Henry., 1960**).

II-6-9. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT)

❖ Principe

Le dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT ou TGP), est selon une méthode développée par Wroblewski et La Due, et optimisée par Henry et Bergmeyer (conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant :

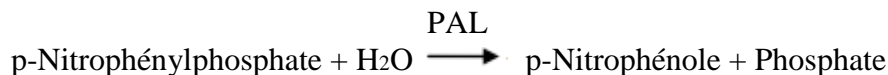


La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P₅P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (**Bergmeyer., 1978**).

II-6-10. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

❖ Principe

L'activité de la phosphatase alcaline a été déterminée suivant une méthode cinétique p-Nitrophénylphosphate DGKC. La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (pNPP) à pH 10,4 libérant du p-nitrophénole et du phosphate en fonction de la réaction suivante:



La vitesse de formation du p-Nitrophénole, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé (**Rosalki., 1993**).

II-7. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif

II-7-1. Préparation de l'homogénats des organes

Pour préparer l'homogénats, un gramme de t issu (foie, reins, cœur et la rate) est broyé dans la solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène pour chaque ratte. L'homogénat est centrifugé à 3000 t/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré puis conservés à -4°C. Cette surnageant est utilisé pour le dosage des paramètres de stress oxydatif.

II-7-2. Méthode de Dosage des protéines tissulaire

❖ Principe

Les protéines tissulaires ont été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un spectrophotomètre en utilisant le bleu de Comassie qui est réagi avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). L'absorption est mesurée à 595 nm (**Bradford., 1976**).

II-7-3. Méthode de dosage des Malondialdéhyde (MDA)

❖ Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (**Yagi., 1976**).

❖ Réactif : Pour 100 ml de réactif

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0,375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0,01% P/V ; Chlorure d'hydrogène (HCl) 1 N. 375 mg de TBA, 20g de TCA, 0,01g de BHT, 25 ml de HCl 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100 ml et le volume complété à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

❖ Mode opératoire

Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100µl d'échantillon, 400 µl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100 °C pendant 15 minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

❖ Expression des résultats

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1,53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon}/1,53 \times 10^5)/\text{mg de prot}$$

II-7-4. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH)

❖ Principe

Le complexe formé entre le GSH et l'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB), ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel présente une absorbance à 412nm (Weckbercker et Cory., 1988).

❖ Mode opératoire

Mélanger avec l'agitateur 0.8 ml de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) et laisser 15 minutes dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 t/min pendant 5 minutes. Puis, prélever 0.5ml de surnagent, ajouter le 1ml de solution tampon tris avec NaCl solution 1 avec 0.025ml de DTNB (0.01mol) méthanol solution 3. Laisser le mélange 5min de température de chambre puis lire l'absorbance avec spectrophotomètre d'absorption moléculaire à 412 nm contre le blanc (eau distillé).

❖ Calcule

$$(\text{GSH})(\text{nM}/\text{mg de prot}) = \frac{D_0 \times 1 \times 1.525}{13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de prot}} \times d$$

13133: constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

DO: la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525ml: volume total de mélange.

0.5ml: volume de solution surnagent.

1: volume de mélange de protéine.

0.8ml: volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

(GSH): concentration de glutathion.

d : facteur de dilution.

II-7-5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase

❖ Principe

L'activité de catalase consiste à mesurer la disparition de H₂O₂ induite par la catalase contenue dans l'échantillon en mesurant l'absorbance de H₂O₂ à 560nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible.

❖ Mode opératoire

Dans des tubes à essais en mélanger 1ml de tampon phosphate (KH₂ PO₄, 0.1 M, pH7.2), 0.975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (Aebi., 1984).

❖ Expression des résultats

L'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine), selon la formule:

$$UI/g = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) /g \text{ de protéine.}$$

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

II-7-6. Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs)

❖ Principe

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **Habig et al (1974)** ; celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenus dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. la variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm (**Habig et al., 1974**).

❖ Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µl)	Essai µl
▪ Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
▪ CDNB (0.02M)	50	50
▪ GSH (0.1M)	100	100
▪ Homogénat	-	20

CDNB: 1 chloro 2, 4 di nitrobenzène

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

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

$$GST \text{ (nmol GST/min/mg protéine)} = (DO \text{ échant/min} - DO \text{ blanc/min}) / (9.6 \times \text{mg de protein})$$

II-7-7. Méthode de dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

❖ Principe

Dans notre étude, L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de (**Flohe et Gunzler., 1984**), en utilisant un spectrophotomètre de type SHIMATZU. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



❖ Mode opératoire

Nous avons procédé aux étapes suivantes:

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

❖ Calcule

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante:

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg de prot}) = \left[\left(\frac{\text{Do échantillon} - \text{Do étalon}}{\text{Do étalon}} \right) \times 0.04 \right] \times 5/\text{mg de prot}$$

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

II-8. Technique histologique

L'analyse histologique a été réalisée au niveau d'une clinique privée de Touggourt. La technique utilisée est celle décrite par (Houlot., 1984) qui comporte les étapes suivantes:

II-8-1. Fixation des échantillons

Après sacrifice des ratte, les reins et le foie sont immédiatement introduisent pendant 12 heures dans le formol à 10% permettant l'immobilisation et la fixation des structures et constituants cellulaires puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml eau distillée) et sont coupés à

l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur de 1.5 mm.

II-8-2. Déshydratation

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

II-8-3. Inclusion

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion »

II-8-4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés et fixés par une eau gélative chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

II-8-5. Colorations

Assure la fixation permanente du colorant sur des groupements acides ou basiques des constituants cellulaires (à un pH donné) (Coloration HES (hématoxyline / Eosine / Safran))

-Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

-Les coupes doivent d'abord subir une réhydratation (**Gérard., 2012**). -Après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (100°, 95°, 70°) puis dans l'eau distillée.

-Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants.

II-8-6. Montage et observation

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre.

On dispose alors d'une préparation microscopique (appelée « lame ») prête à être observée les résultats par l'agrandissement x 40 au microscope optique (MO).

II-9. Méthode d'analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de cinq répétitions pour chaque groupe (\pm écartype moyen), et pour mieux visualiser les résultats on utilise la représentation graphique, les histogrammes, en utilisant **EXCEL 2007**. Aussi, On utilise **test T de student** à un facteur, avec $\alpha \leq 0.05$ pour les analyses significatives des résultats, et pour les comparaisons des moyennes en utilisant logiciel **MINITAB** (Version 13Fr). Si $P \leq \alpha / \alpha = 0.05$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité.

Chapitre II

Résultats et Discussion

II-1.Résultats

II-1-1-Étude phytochimique et dosage de flavonoïdes

Tableau 03: Test phytochimique de l'extrait aqueux de *Camellia Sinensis*.

Composé	Réactif	<i>Camellia Sinensis</i>
Flavonoïdes	H ₂ SO ₄	+++

Tableau 04: Contenu en flavonoïdes de l'extrait aqueux de *Camellia Sinensis*

Plante	Flavonoïdes (mg de Querc/g de MS)
<i>Camellia Sinensis</i>	21,494

II-1-2-Evaluation de l'activité antioxydante

Dans ce test on utilise l'acide ascorbique comme standard, le résultat obtenu (pourcentage d'inhibitions I%) est représenté dans la courbe d'étalonnage (**fig.13**), ayant l'équation: $y = 2566,8x + 23,731$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9631$.

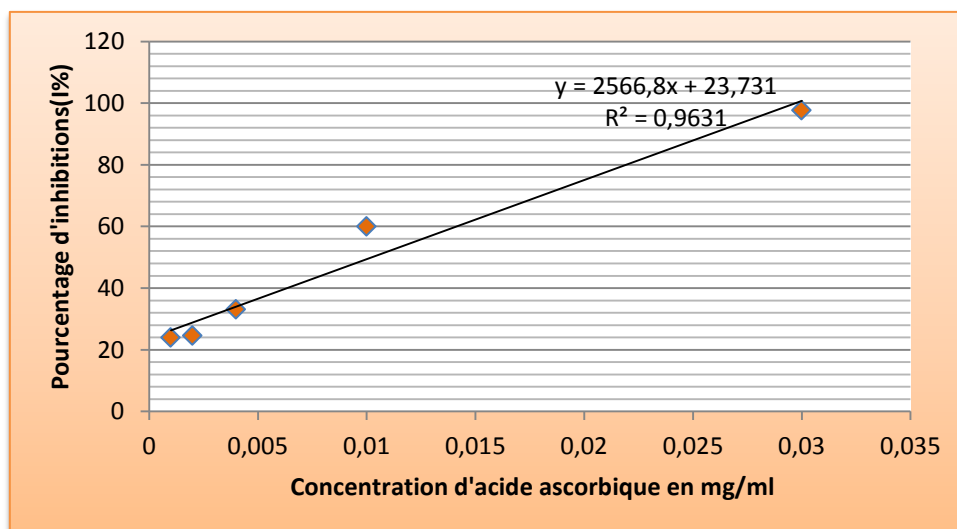


Figure 13: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique de test DPPH.

La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir des IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH•. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande.

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 03 et dans la figure sous forme d'histogramme.

Tableau 05 : valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits des feuilles de *Camellia Sinensis*

	IC ₅₀ exprimées en mg/ml		
	Extrait brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique
<i>Camellia Sinensis</i>	0,21	0,04	0,033
Acide ascorbique	0,01		

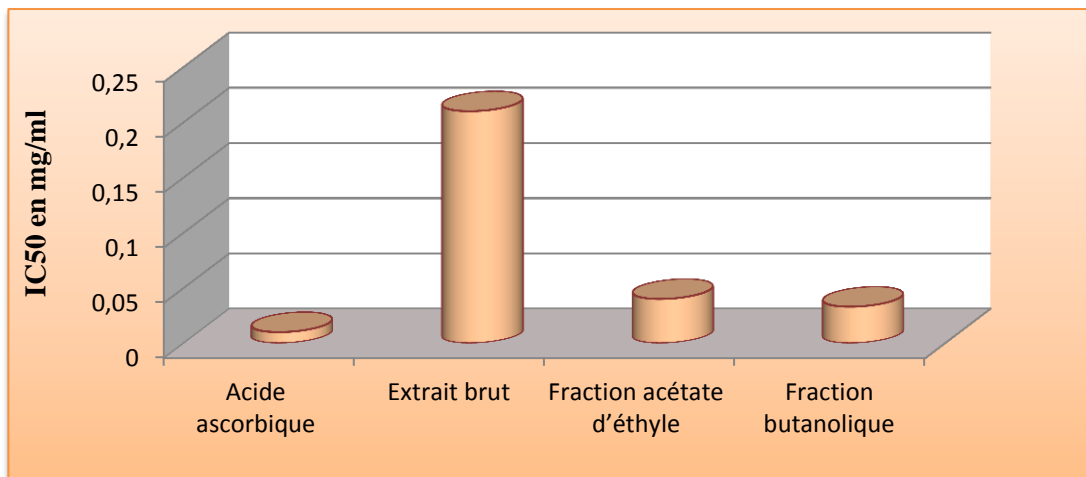


Figure 14: Valeurs IC₅₀ de *Camellia Sinensis* et composé standard (acide ascorbique).

II-1-3.Effet de traitement par la quercétine et *Camellia Sinensis* sur la croissance corporelle, et le poids relatif des organes

Tableau 06: Poids initiale, Gain du poids et poids relative des organes chez le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

Paramètres	Moy ± S.E.M				
	T	D	D +Q	D +Ca	
Poids initial (g)	180,20±3,37	187,20±9,67	181,20±4,97	188,60±9,66	
Gain du poids (g/j/rat)	0,657±0,153	0,829±0,145 ^{NS}	0,467±0,071 ^{NS a}	0,609±0,139 ^{NSNS}	
Poids relative (%)	Foie	2,793±0,082	2,774±0,182 ^{NS}	2,555±0,048 ^{NSNS}	3,208±0,339 ^{NSNS}
	Reins	0,662±0,019	0,594±0,042 ^{NS}	0,5480±0,0162 ^{NSNS}	0,6422±0,0341 ^{NSNS}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPION.

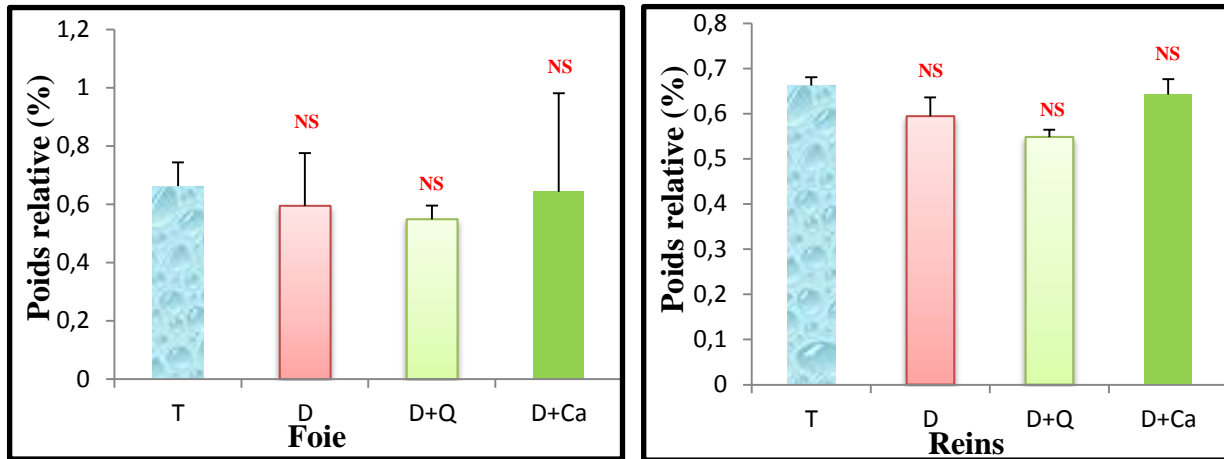


Figure 15: Poids relatif du foie et des reins chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p<0.05.

II-1-4. Effet de traitement par la quercétine et *Camellia Sinensis* sur des paramètres hématologiques, biochimiques et enzymatique chez les rattes contaminées par la Dose de SPION

II-1-4-1. Étude des paramètres hématologiques

Tableau 07: Taux d'hémoglobine, nombre des globules rouges, Lymphocyte, Monocytes, et des Plaquettes chez le groupe témoin et les groupes traités.

FNS	Moy ± S.E.M			
	T	D	D +Q	D +Ca
Hémoglobine (g/dl)	15,76± 0,77	10,10± 1,88**	17,78±1,41 ^{NS a}	15,92± 1,14 ^{NS b}
Globules rouges (x10 ³ /µl)	2,18±0,233	3,26± 0,227**	2,04±0,227 ^{NS b}	2,08± 0,18 ^{NS b}
Lymphocyte (x10 ³ /µl)	1,84± 0,423	2,96± 0,319*	2,3±0,311 ^{NS a}	2,08±0,39 ^{NS a}
Monocytes (x10 ³ /µl)	0,42± 0,0583	0,72±0,097*	0,5± 0,105 ^{NS a}	0,42± 0,128 ^{NS a}
Plaquettes (x10 ³ /µl)	466,6±30,3	263,2±12,2**	430,8±40,9 ^{NS a}	337,6± 22 ^{NS a}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPION.

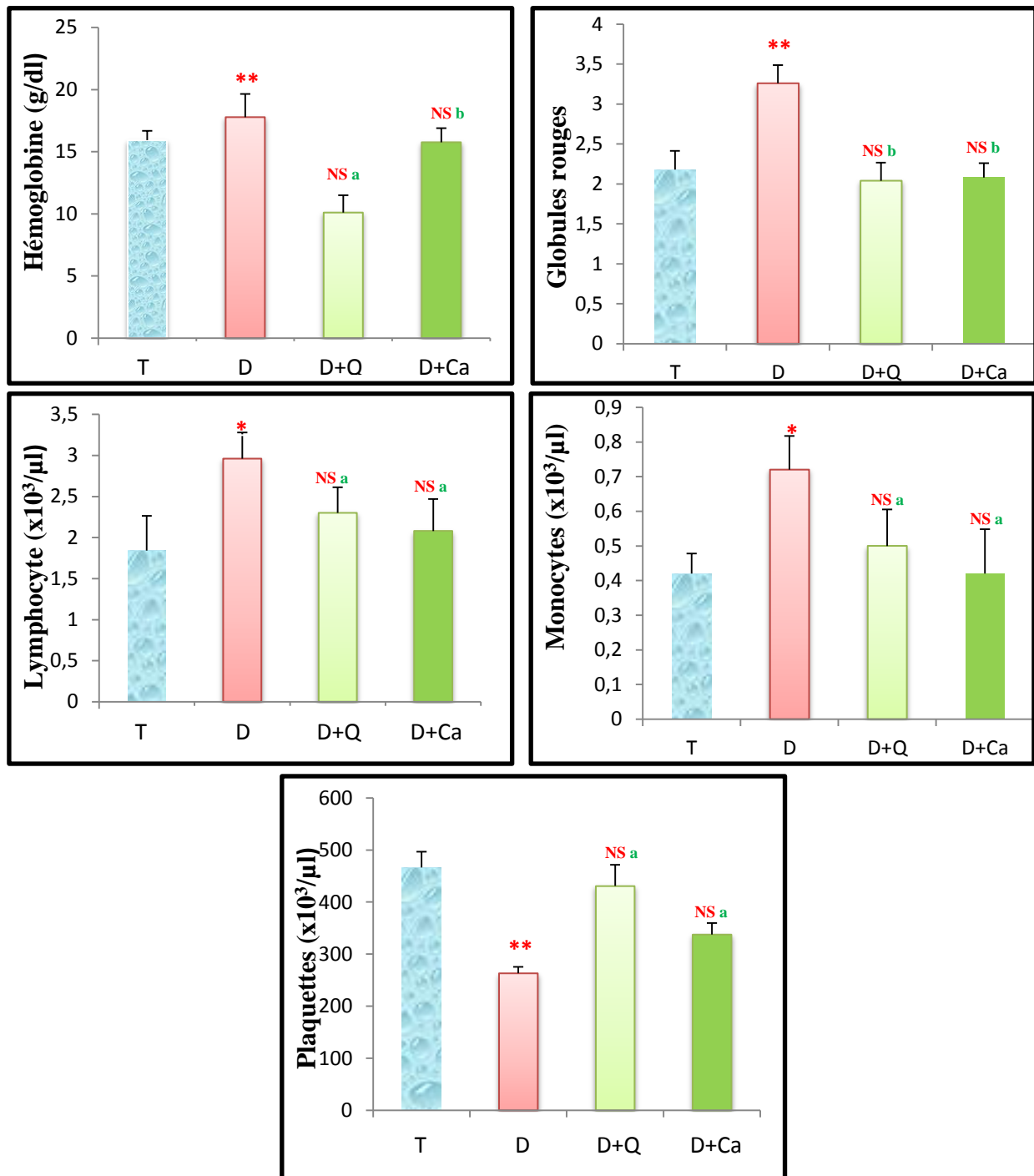


Figure 16: Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0.05; ** p < 0,01, avec groupe traité par la Dose de SPION : a p < 0.05 ; b p < 0.01.

II-1-4-2.Étude des paramètres biochimiques

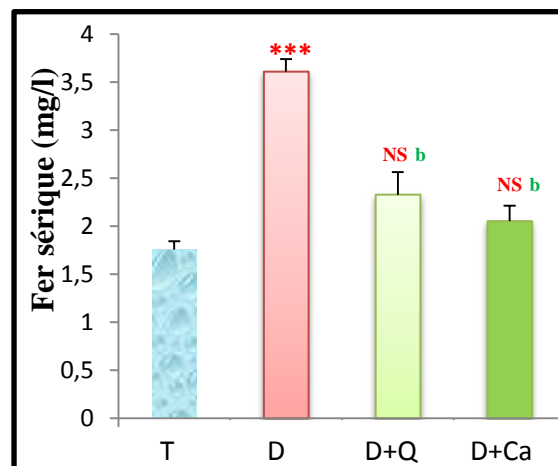
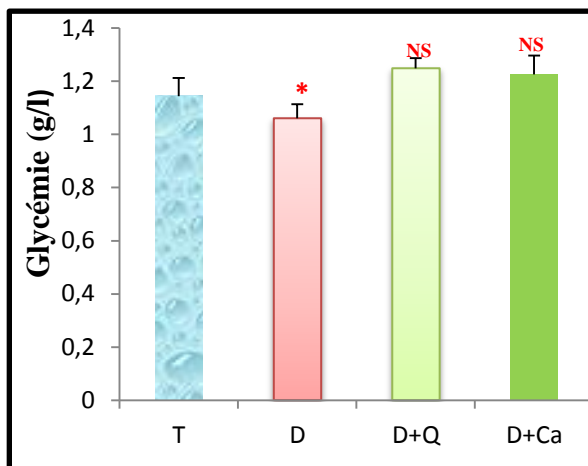
Tableau 08: Teneurs sérique en glucose, du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètres	Moy ± S.E.M			
	T	D	D +Q	D +Ca
Glycémie (g/l)	1,144±0,0685	1,06±0,0533*	1,248± 0,0387 ^{NSNS}	1,226±0,0707 ^{NSNS}
Fer sérique (mg/l)	1,756±0,088	3,608± 0,132***	2,328±0,235 ^{NS b}	2,052 ± 0,161 ^{NS b}
Bilirubine Totale (mg/l)	3,00± 0,47	6,940± 0,262**	3,04±1,08 ^{NS a}	3,88± 0,886 ^{NS a}
Acide urique (mg/l)	9,4±0,245	13,4 ± 0,40 **	11±0,447* ^a	11±0,632 ^{NS a}
Urée sérique (g/l)	0,442± 0,0913	0,866± 0,0246**	0,656± 0,0413 ^{NS a}	0,646±0,0201 ^{NS b}
Créatinine (mg/l)	6,86±0,108	8,38±0,237**	7,3 ± 0,300 ^{NS a}	7,02±0,275 ^{NS a}
Protide (g/l)	54,2± 0,49	57,2± 1,16 ^{NS}	55,8± 1,16 ^{NS}	48,6±11,5 ^{NS}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPOIN.



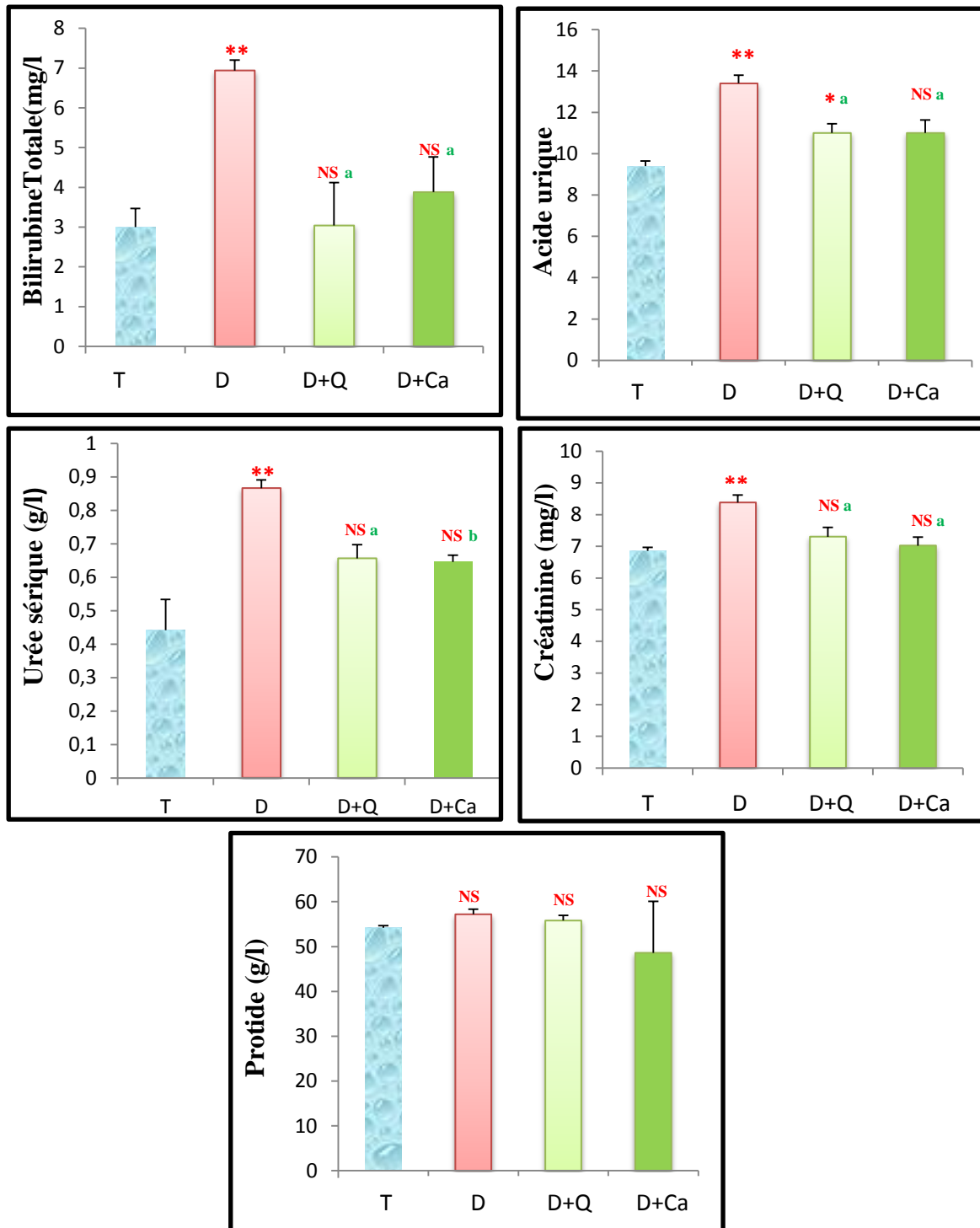


Figure 17: Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p<0.05; **p<0,01; *** p<0.001, avec groupe traité par la Dose de SPION : a p < 0.05 ; b p < 0.01.

II-1-4-3.Étude des enzymes sériques

Tableau 09: Activité du TGO, TGP, et PAL sérique chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètres (IU/l)	Moy± S.E.M			
	T	D	D +Q	D +Ca
TGO sérique	85,20± 3,97	111,20± 6,25**	96,40±3,98 ^{NS a}	96,00±2,43 ^{NS a}
TGP sérique	54,60± 3,19	72,60±2,01**	62,80± 2,06 ^{NS a}	59,20±4,21 ^{NS a}
PAL sérique	136,0±12,9	205,6±4,4*	146,0±10,0 ^{NS b}	141,8± 11,4 ^{NS b}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPOIN.

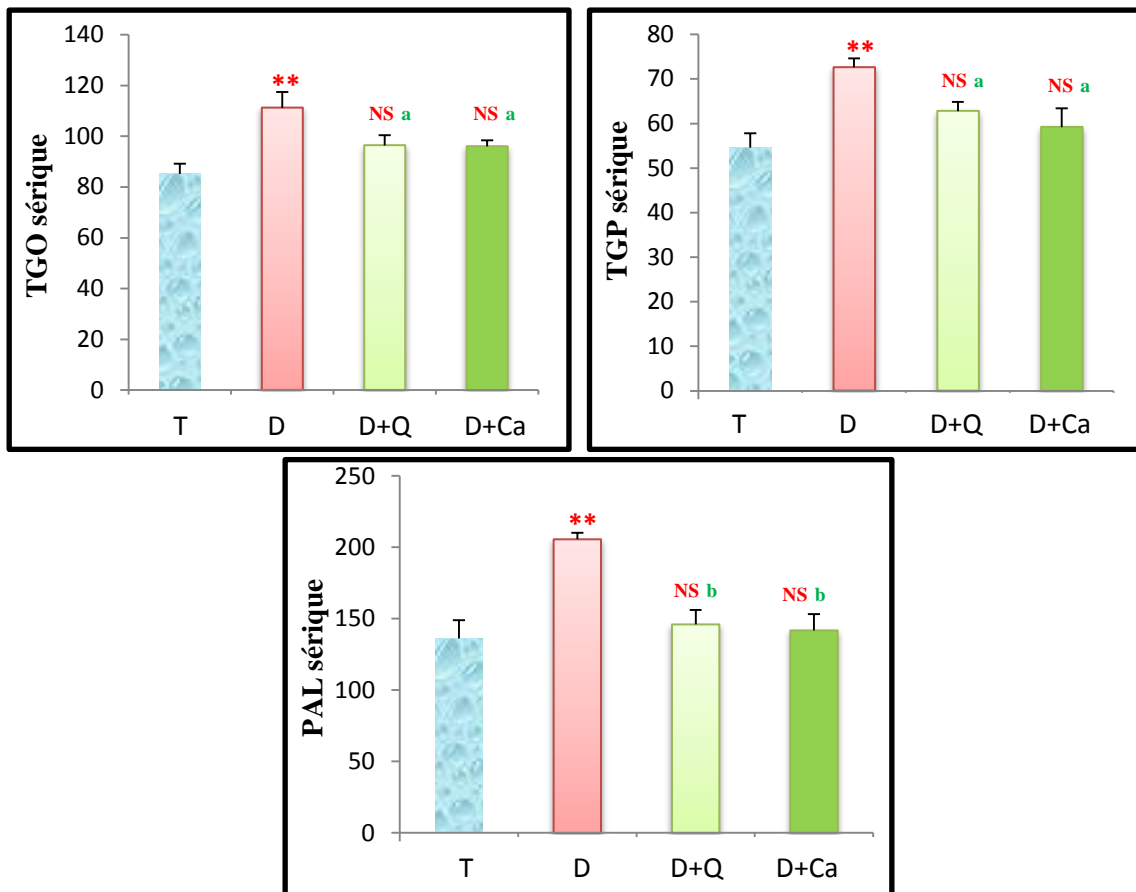


Figure 18: Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): ** p<0,01, avec groupe traité par la Dose de SPION : a p < 0.05 ; b p < 0.01.

II-1-5. Effet de traitement par la quercétine et *Camellia Sinensis* sur des paramètres de stress oxydant chez les rattes contaminées par la Dose de SPION

II-1-5-1. Etude de la peroxydation lipidique (MDA) et le glutathion réduit (GSH)

Tableau 10: Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) et glutathion réduit (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités.

		Moy± S.E.M			
Paramètres		T	D	D +Q	D +Ca
MDA (µmol/mg prot)	Foie	1,032±0,315	2,148±0,199**	1,128±0,256 ^{NS a}	1,353±0,215 ^{NS a}
	Reins	3,231±0,128	3,948±0,222*	3,419±0,237 ^{NS c}	3,466± 0,284 ^{NS a}
GSH (nM/mg prot)	Foie	0,373±0,101	0,242±0,070*	0,360±0,058 ^{NS a}	0,389±0,054 ^{NS b}
	Reins	0,646±0,143	0,426±0,162**	0,693±0,211 ^{NS b}	0,597±0,163 ^{NS b}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPOIN.

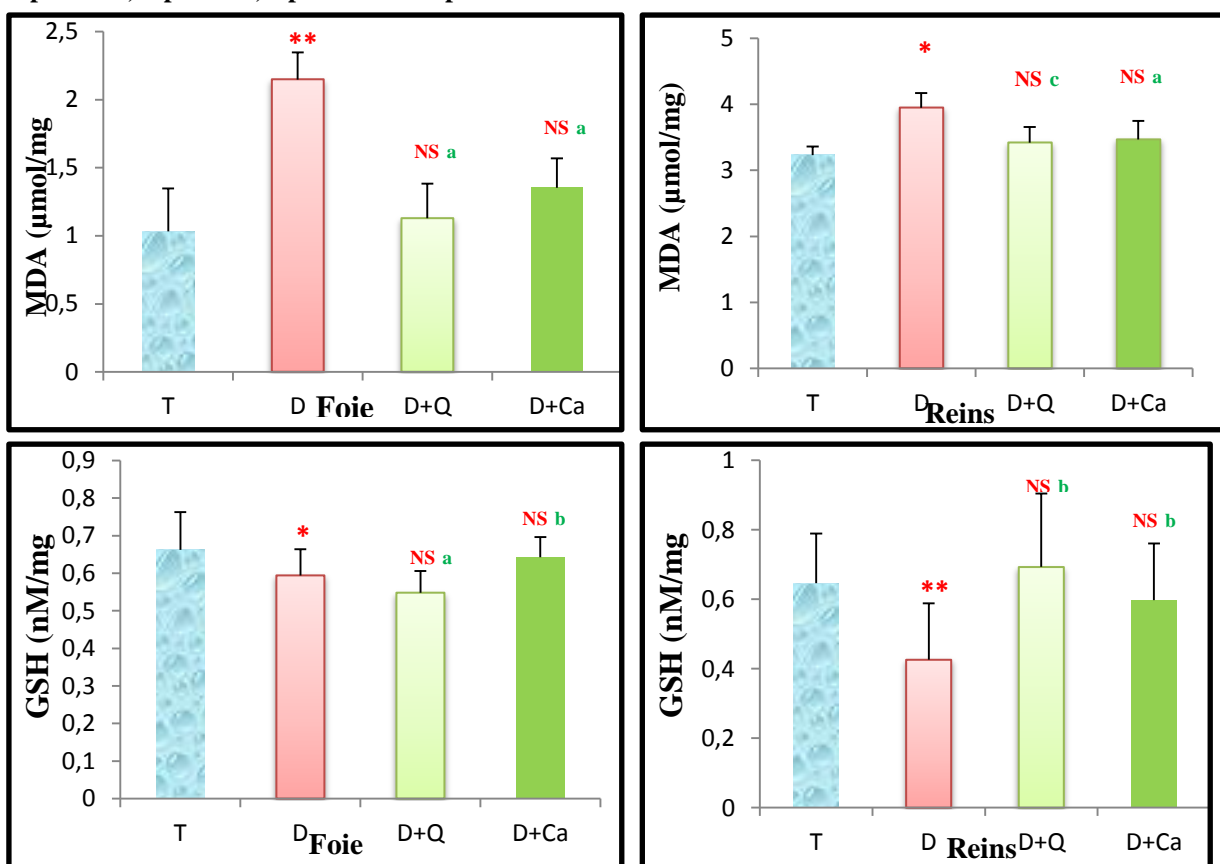


Figure19: Concentrations tissulaires de malondialdéhyde (MDA) glutathion réduit (GSH) chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0.05; ** p < 0,01, avec groupe traité par la Dose de SPION : a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001.

II-1-5-2. Etude de l'activité de de catalase, Glutathion S Transférase (GST), et GPx

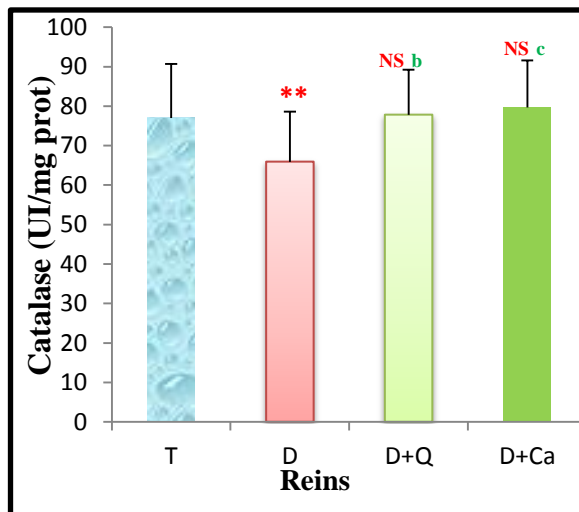
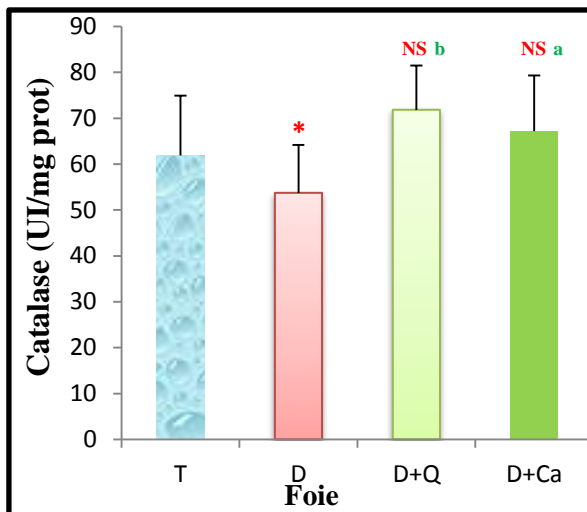
Tableau 11: Activité de catalase, glutathion S Transférase (GST), et GPx chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètres		Moy ± S.E.M			
		T	D	D +Q	D +Ca
Catalase (UI/mg prot)	Foie	61,9±13	53,7±10,5*	71,8±9,7 ^{NS b}	67,2±12,1 ^{NS a}
	Reins	77,0±13,7	65,9±12,7**	77,8±11,4 ^{NS b}	79,7±11,9 ^{NS c}
GST(nmol/min/mg prot)	Foie	3,08±0,693	1,9±0,459*	3,68±0,568 ^{NS b}	4,12±0,414 ^{NS b}
	Reins	2,872±0,455	1,782±0,318**	2,56±0,493 ^{NS a}	2,656±0,28 ^{NS c}
GPx (µmolGSH/mg de prot)	Foie	2,103±0,446	1,530±0,434*	2,516±0,377 ^{NS b}	2,695±0,374 ^{NS b}
	Reins	5,990±0,672	4,354±0,324*	5,136±0,435 ^{NS a}	4,918±0,469 ^{NS a}

Moy ± S.E.M de 05 rattes de chaque groupe.

*p < 0.05 ; **p < 0.01; ***p < 0.001 comparaison avec le lot témoin.

a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001 comparaison avec le lot Dose de SPION



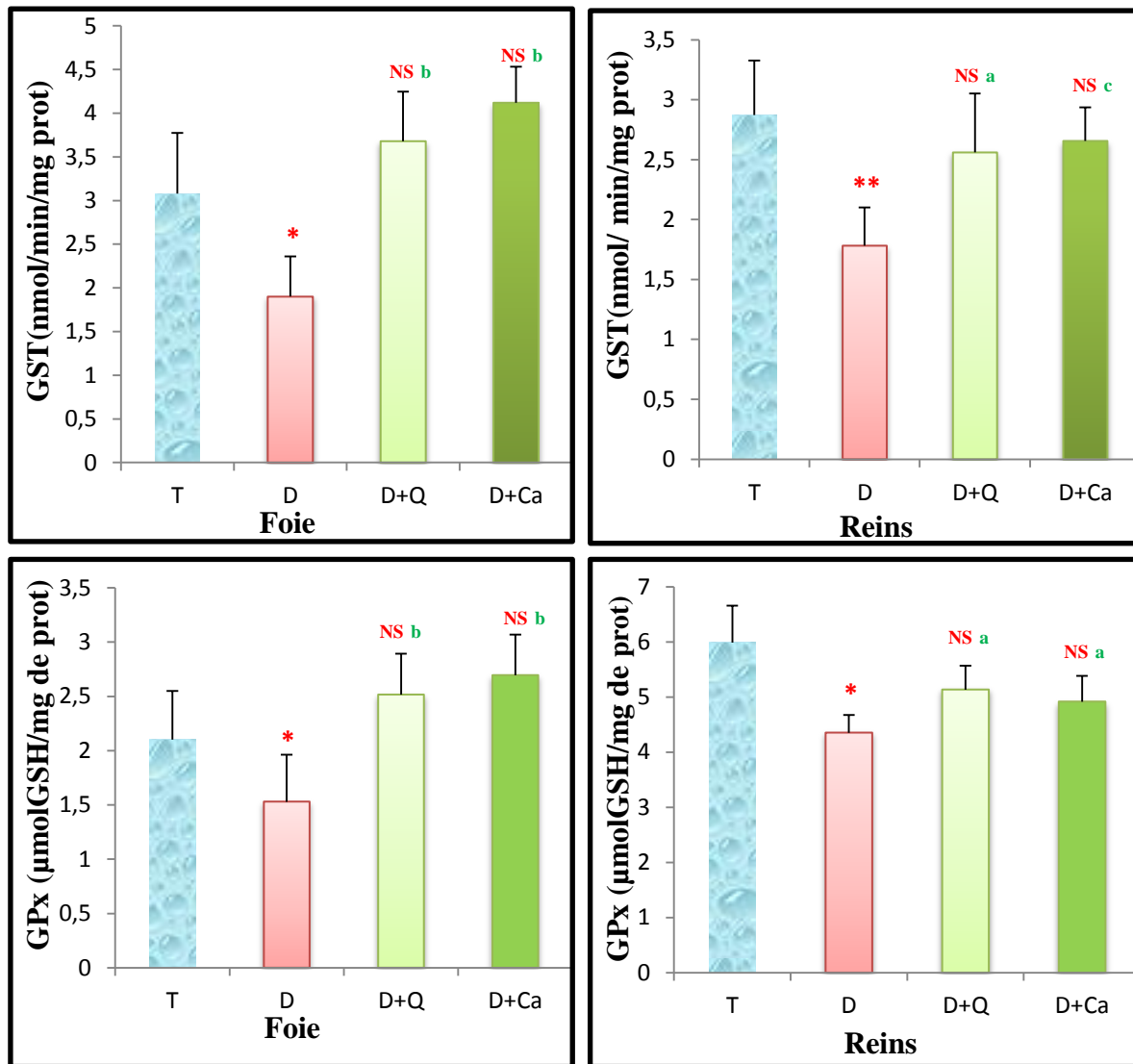
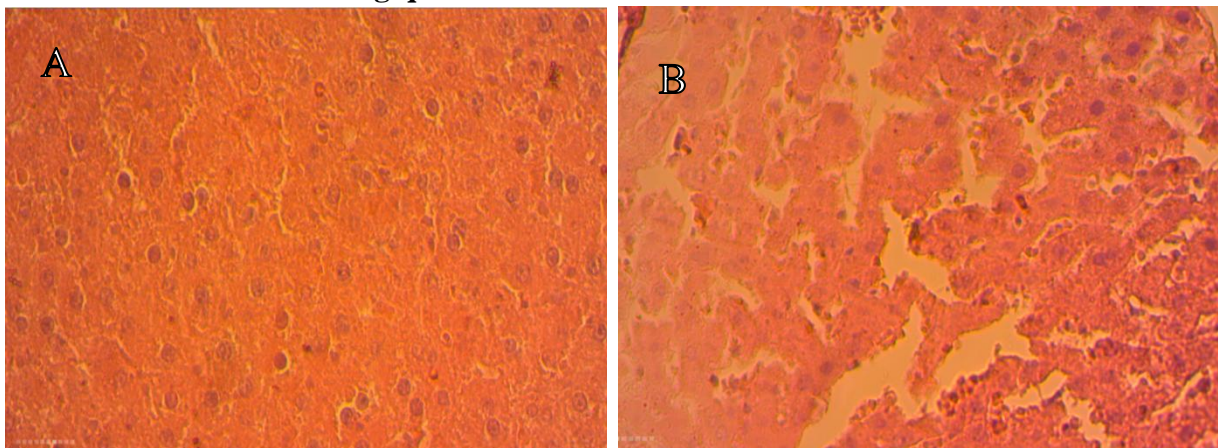


Figure 20: Activités tissulaires de catalase, GST, et GPx chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0.05; ** p < 0,01, avec groupe traité par la Dose de SPION : a p < 0.05 ; b p < 0.01; c p < 0.001.

II-1-6. Étude histologique



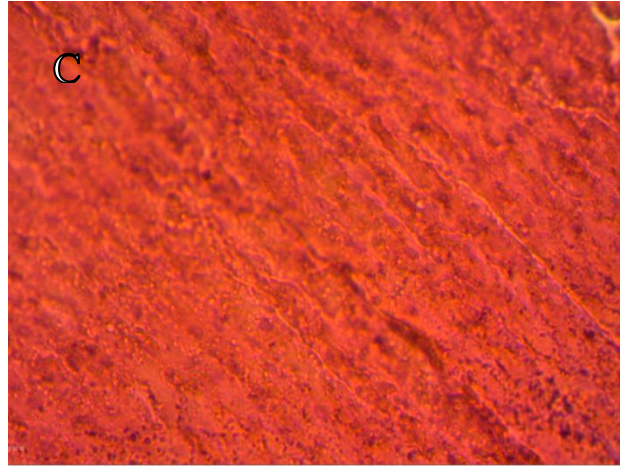


Figure 21: Observation microscopique d'une coupe histologique de foie, indique les changements morphométriques après traitement par la dose de SPION, agrandissement x40 (Photo originale, 2017); **A)**-Témoin, **B)**-Dose de SPION, **C)**-Dose de SPION + Quercétine.

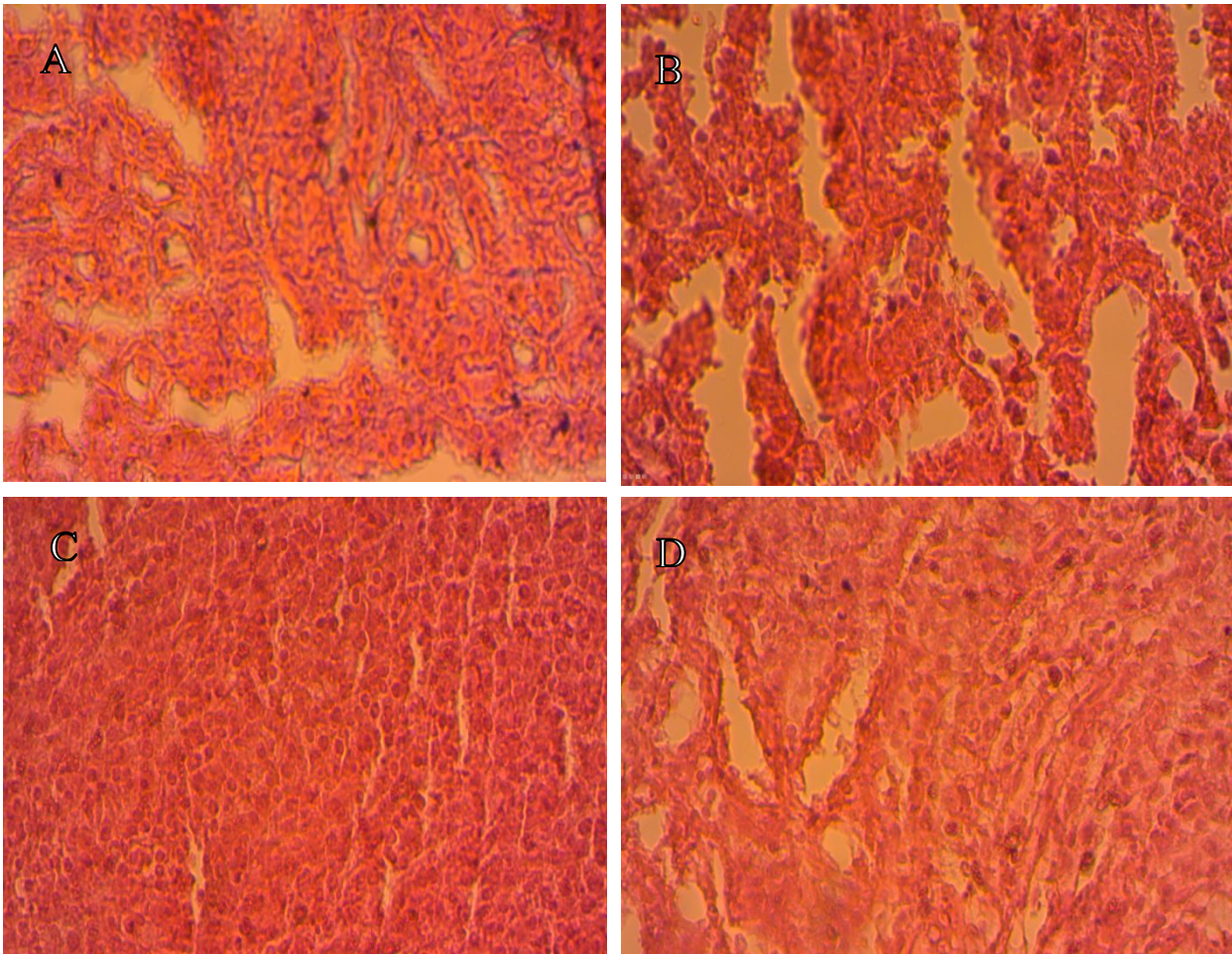


Figure 22: Observation microscopique d'une coupe histologique de rein, indique les changements morphométriques après traitement par la dose de SPION, agrandissement x40 (Photo originale, 2017); **A)**-Témoin, **B)**-Dose de SPION, **C)**-Dose de SPION + Quercétine, **D)**-Dose de SPION + *Camellia sinensis*.

II-2. Discussion

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont d'excellents exemples de l'intérêt de diminuer la taille pour accéder à des propriétés d'usages nouvelles ou améliorées (Haw *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces nanoparticules présentent actuellement un grand débat quant à leurs risques toxicologiques. En effet, elles peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé (Nel *et al.*, 2006 ; Cao *et Wang.*, 2011).

De nos jours, l'identification de nouveaux principes actifs et la découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques, en balance avec les effets néfastes de certains médicaments de synthèse, ont contribué à faire de la phytothérapie une médecine à part entière et à faire comprendre que les plantes pouvaient être d'authentiques médicaments. Parmi ces plantes, on trouve le thé vert (*Camellia sinensis*) qui renferme différentes substances actives utilisées en phytothérapie comme les flavonoïdes (Frei & Higdon., 2003). Actuellement, les flavonoïdes, sont largement étudiés pour leurs effets biologiques, activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Arts & Hollman., 2005). Les effets bénéfiques puissants des flavonoïdes ont particulièrement été attribués à la quercétine qui est un composant naturel important de la plante obtenue à partir de fruits et de légumes comme les oignons, les pommes, les baies, le thé et également des bioflavonoïdes d'agrumes. Elle a de fortes propriétés antioxydantes (Skaper *et al.*, 1997).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des flavonoïdes de *Camellia sinensis* et la quercétine contre la cytotoxicité et les dommages induit par les nanoparticules d'oxyde de fer chez les rattes Wistar.

L'analyse phytochimique (détection des flavonoïdes) de l'extrait de *Camellia sinensis* a révélé l'existence des flavonoïdes (+++) dont leurs teneur étaient 21,494mg/g de matière végétale sèche. Ces composés ont l'intérêt pour la prévention et le traitement de différentes maladies comme les cancers, les maladies inflammatoires, le l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives (Nkhili., 2009 ; Keerthi *et al.*, 2014).

En comparant les IC₅₀ des différents extraits testés des feuilles de *Camellia Sinensis* par rapport à celle de l'acide ascorbique (0,01), nous avons remarqués une activité antioxydante presque similaire et intéressante de la fraction d'acétate d'éthyle (0,04) et la fraction butanolique (0,033) des feuilles. Il en est de même pour l'extrait brut (0,21) qui représente une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus n'indiquent aucune variation significative de poids corporelle et de poids relatif de foie et des reins par rapport au témoin. Aussi, l'étude de Szalay *et al*

(2012) n'indique aucune variation significative de poids corporelle et de poids relatif de foie et des reins.

Nos résultats montrent que la concentration de fer sérique est augmentée de façon très hautement significative chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Ce résultat est en accord avec l'étude de **Kong et al (2011)** qui montre que l'exposition à SPION provoque une surcharge en fer dans l'organisme. Les SPION sont biodégradables sous l'action des enzymes lysosomales à faible pH dans l'estomac ; donc les ions fer libres s'augmentent dans le corps (**Singh et al., 2010**). La régulation du fer dans le sang est contrôlée par deux protéines d'absorption et d'exportation. La carence ou l'excès en fer peut être potentiellement toxique pour les cellules, c'est pourquoi son transport est rigoureusement contrôlé (**Gunnar et al., 2007**). Mais, avec un surdosage de fer, la mesure dans laquelle cette régulation est maintenue reste inconnue, mais il est supposé d'être submergé, permettant une absorption massive de fer, par ce qu'il n'y a pas un mécanisme physiologique efficace pour excréter l'excès de fer (**Raghupathy et al., 2010**).

Ainsi, les résultats obtenus montrent que le traitement par la quercétine et/ou les flavonoïdes de la plante *Camellia sinensis* aux rattes intoxiquées par le SPION a induit une diminution hautement significative de la concentration de fer sérique. Par ce qu'il n'y a pas des voies connues pour éliminer l'excès de fer dans le corps et donc l'homéostasie du fer est maintenue en modifiant l'absorption alimentaire, le mécanisme de la quercétine à diminuer l'effet toxique des SPIONs est par la diminution de l'absorption intestinal de fer en inhibant l'accumulation de fer dans l'organisme, par conséquent inhibe l'événement de stress oxydative (**Formica & Regelson., 1995**). De plus la quercétine est les flavonoïdes qui peuvent interagir fortement avec Fe III à pH 5,5. La complexation a lieu sur le site du groupement 5-hydroxy-4-carbonyle, ce qui pourrait être expliqué par la réduction préalable de Fe III en Fe II (**Mira., 2002**).

En outre, les recherches antérieures ont montré que les divers polyphénols abondants dans la plante *Camellia sinensis* sont considérés comme de bons chélateurs des ions de fer (**Sodergren et al., 1998; Welch et al., 2002**). Dans notre étude, l'extrait des flavonoïdes de la plante *Camellia sinensis* montre leur capacité à réduire Fe III est sous forme d'ion Fe³⁺ libre (**El Hajji., 2006**). Selon l'étude de **Sungur & Uzar (2008)**, les flavonoïdes possédant à la fois des groupements catéchol (cycle B) et 3-hydroxyle, ainsi qu'une double liaison (C2, C3), réduisent mieux Fe III en Fe II.

Nos résultats montrent une diminution hautement significative de la concentration de l'hémoglobine chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Ce résultat est en accord avec l'étude d'**Abdou et Hassan (2014)** qui ont montré la diminution de taux d'hémoglobine après la contamination des rattes par le SPION. Cela peut signifier une hématotoxicité révéler par une anémie dues à l'inhibition de la synthèse d'hème, et donc de l'hémoglobine (**Landrigan et Br Ind., 1989**).

Ainsi, les résultats obtenus montrent que le traitement par la quercétine aux rattes intoxiquées par le SPION a induit une augmentation significative de la concentration de l'hémoglobine et hautement significative par les flavonoïdes de *Camellia sinensis*. Selon l'étude de **Scalbert (2002)**, le mécanisme de la quercétine à diminuer l'effet toxique des SPIONs est par la diminution de l'absorption intestinal de fer en inhibant l'accumulation de fer dans l'organisme. En effet, On a révélé un effet protecteur des flavonoïdes de *Camellia sinensis* contre l'hématotoxicité, et indique que ces flavonoïdes peuvent protégées contre l'anémie. D'autres part, les flavonoïdes se lient aux radicaux libres générés par les agents oxydants notamment le fer (**Miura et al., 2001**).

Nos résultats indiquent aussi une augmentation des globules rouges de façon hautement significative par rapport au témoin. D'après **Scholz et al (1990)**, lorsque la moelle osseuse dispose d'une quantité suffisante d'EPO, cela augmente la production et la fabrication de globules rouges. En outre, si la concentration d'hémoglobine diminue, les taux d'érythropoïétine commencent à augmenter exponentiellement (**Reckziegel et al., 2016**).

D'autres part, les résultats obtenus indiquent une diminution hautement significative des globules rouges chez le groupe traité par la quercétine et les flavonoïdes de *Camellia sinensis* par rapport au groupe dose de SPION, ce qui indique que la quercétine et/ou les flavonoïdes de *Camellia sinensis* agissent comme agent régulateur de la processus de l'érythropoïèse (**Sagesak et al., 1994**).

Notre étude indique une augmentation significative des monocytes et des lymphocytes chez le groupes dose de SPION par rapport au témoin. Ces résultats montrent la présence d'une inflammation due à une réponse de l'état de stress oxydative induit par le fer (**Olivier., 2011**). Les ROS peuvent induire une réponse inflammatoire en médiant/activant des kinases sensibles au stress (kinase c-Jun N-terminal [JNK], isoformes de la protéine kinase C [PKC], protéine kinase activée par mitogène [p38-MAPK], inhibiteur de la kinase kappa B

[IKK- β]), lesquelles activent des facteurs de transcription nucléaires sensibles au redox tels que activator protein 1 (AP-1) et nuclear transcription factor κ B (NF κ B). Ces facteurs de transcription sont essentiels pour l'expression de gènes inductibles associés avec les réponses inflammatoires et immunitaires, incluant les cytokines (ex. TNF α , IL-6), les molécules d'adhésion cellulaire (ex. MCP-1), et la NO synthase inductible (**Lavrovsky., 2000**).

Ainsi, les résultats obtenus montrent qu'une diminution significative des monocytes et des lymphocytes chez le groupe traité par la quercétine et/ou les flavonoïdes de *Camellia sinensis*. D'après **Williamson et al (1996)**, la quercétine freine l'engrenage des phénomènes inflammatoires, inhibe fortement les enzymes qui favorisent les inflammations et de ce fait, un effet positif sur le cours de tous les processus inflammatoires (**Chattopadhyay et al., 2004 ; Liu et al., 2005**).

Par ailleurs, il semble que l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur la production des médiateurs pro-inflammatoires pourrait résulter de leurs propriétés antioxydants. Les EOA augmentent l'expression des gènes des médiateurs inflammatoires *via* l'activation des facteurs de transcription redox-sensibles tels que le NF- κ B et l'AP-1 (**Rahman et MacNee., 1998 ; Anto et al., 2002 ; Barnes et al., 2005**). Aussi **Kirkham et Rahman (2006)** ont été observé que les flavonoïdes inhibe l'inflammation et restaure l'efficacité des corticostéroïdes en réponse au stress oxydatif. Il a été également suggéré que les actions anti-inflammatoires des flavonoïdes peuvent s'étendre en inhibant l'activité de l'enzyme histone acétyltransférase (HAT) et préviennent ainsi l'acétylation de la chromatine médiée par le facteur NF- κ B (**Kang et al., 2005**).

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Da Silva et al., 1994 ; Rao et al, 2005**). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Mookerjee et al., 1986**). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (**Middleton & Drzewiecki., 1984**).

Les résultats obtenues montrent une diminution hautement significative des plaquettes chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Selon l'étude de **Manasa & Vani (2016)**, le stress oxydatif est l'une des causes de la diminution de l'efficacité et la durée de vie des plaquettes. Le mécanisme toxique principal du Fer réside dans sa capacité à induire la formation des radicaux, qui peuvent induire la diminution de nombre des plaquettes.

D'autres part, la protéine HFE, synthétisée localement, modifie l'affinité du récepteur à la transferrine pour la transferrine. En effet, lors de l'absence ou de la déficience de la protéine HFE, le DMT1 n'est plus régulé. Il s'exprime de façon importante, permettant une entrée trop élevée de fer dans les cellules. Elles sont, à des degrés plus ou moins importants, responsables de l'hémochromatose ou maladie de surcharge ferrique génétique (**Pietrangelo et al., 2004**).

Ainsi, les résultats obtenus montrent une augmentation significative de nombre des plaquettes chez le groupe traité par la quercétine et/ou les flavonoïdes de *Camellia sinensis*. Selon l'étude d'**Alrawaiq & Abdullah(2014)** qui ont été montrés que l'administration orale de la quercétine augmente la rétention de fer au sein du duodénum et a donné lieu à une diminution des niveaux de fer et de saturation de la transferrine sérique et tissulaire. C'est pourquoi, la quercétine est considéré comme un chélateur puissant du fer. En outre, *Camellia sinensis* en raison de sa teneur élevée en flavonoïdes, montre leur capacité à moduler la mégacaryopoïèse, qui est le système de production et de régulation de la production des plaquettes (**Roengsumran et al., 2000**).

Pour la glycémie, les résultats obtenus montrent une diminution significative chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Les travaux de **Li & Chen(2011)** ont interprétés que le SPION provoque des effets néfastes sur le pancréas et plus exactement sur l'excrétion d'insuline par les îlots de Langerhans, c'est-à-dire un état d'hyperglycémie.

Dans notre étude, on peut expliquer la diminution de la glycémie par l'intervention de l'érythropoïétine, qui a un rôle dans l'érythropoïèse, EPO joue un rôle important dans les métabolismes cellulaires (**Maiese et al., 2005**). Selon l'étude, de **Montel-Hagen et al (2009)** indique que l'abaisse de glucose sanguin associé à l'exposition à des niveaux élevés d'EPO peut résulter d'une augmentation des chiffres d'érythrocytes et de leur absorption conséquent de glucose. D'autres part, l'excès en fer inversement corrélée avec le taux de l'hémoglobine, ce qui induit une augmentation d'érythropoïétine (**Gundabolu et al., 2013**).

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative de l'activité de TGO, TGP et phosphatase alcaline chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Najafi et al (2012)** qui indiquent que l'activité de TGO, de TGP, et de PAL augmentent significativement avec la consommation 150µg/kg de nanoparticules d'oxyde de fer en comparaison du groupe normal. Aussi l'étude de **Lin &**

Adams (1991) indique que l'excès de fer induit une augmentation de l'activité de PAL. Ces enzymes sont normalement contenues dans des cellules de foie. Si le foie est blessé, les cellules de foie renversent les enzymes dans le sang, le niveau est augmenté dans les cas de mort de cellule de foie résultant de cas, comme le choc ou la toxicité de médicament (drogue). (**Hutchison et al., 2000; Sally et al., 2001 ; Pratt & Kaplan., 2000**). D'autres part, dans notre étude l'examen histologique montre que les nanoparticules d'oxyde ferrique ont causé de graves dommages dans les tissus du foie, ce qu'explique que l'augmentation de ces enzymes est induit par la surcharge en fer (**Picon., 1992**).

Ainsi, les résultats obtenus montrent que après le traitement par la quercétine et l'extrait flavonoïdique de *Camellia sinensis* provoque une diminution significative de l'activité de TGO, TGP et hautement significative de l'activité phosphatase alcaline. Ce qui signifie que la quercétine et/ou *Camellia sinensis* inhibent les dommages hépatiques causés par le l'excès de fer. Ceci pourrait être dû à la réduction de l'accumulation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydant (**Wiart., 2006**). D'après les études de **Shu-jun (2002); Kubo (1992)**, le thé vert en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libre. Les flavonoïdes du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénées réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatant les ions des métaux de transition sous des complexes inertes (**Kazuo., 2005**).

D'après nos résultats, la concentration de la bilirubine totale augmentée de façon hautement significative chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. La bilirubine est un pigment de couleur jaune qui provient de la dégradation de l'hémoglobine. On la retrouve principalement dans la bile et en faible quantité dans le sang (**Haleng et al., 2007**). On peut expliquer cette augmentation par une dysfonctionnement du foie et la vésicule biliaire est suspecté c'est-à-dire un problème au niveau de l'étape qui permet l'excrétion de la bilirubine dans la bile (**Vaishnav et al., 2015**).

En outre, nos résultats montrent que le traitement par la quercétine et/ou *Camellia sinensis* aux rattes intoxiquées par le SPION a induit une diminution significative de la concentration de la bilirubine totale. Des études sur la quercétine indiquent leur rôle dans l'augmentation de l'excrétion biliaire de la bilirubine, par conséquent, la diminution du taux de bilirubine sérique (**Igarashi., 1995 ; Kamada et al., 2005**). Aussi, l'extrait de thé vert

grâce à leur composés phénoliques notamment les flavonoïdes, ont la capacité de corriger la perturbation de l'excrétion biliaires (Nagao *et al.*, 2007).

Notre étude indique une augmentation hautement significative de la concentration d'acide urique, de l'urée sérique, et de la créatinine chez le groupe contaminé par la dose de SPION par rapport au témoin. Selon l'étude de Barbosa *et al* (2015) qui montrent qu'une surcharge en fer induit une augmentation de taux d'acide urique, de l'urée sérique de la créatinine. En effet, El-Nekeety *et al* (2009) ont montré que l'augmentation des taux d'urée dans le sang avec la diminution des taux de protéines sanguines peut indiquer par l'augmentation de catabolisme des protéines et/ou d'un dysfonctionnement rénal. Notre étude présente une absence d'une variation de concentration des protéines totale. Ceci confirme la présence d'une néphropathie caractérisée par une réduction de la filtration glomérulaire.

D'autre part, les résultats de l'étude de Mainous *et al* (2011) démontrent l'utilité de l'acide urique comme un marqueur de la surcharge en fer qui peut guider le dépistage ciblé de la toxicité de fer. L'acide urique est associé à l'inflammation, mais il fonctionne également comme un puissant endogène antioxydant, ce qui est plus probable est que l'augmentation de l'acide urique sérique, plutôt que d'être protectrice, peut refléter un mécanisme de compensation pour contrer l'augmentation du stress oxydatif.

En outre, la créatinine est dérivée du métabolisme de créatine (Rennke & Denker., 2007). Le niveau anormalement élevé de créatinine sérique était compatible avec la fonction rénale altérée (Almeida *et al.*, 2012), car la surcharge en fer peut provoquer un stress oxydative, qui peut affecter à la fois les cellules rénales endothéliales et épithéliales conduisant à une dysfonction rénale (Schetz *et al.*, 2010).

Dans notre étude, le traitement des rattes avec la quercétine et/ou *Camellia sinensis* a restauré la fonction rénale. L'effet protecteur de la quercétine et/ou *Camellia sinensis* a été reflété par la diminution des concentrations sériques de d'acide urique et de la créatinine de façon significative et l'urée sérique diminution de façon hautement significative. D'après l'étude de Lozoya *et al* (1994), la quercétine permet d'améliorer l'activité rénale. En outre, des études ont démontré que l'extrait de *Camellia sinensis* a induit une diminution des taux sérique de créatinine, d'urée et d'acide urique (Hsu *et al.*, 2003), car les extraits flavonoidiques de thé vert ont considérablement inhibé les dommages des radicaux libres déclenchés par le fer (Welton *et al.*, 1986).

Le stress oxydatif due à l'augmentation la production de ROS qui joue un rôle clé dans le déclenchement et la progression de nanoparticules d'oxyde de fer a incité la mort cellulaire (**Buyukhatipoglu et Clyne., 2011**). Les niveaux accrus de ROS provoquent une perturbation dans l'équilibre entre l'oxydation et les systèmes de défense antioxydant, qui mènent à l'apoptose via des dégâts oxydatifs aux protéines intracellulaires et l'ADN (**Naziroglu et al., 2009 ; Bartsch et Nair., 2000**). Ainsi, les dégâts pourraient s'accumuler plus rapidement dans la mitochondrie que dans les restes des composants cellulaires (**Brooks et al., 2007**).

Dans notre étude expérimentale, les résultats montrent une augmentation significative et hautement significative des niveaux du MDA rénal et hépatique respectivement chez les rattes contaminées par la SPION par rapport au témoin, mêmes résultats ont été obtenus par **Alarifi et al (2014) et El-Bahr (2007)**. Ils suggèrent que le traitement des rats par les nanoparticules d'oxyde de fer a induit une augmentation du taux du MDA tissulaire de foie et les reins. Ce résultat est expliqué par l'accumulation des radicaux libres. Ceci montre bien que les nanoparticules d'oxyde de fer sont capables d'inciter la génération des ROS, qui se traduit par la peroxydation lipidique dans les tissus hépatiques et rénaux, suggérant leurs effets néfastes dans ces tissus. La peroxydation des lipides membranaires par les espèces réactives de l'oxygène ROS détruit la structure et le fonctionnement des membranes. Donc elle rend les membranes plus rigides et moins fluides (**Ahamed et Siddiqui., 2007**). D'après les études de **Bacon et al (1983) ; Galleano et al (1994)** ont montrés une surcharge de fer des cellules de foie et de rein avec une augmentation de peroxydation des lipides hépatiques et rénal surtout les lipides mitochondriale.

Nos résultats montrent que le traitement avec la quercétine et/ou *Camellia sinensis* pourrait empêcher l'altération induite par SPION, et jouent ainsi un rôle important dans la prévention des maladies résultant de la peroxydation lipidique. Cela peut être dû à la forte activité antioxydante de la quercétine (**Mete Tanir et al., 2005 ; Kumar et al, 2003**). En autres, La pré-incubation avec les flavonoïdes de thé vert empêche la peroxydation lipidique (**Levin et al., 1990**).

Nos résultats montrent aussi une diminution significative et hautement significative des niveaux de glutathion dans le foie, et les reins respectivement chez le groupe dose de SPION par rapport au témoin. Selon l'étude d'**Abhijit et Parames (2014)**, ont montré une diminution de l'activité de GSH chez les rats intoxiqués au SPION. Cette baisse de GSH est expliquée par l'augmentation du taux des radicaux libres. Une fonction majeure de GSH est la

détoxication et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Ces composés sont conjugués avec GSH soit spontanément, soit par voie enzymatique dans des réactions catalysées par la GSH-S-transférase (GSTs), ce qui peut être expliqué la diminution de concentration tissulaire de GSH dans le foie et les reins (**DeLeve & Kaplowitz, 1990**).

Nos résultats montrent que le traitement avec la quercétine et/ou les flavonoïdes de thé vert augmentent la concentration de GSH de manière importante dans les tissus étudiés. Donc, la quercétine et/ou les flavonoïdes pourraient empêcher l'altération induite par la SPOIN, et jouent ainsi un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres (**Abhijit et Parames., 2014**).

Pour neutraliser les effets indésirables des molécules oxydantes dans les tissus, les cellules utilisent des enzymes d'antioxydant comme Catalase, GST, et GPx pour enlever ROS superflu (**Ghosh et al., 2012 ; Ercal et al., 1996**). Nos résultats ont montré une diminution significative et hautement significative de l'activité de catalase dans le foie et les reins respectivement chez les rattes contaminées par SPION. Ce résultat est en accord l'étude d'**Abdala et al (2011)** qui montre que l'excès de fer diminue l'activité de catalase dans le foie et les reins. on peut expliquer la diminution de l'activité de catalase par la surcharge de fer intracellulaires a diminué l'activité de cette enzyme d'antioxydant (**Khan et al., 2012**). D'autres études montre que la production accru de ROS réduit l'activité des enzymes d'antioxydants superoxyde dismutase , GSH et le catalase à suggérer que des nanoparticule d'oxyde de fer causés déséquilibre entre la production et la dégradation de ROS (**Kakkar et al., 1984**).

Le système enzymatique contient également la glutathion S-transférase qui catalyse la réaction entre le glutathion réduit et les molécules oxydantes avec la formation des métabolites glutathion-conjugués (GSSG). D'après nos résultats, on observe une diminution significative et hautement significative de GST respectivement dans les tissus étudiés (foie, reins) chez le lot (D) par rapport au témoin, ce résultat est confirmé par l'étude **Alarifi et al (2014)**. D'autre part, l'étude de **Li et al (2013)** montre la présence d'une corrélation entre la diminution de GSTs et l'apparition de stress oxydatif.

Dans la présente étude, les résultats montrent une diminution significative de GPx dans les tissus étudiés (foie, reins). Ce résultat est confirmé par l'étude d'**Abhijit et Parames (2014)** qui ont montrés que la surcharge de Fe₂O₃ intracellulaire a diminué l'activité de GPx.

Nous avons observé que le traitement par la quercétine et /ou les flavonoïdes de thé vert a augmenté les activités d'enzymes antioxydants réduits (Catalase, GST, et GPx). Les

mêmes résultats sont confirmés par l'étude de **Hui et al (2012)** qui ont été montrés que le traitement par la quercétine a augmenté des activités d'enzymes antioxydants notamment Catalase, GST et GPx. D'autres parts l'extrait de *Camellia sinensis* ont un effet protecteur contre les dommages oxydatifs induits par l'excès en fer. L'augmentation de l'activité de ces enzymes antioxydants peut servir de mécanisme de compensation supplémentaire pour maintenir l'intégrité de la cellule et la protection contre les dommages des radicaux libres.

L'étude histologique de foie, indique la présence d'une surcharge de fer dans le tissu hépatique chez le groupe intoxiqué par SPION avec la présence d'une nécrose cellulaire. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Babadi et al (2012)** qui montre que le traitement avec les SPIONs induit une surcharge de fer dans les tissus hépatique avec un dommage de ces tissus surtout au niveau des cellules de Kupffer. Cette surcharge en fer dans les hépatocytes peut-être parce que la réserve de fer se trouve essentiellement au niveau des cellules réticulo-endothéliales du foie (**Ganong., 2004**). Aussi les résultats indiquent la présence d'une inflammation au niveau de tissu hépatique. Cette inflammation est induite par le stress oxydatif (**Closa & Folch-Puy., 2004**).

Selon l'étude de **Sánchez-Valle et al (2012)**, le stress oxydatif perturbe les lipides, les protéines et l'ADN, induit une nécrose et l'apoptose des hépatocytes et amplifie la réponse inflammatoire.

D'après les résultats de la présente étude, l'exposition au SPION produit des dommages histologiques dans les reins inclure une nécrose, dilatation, nécrose glomérulaire, hémorragie, cellules inflammatoires. Des changements similaires chez les rattes ont été rapportés par des recherches antérieures **d'El-Nekeety et al (2009)** et **Kansal et al (2011)**. ce qui pourrait être dû à la production excessive des radicaux libres et à la suite de la peroxydation lipidique induite par SPION (**Aziz., 2012**).

Dans notre étude, nous avons évalués la capacité de la quercétine et *Camellia sinensis* à régénérer les tissus rénales et hépatiques, qui montre le fort pouvoir antioxydant de la quercétine et de thé vert en raison de sa teneur élevée en flavonoïdes.

Conclusion

Conclusion

Aujourd'hui, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION) ont attiré beaucoup d'attention en raison de leur grand potentiel dans plusieurs applications cliniques biomédicales et *in vivo*. Malgré la large gamme d'applications, il y a un grave manque d'informations sur l'impact toxique de ces nanoparticules sur la santé. L'utilisation des plantes médicinales est encore aujourd'hui la forme de la médecine la plus répandue à travers le monde, qui permet de remédier à des problèmes du quotidien de manière naturelle. Depuis toujours, les substances actives dans les plantes ont été utilisées pour prévenir ou traiter diverses maladies. Parmi ces substances on trouve la quercétine. De nos jours, La quercétine fait l'objet des plusieurs rapports scientifiques qui montre leur effets biologiques bénéfiques.

Notre travail a été pour l'objectif d'évaluer l'effet de *Camellia sinensis* et la quercétine contre la cytotoxicité et les dommages induit par les nanoparticules d'oxyde de fer chez les rattes Wistar.

D'après notre étude, nous avons observé que l'analyse phytochimique montre que l'extrait de la plante *Camellia sinensis* est très riche en flavonoïdes qui possèdent des fortes propriétés d'antioxydants protectrice de l'organisme. D'autre part, nous avons observé que les nanoparticules d'oxyde de fer ont un effet toxique sur quelques paramètres biochimiques et hématologiques étudiés. En outre, nos résultats montrent également que les nanoparticules d'oxyde de fer diminue provoque un stress oxydatif, donc, une augmentation de la peroxydation lipidique.

Le traitement par *Camellia sinensis* et la quercétine contre la cytotoxicité et les dommages provoqué par les nanoparticules d'oxyde de fer, induit une importante restauration de certains paramètres hématologiques, biochimiques et diminue l'état de stress oxydant induit par l'exposition au NPsFe_2O_3 par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des oxydantes en diminuant la peroxydation lipidique au niveau hépatique et rénale, ce qui montre le fort pouvoir protecteur de l'extrait flavonoïdique de cette plante *Camellia sinensis* et la propriété antioxydant de la quercétine contre la dysrégulation physiologique de plusieurs systèmes biologiques en relation avec les paramètres étudiés.

L'analyse tissulaire réalisée au niveau le foie et des reins a permis de montrer que *Camellia sinensis* et la quercétine provoquent une protection et une régénération remarquable de tissu rénale et hépatique.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abdalla, M.Y., Fawzi, M., Al-Maloul, S.R., El-Banna, N., Tayyem, R.F., & Ahmad, I.M., (2011).** Increased oxidative stress and iron overload in Jordanian β -thalassemic children. *Hemoglobin*, 35(1), 67-79. doi: 10.3109/03630269.2010.544624.
2. **Abdoun, H.M., & Hassan, M.A., (2014).** Protective role of omega-polyunsaturated fatty acid against lead acetate-induced toxicity in liver and kidney of female rats. *BioMed Research International*, 1-11.
3. **Abhijit, S., Parames, C.S., (2014).** Iron oxide nanoparticles mediated cytotoxicity via PI3K/AKT pathway: Role of quercetin. *Food and Chemical Toxicology* 71, 106-115.
4. **Aebi., (1984).** Catalase. In L. Pacher (ED). *Méthod in enzymology* académie press. Oelamode, 105: 121-126.
5. **Ahamed, M., et Siddiqui, M.K.J., (2007).** Low-level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *CLINICA CHIMICA ACTA*, 383: 57-64. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.024.
6. **Alarifi, S., Ali, D., & Alkahtani, S., (2014).** Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress, DNA Damage, and Caspase Activation in the Human Breast Cancer Cell Line. *Springer Science+Business Media New York*. PP7-9.
7. **Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R. J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W. S., & Wagenpfeil, A. S., (2000).** Lubbe, Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, *Cancer Res*, 60 (23), 6641-6648.
8. **Almeida, D.A.T., Braga, C.P., Novelli, E.L.B., & Fernandes, A.A.H., (2012).** Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ induced rats treated with antioxidant vitamin. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55(4), 527-536.
9. **Alrawaiq, N.S., & Abdullah, A., (2014).** A Review of Flavonoid Quercetin: Metabolism, Bioactivity and Antioxidant Properties. *International Journal of PharmTech Research*.
10. **Amieva, H., Andrieu, S., Berr, C., Buée, L., Checler, F., Clément, S., et Dartigues, J.F., (2007).** *Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux*. Paris Institut National de la Santé et de la Recherche Médical.
11. **Arbab, A.S., Wilson, L.B., Ashari, P., Jordan, E.K., Lewis, B.K., & Frank, J.A., (2005).** A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*, 18, 383-389. doi: 10.1002/nbm.970.

12. **Andrews, N.C. (2002).** Physiologie et métabolisme du fer. *NEJM*, vol353, n°23, 2508-2509.
13. **Angelos, M.G., Kotalav, K., Torres, C.A., He, G., Stoner, J.D., Mohammed, M., & Kuppasamy, P., (2005)-** Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Vol. 290(1): 341-347.
14. **Anto, R.J., Mukhopadhyay, A., Shishodia, S., Gairola, C.G., and Aggarwal, B.B., (2002).** Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B α : correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 23: 1511-1518.
15. **Arts, I.C., and Hollman, P.C., (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 81: 317S-325S.
16. **Aurélié, M., (2007).** Étude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques :Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau. Thèse doctorat.UDT.213p.
17. **Aziz, F.M., (2012).** Protective Effects of Latex of *Ficus carica* L. against Lead Acetate-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 5 (3) : 175 –182.
18. **Babadi, V.Y., Najafi, L., Najafi, A., Gholami, H., Beigi Zarji, M.E., Golzadeh, J., Amraie, E., & Shirband, A., (2012).** Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats. *J Pharm Biomed Sci*, 23(04), 1-5.
19. **Babadi, Y., (2013).** Evaluation of Iron Oxide nanoparticles effects on tissue and Enzymes of Thyroid in Rats. *Annale de l'ISSN*. vol. 2 (7): 1-3.
20. **Bacon, B.R., Tavill, A.S., Brittenham, G.M., Park, C.H., & Recknagel, R., (1983).** Hepatic lipid peroxidation in vivo in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest*, 71, 429-439.
21. **Bahorun, T., (1997).** Substances Naturelles actives:La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius, p83.
22. **Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T., (2005).** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
23. **Banerjee, B., & Chaudhuri, T.C., (2005).** Therapeutic effects of tea. *Science Publisher*. 23-28.

24. **Barbosa, M.C., Santos, T.E., Souza, G.F., Assis, L.C., Freitas, M.V., & Gonçalves, R.P., (2015).** Impact of iron overload on interleukin-10 levels, biochemical parameters and oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 35(1), 29-34. doi: 10.5581/1516-8484.20130011.
25. **Barham, & Trinder., (1972).** *Analyst*, 97, 142. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20091.
26. **Barnes, P.J., Adcock, I.M., and Ito K., (2005).** Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J.* 25: 552–563.
27. **Barouki, R., (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* ; 22 : 266-72.
28. **Bartsch, H., Nair, J., (2000).** New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur. J. Cancer* 36, 1229-1234.
29. **Baudin, B., (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* 2(1):43-52.
30. **Beaumont, C., (2004).** Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer. *Médecine Sciences.* 20, 68-72.
31. **Beaumont, C., & Canonne-Hergaux, F., (2005).** Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin. *Transfus. Clin Biol*, 12, 123-130. doi: 10.1016/j.tracli.2005.04.017.
32. **Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of tow *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 203: 27-36.
33. **Bendada, K., et Boulakradeche, M.W., (2011).** Optimisation des conditions de dosage par spectroscopie d'absorption atomique (SAAF et SAAET) : Application à la détermination de la pollution et de la bioaccumulation des métaux lourds. Mémoire de Master. USTHB.73p.
34. **Bentz, A.B., (2009).** A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability. *The Journal of Young Investigators: Appalachian State University*, 19 (10).
35. **Bergmeyer, H.U., (1978).** *Clin Chem*, 24, 58-73. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80027.
36. **Boher, V. A., (2002).** Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 804-812.
37. **Bokhari, J., Khan, M.R, Shabbir, M., Rashid, U., Jan S., & Zai, J.A., (2013).** Evaluation of diverse antioxidant activities of Galium aparine. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 24–29.
38. **Bossuyt, X., Boeynaems, J-M. (2001).** *Repères en diagnostic de laboratoire.* Belgique: Garant.

39. **Bottero, J.Y., Rose, J., et Wiesner, M.R., (2006).** Nanotechnologies: tools for sustainability in a new wave of water treatment processes. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2(4): 391-395.
40. **Boyaud, C., (2009).** *Phytothérapie et vigilance : enquête auprès des pharmaciens officinaux de l'Isère*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier, Grenoble.
41. **Bradford, M.M., (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Academic Press.*, 72(57), 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
42. **Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.J., Dong, Z., (2007).** Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Nat Acad Sci USA*.104:11649–11654.
43. **Brown, J.E, Khodr, H., Hider, R.C., & Rice-Evans, C.A., (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J*.330 (Pt 3):1173-1178.
44. **Buettner, G.R., (1993)** .*Arch Biochem Biophys*. 300:535-543.
45. **Bulte, J. W., Hoekstra, Y., Kamman, R. L., Magin, R. L., Webb, A. G., Briggs, R. W., Go, K. G., Hulstaert, C. E., & Miltenyi, S. T. H., (1992).** The, Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles, *Magn. Reson. Med*, 25 (1), 148–157.
46. **Buyukhatipoglu, K., Clyne, A.M., (2011).** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation.j. *Biomed. Master. Res. Part A* 96. 186-195.
47. **Cao, G. Z., Wang, Y., (2011)** .*Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties, and applications*, Second Edition, World Scientific Publishing, Singapore.
48. **Chattopadhyay, P., Besra, S.E., Gomes, A., Das, M., Sur, P., Mitra, S., Vedasiromoni, J.R., (2004).** Anti- inflammatory activity of tea (*Camellia sinensis*) , *Life sci*, 74(15), 1839-1849.
49. **Christelle, N. (2006).**caractérisation de l'oxydation du fer ferreux en présence de deux bactéries ferro-oxydantes neutrophiles, du champ hydrothermal de loihi, hawaï. Thèse de mémoire. UDQM. 151p.
50. **Closa, D., & Folch-Puy, E., (2004).** Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life*, 56(4), 185–191. doi: 10.1080/15216540410001701642.

51. **Collard, S.C., (2010).** Les systèmes de défense antioxydants. REVUE MEDICALE Synlab Belgique.PP1-2.
52. **Cornell, R.M., & Schwertmann, U., (2003).** The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses (2è éd.). Germany: Wiley-VCH.
53. **Coskun, O.,Kanter, M., Armutcu, F., Cetin, K., Kaybolma, B., Yazgan, O., (2004).** protective effects of quercetin, a flavonoid antioxidant, i n absolute ethanol-induced acut gastric ulcer. MH-EB.PP 5-6.
54. **Croal, L.R., Johnson, C.M., Beard, B.L., and Newman, D.K., (2004).** Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica ET Cosmochimica Acta*, 68(6): 1227-1242.
55. **Cudennec, Y., & Lecerf, A., (2005).** Topotactic transformations of goethite and lepidocrocite into hematite and maghemite, *Solid State Sciences*, 7(5): 520-529.
56. **Da Silva, E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J., (1994).** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2): 118-22.
57. **Dehpour, A. A., Ibrahimzadeh ,M. A., Seyed, F. N., Seyed M N.(2009).**Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*,60: 405-412.
58. **Dajas, F., (2012).**Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal Ethno pharmacol*, 143, 383-396. doi:10.1016/j.jep.2012.07.005
59. **Delacourte, A., (2006).** De la physiopathologie au traitement de la maladie d'Alzheimer. *Revue Neurol*, 162 (10):909-912.
60. **DeLeve, L., Kaplowitz, N., (1990).** Importance and regulation of hepatic GSH. *Sem Liver Dis*, 10, 251-266.
61. **Desport, J., Couratier, P., (2002).** Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutr Clin Metab.* 16:253-259.
62. **Di Santo, A., Mezzetti, A., & Napoleone. E., (2003).** Resveratrol and quercetin downregulate Tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost*, 1,1089–1095.
63. **Droge, W., (2002)** .Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
64. **Dufresne, C. J., & Farnworth, E.R., (2001).** *J.Nutr. Biochem.*, 12, 404-421.
65. **Duvallet, A. (2008).** Physiologie et régulation du FER. UFR SMBH.62p.
66. **Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B., & Hosni, K., (2012).** Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of functional foods*, 4, 423-432.
67. **Eddouks M., Ouahidi ML ., Farid O., Moufid A .,Khalidi A., & Lemhardi A., (2007).**l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des diabètes au maroc.phytotherapie, 5 :264-270.

68. **El Hajji, H., (2006).** Free Radical Res., 40, 303-320.
69. **El-Bahr, S.M., (2007).** The protective effect of turmeric on iron overload in albino rats. *Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2), 94-113. doi: 10.4314/ejbmb.v25i2.35948.
70. **El-Nekeety, A.A., El-Kady, A.A., Soliman, M.S., Hassan, N.S. et Abdel-Wahhab, M.A., (2009).** Protective effect of *Aquilegia vulgaris* (L.) against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9). doi: 10.1016/j.fct.2009.06.019.
71. **Elsaesser, A., & Howard, C.V., (2011).** Toxicology of nanoparticles *Adv Drug Deliv Rev*.
72. **Emerich, D.F., et Thanos, C.G., (2006).** The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomolecular Engineering*, 23(4): 171.
73. **Emerson, D., and Moyer, C.L., (2002).** Neutrophilic Fe-oxidizing bacteria are abundant at the Loihi Seamount hydrothermal vent and play a major role in Fe oxide deposition. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6): 3085-3093.
74. **Emma, C., Stuart, Marissa, J. Scandlyn., Rhonda, J., & Rosengren., (2006).** *Life Sci.*, 79, 2329- 2336. En line. <http://www.jyi.org/research/re.php?id=3416>.
75. **Ercal, N., Treeratphana, P., Lutz, P., Hammond, T.C., Richard, H., et Matthews, C., (1996).** IV-acetylcysteine protects Chinese hamster ovary (CHO) cells from lead-induced oxidative stress. *Toxicology*, 108(162): 57-64. doi:10.1016/S0300-483X(95)03273-1.
76. **Evans, W.C., (2009).** Trease and Evans' Pharmacognosy (16e). Saunders Elsevier (Ed.), London.
77. **Favier, A., (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique-novembre*, pp: 108-115.
78. **Favier, M., Hininger-Favier, I., (2005).** Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 33(4), 253-258. doi: 10.1016/j.gyobfe.2005.03.011.
79. **-Flohe., et Gunzler., (1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, Vol. 105: 114-121.
80. **Formica, J.V, Regelson, W., (1995).** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*;33:1061-1080.
81. **Frei, B., & Higdon, J. V., (2003).** Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*, 133(10), 3275S–3284S.
82. **Gallati, S., (2002).** Régulation des stocks du fer. *Forum Med Suisse* n°41, 966-970.
83. **Galleano, M., Farre, S.M., Turrens, J.F., & Puntarulo, S., (1994).** Resistance of rat kidney mitochondrial membranes to oxidation induced by acute iron overload. *Toxicology*, 88, 141-149. doi:10.1016/0300-483X(94)90116-3.
84. **Ganong, W. F., (2004).** *Physiologie médicale* (M. Jobin, Trad.). Bruxelles: De Boeck. (Œuvre originale publiée en 2003).

85. **Garait, B., (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de doctorat, UJF.198p.
86. **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*, 270, 91-96.
87. **Gaté, L., Paul, J., Ba, G.N., Tew, K.D., and Tapiero, H., (1999).** Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.*; 53(4):169-180.
88. **Gérard, A., (2012).** Histologie en Pratique, Faculté de Médecine .p :14.
89. **Ghosh, D., Benazir, S., Mitra, E., Dey, M. et Bandyopadhyay, D., (2012).** Protective effect of aqueous leaf extract of *Murraya Koenigi* Against lead induced oxidative stress in Rat liver, heart and kidney: a dose response study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(4): 54-58. En ligne: <http://www.ajpcr.com/Vol5Suppl4/1307.pdf>.
90. **Gramza, A., & Korczak, J., (2005).** *Trends Food. Sci.Tech.*,16, 351-358.
91. **Gregory, S., & Kelly, N., (2011).** Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 6(2), 172-194.
92. **Gundabolu, K., Chen, H., Li, H., Shakaladevanapura, L., Bhagat, T.D., Vallumsetla, N., Ginzburg, Y., & Verma, A., (2013).** Inhibition of erythropoiesis by iron overload is mediated through TGF β signaling. *Blood*, 122(21), 2787-2787.
93. **Gunnar, F., Nodberg, T., Bruce, A., Nodberf, F.W., & Friberg L., (2007).** Handbook on the toxicologie of metals. 3^{eme} edition. Academic Press, 1024 p. ISBN: 978-0123694133.
94. **Gupta, A.K., & Gupta, M., (2005).** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18): 3995.
95. **Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B., (1974).** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249(22), 7130-7139.
96. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P., (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62(10), 628-638.
97. **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine. 4 th ed. *Oxford university Press*, pp: 20-31.
98. **Hamer, M., (2007).** *Nutr. Res.*, 27, 373-379. Tankred S., Yvonne S., Helmut S., 2008. *Arch. Biochem. Biophys.*, 476, 102-106.
99. **Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., and Cadenas, E., (2003).** Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557-5563.
100. **Harborne, J.B., (1998).** Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall (Ed.), London.

101. **Haw, C. Y., Mohamed, F., Chia, C. H., Radiman, S., Zakaria, S., Huang, N. M., & Lim, H. N., (2010).** Hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles as MRI contrast agents, *Ceramics International*, 36(4): 1417-1422.
102. **Hemmami, H., et Guezei, N., (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante d'extrait de *Capsicum annuum* L de la région d'el-oued. Mémoire de master académique, Université de Hamma Elkhader, El oued.
103. **Henry, R.J., (1960).** *Am J clin Path.*, 34, 381-398. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80025.
104. **Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B & Kromhout, D., (1993).** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007–1011.
105. **Hirota, F., (2005).** *Chem. Rec.*, 5, 119-132.
106. **Hirota, F., Masami, S., Kazue, I., & Kei, N., (2002).** *Cancer Lett.*, 188, 9- 13.
107. **Hofmanni, A., mtenbrink, M., Hofmann, H., & Montet, X., (2010).** Superparamagnetic Nanoparticles I a tool for early diagnostics. *Swiss Med Wkly.* Sep17;140:w13081.doi: 10.4414/smw. 2010.13081.
108. **Houlot R., (1984).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine. 1921, 225-227.
109. **Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., (2003).** Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.doi:10.1124/jpet.103.049734.
110. **Hua-fu ,W., Xiao-qing, Y., & Zong-mao, C., (2002).** Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press.* 89-130.
111. **Hui, L., Lei, Z., Shaoping, L., (2012).** Evaluation of Antioxidant and Immunity Activities of Quercetin in Isoproterenol-Treated Rats. ISSN. 17, 4281-4291.
112. **Hutchison, T.A., Shahan, DR., Anderson, ML., (2000).** Drugdex System. Englewood, CO; Micromedex Inc. Expires: December.
113. **Ida, N., (2004).** Engineering electromagnetics, Second Edition, Springer-Verlag, New York.J.
114. **Igarashi, K., & Ohmuma, M., (1995).** Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59, 595-601. doi: 10.1271/bbb.59.595.
115. **Jaap, S., (2011).** support de cours sur le fer. UMVF.13p.
116. **Kabouche, S., (2010).** Etude de la relation du thé vert. Maladies cardiovasculaires et Stress oxydant. Mémoire de magister en physiopathologie cellulaire. UMC. 136p.
117. **Kakkar, P., Das, B., Viswanathan, P., (1984).** A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 21, 130.
118. **Kamada, C., Silva, E.L., Ohnishi-Kameyama, M., Moon, J.H., Terao, J., (2005).** Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res*, 39, 185-194. doi:

- 10.1080/10715760400019638106. Kandori, K. (2006). Iron oxide particles (2è ed.). Somasundaran, P. (Ed.) (2008).
119. **Kang, J., Chen, J., Shi, Y., Jia, J., and Zhang, Y., (2005).** Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 69: 1205– 1213.
120. **Kansal, L., Sharma, V., Sharma, A., Lodi, S., et Sharma, S.H., (2011).** Protective role of coriandrum sativum (coriander) extracts against lead nitrate induced oxidative stress and tissue damage in the liver and kidney in male mice. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2: 65-82. En ligne <http://www.ijabpt.org/applied-biology/protective-role-of-coriandrum-sativum-coriander-extractsagainst-lead-nitrate-induced-oxidative-stress-and-tissuedamage-in-the-liver-and-kidney-in-male-mice.pdf>.
121. **Kazuo, M ., (2005).** *Free Radical Bio. Med.*,38, 1243-1256.
122. **Kebieche, M., (2009).** Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat,UMC.143p.
123. **Keerthi, M., Prasanna, J., Aruna, M., Rao, N., (2014).** Review on polyphenols as nature's gift world. *Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 3 (4): 445-455. En ligne: <http://www.wjpps.com/download/article/1397787686.pdf>.
124. **Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A., Chauhan, L.K., Ahmad, I., (2012).** Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelia.
125. **Kirkham, P., and Rahman, I., (2006).** Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 111: 476-494.
126. **Koller, A., (1984).** Total serum protein. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto.* 1316-1324 and 418. Cite par fiche technique SPINREACT. Ref: 1001290, 1001291 et 1001292.
127. **Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., Lee, S.B., (2011).** Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine* 6, 929–941. LeBel, C.P., Bondy, S.C., 1990. Sensitive and rapid quantitation.
128. **Kraemer, S.M., (2004).** Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic sciences*, 66: 3-18.
129. **Kruis, F.E., Fissan, H., et Peled, A., (1998).** Synthesis of nanoparticles in the gas phase for electronic, optical and magnetic applications--a review. *Journal of Aerosol Science*, 29(5-6): 511.
130. **Kubo, I., (1992).** *J. Agric. Food Chem.*,40,245-248.
131. **Kumar, P., Sharma, S., Khanna, M., and Raj, H.G., (2003).** Effect of Quercetin on lipid peroxidation and changes in lung morphology in experimental influenza virus infection. *Int J Exp Pathol.* 84:127-133.
132. **Kwok, K.S. and Ellenbogen, J.C., (2002).** Moletronics: future electronics. *Materials Today*, 5(2): 28.
133. **Lacoue-Labarthe., Thomas., (2007).** Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et

- immunitaires. Thèse de doctorat : Océanologie Biologique & Environnement Marin., 200 p.
134. **Lakhal, R., (2016).** Nouveau procédé d'élaboration de micro et nanoparticules d'oxyde de fer en voie sèche: caractérisation, étude du procédé et proposition d'un mécanisme réactionnel. Thèse doctorat, INP. Toulouse, 384p.
135. **Landau, J. M., (2006).** *Nutritional Oncology (Second Edition)*, 597-606.
136. **Landrigan, P.J., Br Ind, J.M., (1989).** Editorial toxicity of lead at low dose. *British journal of industrial medicine*, 46(9): 593-596. En ligne: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1009833/pdf/brjindmed001370001.pdf>.
137. **Larsen, K., (1972).** *Clin. Chim. Acta*, 66, 209. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20151.
138. **Lavrovsky, Y., (2000).** Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol*, 35(5): p. 521-32.
139. **Lee, J., Isobe, T., & Senna, M., (1996).** Preparation of ultrafine Fe₃O₄ particles by precipitation in the presence of PVA at high pH, *J. Colloid Interface Sci*, 177 (2), 490–494.
140. **Lei, L., Ling-Ling, J., Yun, Z., & Gang, L., (2013).** Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Research strategies and implications for nanomedicine. *Chin. Phys. B*, 22(12), 1-10. doi: 10.1088/1674-1056/22/12/127503.
141. **Lekic, N., Canova, N., Horinek. A., & Farghali, H., (2013).** The involvement of heme oxygenase 1 but not nitric oxide synthase 2 in a hepatoprotective action of quercetin in lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity of D-galactosamine sensitized rats. *Fitoterapia*, 87: 20-26. doi:10.1016/j.fitote.2013.03.016.
142. **Leverve, X., Cosnes, J., Erny, P., & Hasselmann, M., (2001).** *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer, France. 957p.
143. **Levin, G., Cogan, U., Mokady, S., (1990).** Riboflavin deficiency and the function and fluidity of rat erythrocyte membranes. *J Nutr*, 120 (8) : 857–861.
144. **Lévy, L.P., (1997).** *Magnétisme et supraconductivité*, EDP Sciences, Les Ulis.
145. **Li, T., Zhao, X-P., Wang, L-Y., Gao, S., Zhao, J., Fan, Y-C., & Wang, K. (2013).** Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int Med Sci*, 10(6), 683-690. doi:10.7150/ijms.5947.
146. **Li, Y.F & Chen, C., (2011).** Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications. *Small* 7:2965–2980
147. **Lin, E., & Adams, P.C., (1991).** Biochemical liver profile in hemochromatosis. A survey of 100 patients. *J Clin Gastroenterol*. 13(3), 316-320.
148. **Liu, J., Li, X., Yue, Y., Li, J., and He, Y., (2005).** The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS-stimulated neutrophils. *Cell Mol Immunol*. 2: 455-460.
149. **Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D., (2002).** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-787.
150. **Lopez, G.V., Batthyany, C., Blanco, F., Botti, H., Trostchansky, A., Migliaro, E., Radi, R., Gonzalez, M., Cerecetto, H., and Rubbo, H., (2005).** Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide-releasing tocopherol analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13:5787–5796.

151. **Loréal, O., Brissot, P. (2003).** L'hepcidine : petite molécules, grands desseins. *La revue de Médecine Interne* 24, 213-215.
152. **Lozoya, X., Meckes, M., Abou-Zaid, M., Tortoriello, J., Nozzolillo, C & Arnason, J.T., (1994).** Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch Med Res Spring*; 25(1):11-15.
153. **Lutzler, P., Khoulalene, M., Bekov, K., Lapalus, N., Carlier, V., Hutzler, P., (2005).** Les mécanismes du vieillissement. *Phytothérapie*; 2(53-56).
154. **Mac Key, E.M., Rackeyll, J., (1927).** *Clin. Invest, J. Clin. Invest.*, 4, 295. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20141.
155. **Maiese, K., Li, F., & Chong, Z.Z., (2005).** New Avenues of Exploration for Erythropoietin. *JAMA*, 293(1), 90-95. doi:10.1001/jama.293.1.90.
156. **Mainous, A.G., Knoll, M.E., Everett, C.J., Matheson, E.M., Hulihan, M.M., & Grant, A.M., (2011).** Uric acid as a potential cue to screen for iron overload. *J Am Board Fam Med*, 24, 415-421. doi: 10.3122/jabfm.2011.04.110015.
157. **Malekigorji, M., Curtis, A. D. M., & Hoskins, C., (2014).** The use of iron oxide nanoparticles for pancreatic cancer therapy, *Journal of Nanomedicine Research*, 1(1): 00004-00015.
158. **Manasa, K., & Vani. R., (2016).** Influence of oxidative stress on stored platelets. *Advances in Hematology*, 1-6. doi. 10.1155/2016/4091461.
159. **Matsuura, H., Hokura, A., Katsuki, F., Itoh, A., & Haraguchi, H., (2001).** Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 17(3): 391-8.
160. **Mete Tanir, H., Turgay, S., Mine, I., Fahrettin, A., Kubilay, U., Ergul, S., (2005).** Effect of quercetine and glutathione on the level of superoxide dismutase, catalase, malonyldialdehyde, blood pressure and neonatal outcome in a rat model of pre-eclampsia induced by NG-nitroL-arginine-methyl ester. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 118, 190–195.
161. **Middleton, E. J., & Drzewiecki, G., (1984).** Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33(21): 3333-8.
162. **Milane, H., (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur* ; pp. 13-36.
163. **Mira, L., (2002).** *Free Radical. Res.*, 36, 1199–1208.
164. **Miura, Y., Chiba, T., & Tomita, I., (2001).** Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *Journal of Nutrition*, 131, 27–32.
165. **Montel-Hagen, A., Sitbon, M., & Taylor, N., (2009).** Erythroid glucose transporters. *Curr Opin Hematol*, 16(3), 165-172. doi: 10.1097/MOH.0b013e328329905c.
166. **Mookerjee, B .K., Lee, T.P., Logue, G. P., Lippes, H. A., Middleton, E., (1986).** The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* 213 : 511-20.
167. **Mukhtar, H., & Nihal, A., (2000).** *Am. Clin. Nutr.*, 71,1698S-1702S.

168. **Nadour, E.H., (2012).** Synthèse par Co- précipitations d'un oxyde mixte de fer et de chrome et caractérisation physico-chimique. Thèse magister, UMM. Tizi-Ouzou, 65p.
169. **Nagao, T., Hase, T., & Tokimitsu, I., (2007).** A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)*,15(6), 1473–1483.
170. **Najafi , L., Babadi,VY., Najafi, A., Gholami, H., Beigi Zarji,ME., Golzadeh, J., Amraie, E., et Shirband, A., (2012).** Evaluation of iron oxide nanoparticles effects on tissue and enzymes of liver in rats. *JPBMS*, 23 (04).
171. **Naqvi, S., Samim, M., Abdin, M., Ahmed, F.J., Maitra, A., Prashant, C., & Dinda, A.K., (2010).** Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by Increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*.16;5:983i9.
172. **Naziroglu, M., Uguz, A.C., Kocak, A., Bal, R., (2009).** Acetaminophen at different doses protects brain microsomal Ca²⁺ -ATPase and the antioxidant redox system in rats. *J. Membr Biol* 231:57–64.
173. **Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., (2006).** Toxic potential of materials at the nanolevel, *Science*, 311(5761): 622-627.
174. **Nestel, P., & Davidsson, L., (2003).** Anémie carence en fer et anémie ferriprive. Etat Unis d'Amérique.
175. **Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & von Rechenberg, B., (2005).** Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1): 483-496.
176. **Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., & Vaulont, S., (2002).** Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4596-4601. doi: 10.1073/pnas.072632499.
177. **Nkhili, E., (2009).** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat. PSA.378p.
178. **Nurulain, T., & Zaveri., (2006).** *Life Sci.*,78,2073-2080.
179. **Olivier, W., (2011).** Risques liés aux nanoparticules et aux nanomatériaux. *Annale de l'INRS*. vol. 19(1-4) : 1-90.
180. **Osseni, A., (2012).** Nanoplateformes hybrides multimodales pour l'imagerie médicale. Thèse doctorat l'UDT. III-Paul Sabatier166p
181. **Ostiguy, C., Soucy, B., Lapointe, G., Woods, C., & Ménard, L., (2008).** Les effets sur la santé reliés aux nanoparticules. Technical report, IRSST – Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail.
182. **Ozercan, I. H., (2008).** *Nutr. Res.*, 28, 92-97.
183. **177-Packer, L., Tritschler, H.J., and Wessel, K., (1997).** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.

184. **Pankhurst, Q., Connolly, A.J., Jones, S. K., & Dobson, J., (2003).** Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys*, 36, 167–181.
185. **Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C., (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*, 50, 6882-90. Cité par kanoun, N. (2011).
186. **Parkkila, S., Niemela, O., Britton, R.S., Fleming, R.E., Waheed, A., Baçon, B.R., Sly, W.S., (2001).** Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. *Gastroenterology* 121, 1489-1496.

187. **Pastore, R. L., & Fratellone, P., (2006).** *EXPLORE: J. Science and Healing*, 2,531-539.
188. **Pei-Gen, X., & Zhen-Yu, L., (2002).** Tea Bioactivity and Therapeutic Potentiel. CRC Press. 17-34.
189. **Pereira d'Abreu, D.A., Paseiro Losada, P., Angulo, I., et Cruz, J.M., (2007).** Development of new polyolefin films with nanoclays for application in food packaging. *European Polymer Journal*, 43(6): 2229.
190. **Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Rankin, E., Vulont, S., Haase, V.H., Nizet, V., & Johnson, R.S., (2007).** Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest*, 117(7), 1926-1932.

191. **Picon, L., (1992).** Alimentation et santé. Alimentation et pathologie. Dupin, H., Cuq, J-L., Malewiak, M-I., Leynaud-Rouaud, C., Berthier, A-M. (Eds.) (1992). Alimentation et santé. Paris: ESF éditeur.
192. **Pietrangelo, A., Engl, N., Med, J. (2004).** HFE related hemochromatosis. 766-790.
193. **Pincemail, J., (1998).** Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*; 3: 133–8.
194. **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr Clin Metbo*;16: 233–239.
195. **Powers, K.M., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Longstreth, W.T., Swanson, P.D., Checkoway, H., (2003).** Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. *Neurology*.; 60(11):1761-1766.

196. **Powers, S.K., and Lennon, S.L., (1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

197. **Pratt, D.S., & Kaplan, M.M., (2000).** Evaluation of abnormal liver-enzyme results in a symptomatic patients. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1266-1271. doi: 10.1136/pmj.79.932.307.Publisher. 29- 48.

198. **Rabovsky, A., Cuomo, J., Eich, N., (2006).** Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clin Chim Acta*, 371, 55-60. doi:10.1016/j.cca.2006.02.020.

199. **Raghupathy, R., Manwani, D., & Little, J.A., (2010).** Iron Overload in Sickle Cell Disease. *Advances in Hematology*, 2010, 1-9. doi:10.1155/2010/272940.
200. **Rahman, I., and MacNee, W., (1998).** Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*. 53: 601-612.

201. **Rahman, K., (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*., 2(2):219-236.

202. Rao, Y.K., Fang, S.H., and Tzeng, Y.M., (2005). Inhibitory Effects of the Flavonoids Isolated from *Waltheria indica* on the Production of NO, TNF-a and IL-12 in Activated Macrophages. *Biol Pharm Bull.* 28: 912-915.
203. Reckziegel, P., Dias, V.T., Benvegnú, D.M., Boufleur, N., Barcelos, R.C., Segat, H.J., Pase C.S., Santos, C.M., et Bürger, M.E., (2016). Antioxidant protection of gallic acid against toxicity induced by Pb in blood, liver and kidney of rats, *Toxicology reports.*
204. Rennke, H.G., & Denker, B.M., (2007). *Renal pathophysiology: The essentials* (2è éd.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
205. Renuka, B., Rajurkar, Z., Govind, T., (2003). Studies on levels of glutathione S transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science*, 85 (9), 1355-1360.
206. Riemersma, R. A., Carruthers, K. F., Elton, R. A., & Fox K. A. A., (2001). *The Lancet*, 357 ,2136-2137.
207. Roengsumran, S., Petsom, A., Ngamrojanavanich, N., Rugsilp, T., Sittiwicheanwong, P., Khorphueng, P., Cherdshewasart, W., Chaichantipyuth, C., (2000). Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J.Scient.c Research of Chulalongkorn University* 25(1): 169-176.
208. Rosalki, S., (1993). *Clin Chem*, 39(4), 648-652. Cité par fiche technique SPINREACT. Réf. 1001130.
209. Ross, J.A., & Kasum, C.M., (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 22:19-34.
210. Roy D.K, Nag Chandhuri, A.K., & Sen, T., (2005). Therapeutic effects of tea. *Science.*
211. Sagesak, Y.M., Uemura, T., Watanabe, N., Sakata, K., Uzawa, J., (1994). A new glucuronide saponin from tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). *Biosci Biotech Biochem*, 58(11), 2036–2040.
212. Salazar-Alvarez, G., (2004). Synthesis, characterisation and applications of iron oxyde nanoparticles. Thèse de doctorat en science des matériaux et de l'ingénierie, Université de Stockholm, Suède.
213. Sally, A., Tice, R. P. H., Dean Parry, R. P., (2001). Medications that need hepatic Monitoring. *Hospital Pharmacy*; 36 (4): 456-64.
214. Salvayre, R., Auge, N., and Nègre-Salvayre, A., (2003). Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques*, Eds. Masson: Paris, Vol. 14, pp 269-290.
215. Santosh, K. K., Nihal, A., & Hassan, M., (2000). *Arch. Dermatol.*, 136, 989-994.
216. Scalbert, A., (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 276-282. doi:10.1016/S07533322(02)00205-6.
217. Scalbert, A., & Williamson, G., (2000). dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085.

218. **Schetz, M., Vanhorebeek, I., Gunst, J., & Berghe, G.V., (2010).** Glucose, insulin, and the kidney. Jorres, A., Ronco, C., & Kellum, J.A. (Eds.). Management of acute kidney problems. Berlin: Spring.
219. **Scholz, H., Schurek, H.J., Eckardt, K.U., & Bauer, C., (1990).** Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia. *Experientia*, 46(11-12), 1197-1201. doi: 10.1007/BF01936936.
220. **Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I., Milner, J.A., (2007).** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.*; 18(9):567579.
221. **Sekli-belaidi, F., (2011).** Fonctionnalisation de surfaces d'électrodes par un film de poly(3,4-éthylène dioxythiophène) PEDOT pour l'élaboration de microcapteur spécifique des acides ascorbique et urique : application à l'étude des propriétés antioxydantes du sérum Sanguin. Thèse de doctorat ,UPST, p212.
222. **Servais, S., (2004).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat, p163.
223. **Shahrokhian, S., Ghalkhani, M., (2006).** Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid and uric acid at a carbon-paste modified electrode incorporating thionine–nafion ion-pair as an electron mediator. *Electrochim. Acta*, 51 2599-2606.
224. **Shengmin, S., Zhe, H., Joshua, D., Lambert., Chung, S., &Yang., (2005).** *Antioxid. Redox Sign*, 7,1704-1714.
225. **Shiva, S., Crawford, J.H., Ramachandran, A., Ceaser, E.K., Hillson, T., Brookes, P.S., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., (2004).** Mechanismes of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J*.
226. **Shu-jun, C., (2002).** Tea Bioactivity and Therapeutic Potential. CRC Press. 192-210.
227. **Singh, N., Jenkinsa, G.J.S., Asadib, R., & Doaka, S.H., (2010).** Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1, 1-15. doi: 10.3402/nano.v1i0.5358.
228. **Skaper S.D., Fabris M., Ferrari V., Carbonare M.D., and Leon A., (1997).** Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Fr Rad Biol Med*; 22(4):669-678.
229. **Skulachev, V.P., (1998).** Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280.
230. **Sodergren, E., Nourooz-Zadeh, J., Berglund, L., Vessby, B., (1998).** Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods*; 37:137–146.
231. **Sophie, L., Delphine, F., Marc, P., Alain, R., Caroline, R., Luce, V.E., & Robert, N., (2008).** Muller, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev* ; 108; 2064–2110.
232. **Sorg, O., (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-662. doi:10.1016/j.crv.2004.05.007.
233. **Soulère, L., Viodé, C., Périé, J., and Hoffmann, P., (2002).** Selective Inhibition of Fe-versus Cu/Zn- Superoxide Dismutases by 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 50:578-582.

234. Southon, S., Gee, J., et Johnson, I.T., (1984). Hexose transport and mucosal morphology in the small intestine of the zinc-deficient rat. *Brit J Nutr.* Vol. 52(5): 371.
235. Stevnsner, T., Thorslund, T., Souza-Pinto, N.C., Boher, V. A., (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.* 37: 1189-1196.
236. Sungur, S.A., Uzar, A., (2008). *Spectrochimica Acta Part A*, 69, 225–229.
237. Szalay, B., Tátrai, E., Nyíró, G., Vezérb, T., & Duraa, G., (2012). Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in vivo and in vitro experiments. *J. Appl. Toxicol.* 32(6), 446-453. doi: 10.1002/jat.1779
238. Takashi, K., Masami, S., & Hirota, F., (2008). *Cancer Letters*, 261, 12-20.
239. Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., et Hilali A., (2015). Evaluation de l'activité antioxydant et la composition physico chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4), 1111-1117.
240. Terao, J., & Piskula, M.K., (1999). Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. *Nutrition.* 15:790-791.
241. Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* 279: L1005-L1028.
242. Tsuneki, H., (2004). Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic mice and on glucose metabolism in healthy human, *BMC Pharmacol.* Aug 26, 4(1):18.
243. Ulrike, P., Charles, P., & Lenore, A., (2001). *Am. J. Epidemiol.*, 142, 495-503.
244. Vaishnav, D., Holkar, S., & Hivre, M., (2015). Serum bilirubin as a marker of oxidative stress in patients with hypertension. *Int J Health Sci Res.*, 5(5), 190-194.
245. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*;39:44-84.
246. Vaqar, M. A., & Mukhtar, H., (2006). *Free Radical Res.*, 40, 1095-1104.
247. Vertuani, S., Angusti, A., and Manfredini, S., (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* 10:1677-1694.
248. Wachira, F.N., Tanaka, J., & Takeda Y., (2001) Genetic variation and differentiation in tea germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. *J Hort Sci Biotechnol* 76.
249. Wadood, A., Ghufuran, M., Babar Jamal, S., Naeem M., Khan A., Ghaffar R. et Asnad., (2013). Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. *Biochem Anal Biochem.* Vol. 2, 1-4. doi.org/10.4172/2161-1009.1000144.
250. Walters, M., & Gerarde, H., (1970). *Microchem J*, 15, 231-243. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80403.
251. Wang, J., Zhang, B., Wang, L., Wang, M., & Gao, F., (2015). One-pot synthesis of water-soluble superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their MRI contrast effects in the mouse brains, *Materials Science and Engineering: C*, 48: 416-423.
252. Weckbercker, G., & Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters.*, 40(3), 257-264.

253. **Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., & Youdim, M. B. H., (2004).** *J. Nutr. Biochem.*,15, 5065-16.
254. **Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P., & Lewis, J., (1989).** Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *AJR*, 1989, 152 (1), 167–173.
255. **Wei-xian, Z., (2003).** Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nanoparticle Research*, V5(3): 323.
256. **Welch, K.D., Davis, T.Z., Aust, S.D. (2002).** Iron autoxidation and free radical generation: Effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch Biochem Biophys*;397:360–369
257. **Welton, A.F., Tobias, L.D., Fiedler-Nagy, C., (1986).** Effects of flavonoids on arachidonic acid metabolism *Prog Clin Biol Res*; 213:231-242.
258. **Wiert, C., (2006).** Anti-inflammatory plants ethnopharmacology of medicinal plants: asia and the pacific. USA: Totowa.
259. **Williams., (1977).** *Clin. Chem.*, 23, 237. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20061.
260. **Williams, R.J., Spencer, P.E & Rice-Evans, C., (2004).** Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Rad Biol Med*, 36, 838-849.
261. **Williamson G, Plumb G.W., Uda Y., Price K.R., and Rhodes M.J. Dietary., (1996)** quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in HepaIc7 cells. *Carcinogenesis*; 17(11):2385-2387.
262. **Wina, K.Y., & Feng, S.S., (2006).** In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials*.27,2285-91.
263. **Yagi, K., (1976).** Simple fluorometric assay for lipo-peroxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15, 212-216. doi:10.1016/0006-2944(76)90049-1.
264. **Young, J., Nielsen, S., & Haraldsdottir, J., (1999).** Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr*, 6, 87-94.
265. **Yukiaki, K., & Yukihiko, H., (2004).** Health Effects of tea and its catechins. *Springer*.55- 57.
266. **Zhang, R., & Olin, H., (2012).** Magnetic nanoparticles in biomedical applications. Barh, D., Blum, K., & Madigan, M.A. (Eds). *OMICS: Biomedical perspectives and applications*. USA: Taylor & Francis.
267. **Zhendre, M., (2010).** Les nanotechnologies : impacts sur l'environnement et la santé publique. benquet marion ; coneggio estelle.pp.1-2
268. **Zhihua, J., Elias, S., Ying, M., Linda, J., Jinming, S., Siqu, Z., Shujun, L., Ruiying, W., Tianzhu, Z., Ganglin, Y., Junqiu, L., Jiacong, S., & Guimin, L., (2004).** Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia*. *Biochem Biophys Res Commun*, 321(1), 94-101.
269. **Zong-mao, C., Hua-fu, W., Xiao-qing, Y., & Ning, X., (2002).** Tea Bioactivity and therapeutic potential. *CRC Press*. 57- 88.

Annexes

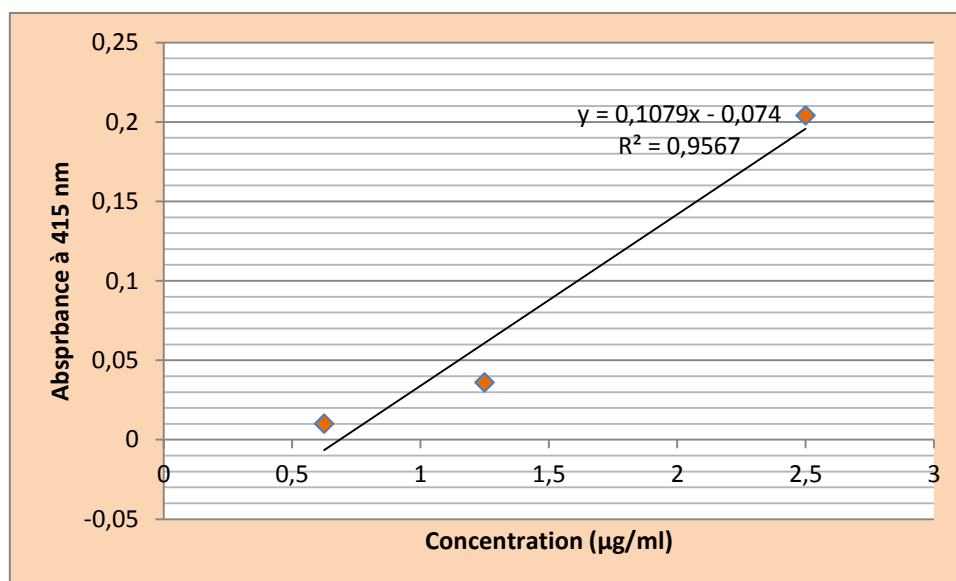


Figure 01 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

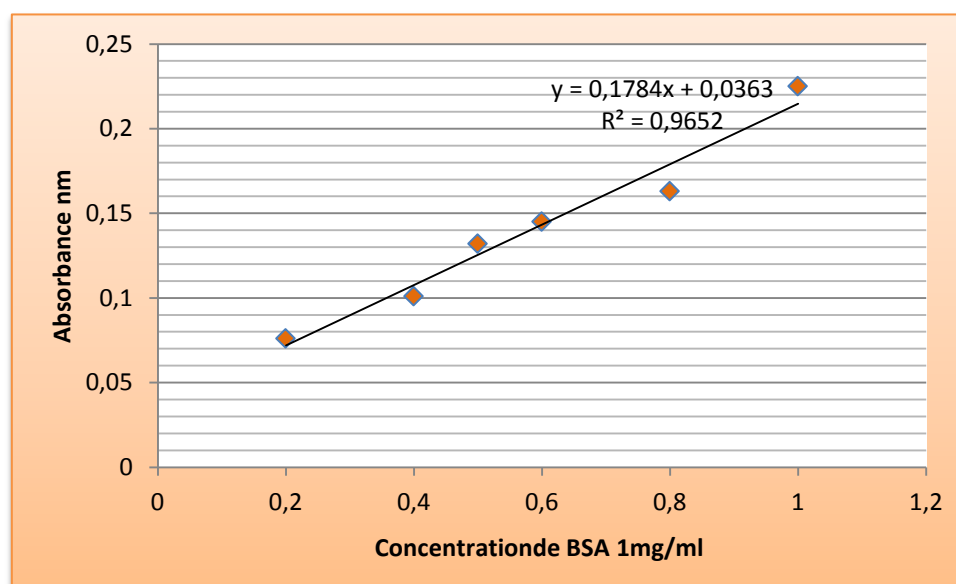


Figure 02: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire.



Figure 03: Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (photo originale).



Figure 04: Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240 (photo originale).



Figure 05: Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800

(Photo originale).



Figure 06: Analyseur clinique automatisé de type BIOLIS 24I (photo originale).



Figure 07: Bain-marie de type MEMMERT (photo originale).

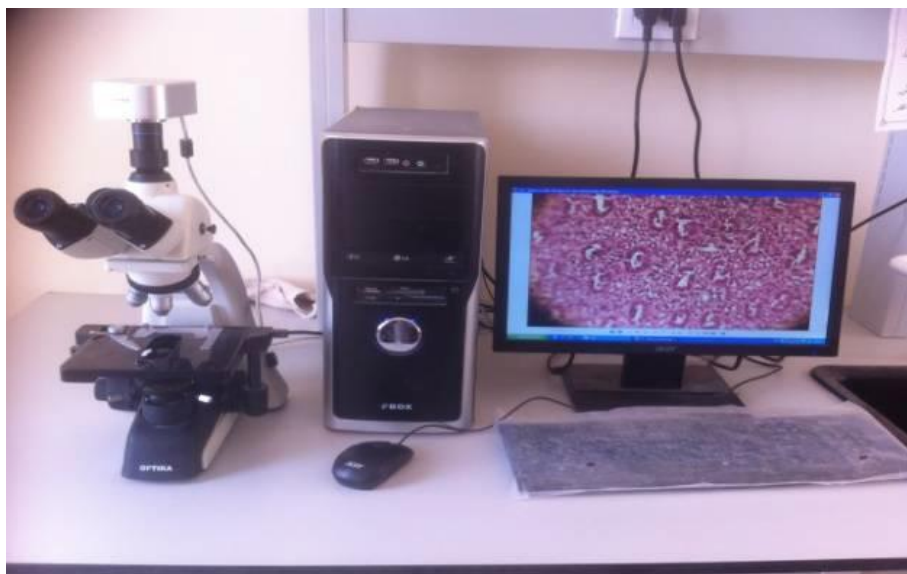


Figure 08: Microscope optique avec appareil photo (camera) (photo originale).

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'extrait flavonoïdique de la plante *Camillia sinensis* et de la quercétine sur certains paramètres biochimiques, hématologiques d'une part, et d'autre part sur le stress oxydant et structure tissulaire du foie et des reins, chez des rattes Wistar contaminées par les nanoparticules d'oxyde de fer (150µg/Kg), pendant 21 jours. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur 20 rattes femelles de la souche Wistar répartissent en quatre lots de cinq rattes chacun dont le 1^{ère} lot sert de témoin, le 2^{ème} est un lot contaminé par le SPION, le 3^{ème} est un lot contaminé par le SPION et traité par la quercétine (10mg/Kg), et le 4^{ème} est un lot contaminé par le SPION et traité par l'extrait flavonoïdiques de thé vert (400mg/Kg).

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que le traitement par les SPION induit une surcharge en fer, hypoglycémie, augmentation d'urée, créatinine, et d'acide urique, aussi une augmentation de l'activité des transaminases (TGO, TGP), de phosphatase alcaline qui montre que le SPION induit une perturbation de fonction hépatique et rénale. Nos résultats révèlent également une toxicité hématologique et stress oxydatif chez les lots contaminés par le NPsFe₂O₃, une augmentation du taux des globules rouges, des Lymphocyte, des Monocytes, et une diminution du taux d'hémoglobine, aussi une diminution de GSH, l'activité des CAT, GST, GPx avec une augmentation du taux de MDA dans les tissus étudiés (foie, reins). En outre, les résultats obtenus d'après l'étude histologique, montre la présence d'une inflammation dans les tissus étudiés, et la présence d'un nécrose hépatique et rénal induit par le stress oxydatif. Cependant, l'administration orale de la quercétine et l'extrait flavonoïdique de thé vert a provoqué une diminution de l'effet toxique de NPsFe₂O₃ en maintenant l'homéostasie de fer dans l'organisme donc en inhibant les effets néfastes de la surcharge en fer.

Mots clés: NPsFe₂O₃, toxicité, stress oxydant, quercétine, flavonoïdes de thé vert, rattes Wistar.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير مستخلص الفلافونويدات لنبته الشاي الأخضر *Camillia sinensis* و الكرسيتين على بعض المعايير البيوكيميائية، والدموية من جهة، وعلى الاجهاد التأكسدي والبنية النسيجية للكبد والكلية من جهة اخرى عند بعض الفئران المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية (150 ميكرو غرام/ الكيلو غرام) لمدة 21 يوما. الدراسة التجريبية أجريت في المختبر على 20 فأرة من سلالة ويستار مقسمة إلى أربع مجموعات، خمس فئران في كل منها، حيث المجموعة الأولى شاهدة، الثانية معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية (SPION)، الثالثة معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية بالإضافة الى 10 ملغ/كغ من كرسيتين، و الرابعة معالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية بالإضافة الى 400 ملغ/كغ من المستخلص الفلافونويدي للشاي الأخضر.

النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تبين أن المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية تسبب تراكم جزيئات الحديد في الجسم، نقص السكر في الدم، زيادة اليوريا و الكرياتينين وحمض اليوريك، ايضا زيادة النشاطية لنواقل الأمين (TGO، TGP)، وزيادة في نشاط الفوسفاز القلوي، و هذا يدل على اضطراب وظيفة الكبد و الكلى. تكشف النتائج التي توصلنا إليها أيضا سمية دموية و اجهاد تأكسدي عند المعالجة بجزيئات اكسيد الحديد النانوية، مع زيادة في معدل خلايا الدم الحمراء و اللمفاويات، ووحيدات الفص وانخفاض في نسبة الهيموغلوبين، ايضا نقص في GSH، ونشاطية CAT، GST و GPx مع زيادة معدل MDA في الأنسجة المدروسة (الكبد و الكلى).بالإضافة الى ذلك، فان النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة التشريحية تبين وجود التهاب مع وجود نخر كبدي و كلوي سببه الاجهاد التأكسدي.

كما اثبتت النتائج ان تناول الكرسيتين والمستخلص الفلافونويدي لنبته الشاي الأخضر عن طريق الفم يؤدي الى تخفيض التأثير السمي لجزيئات اكسيد الحديد النانوية وذلك بالحفاظ على توازن تركيز جزيئات الحديد في الجسم وبالتالي يحول دون الاثار السلبية لتراكم الحديد الزائد.

الكلمات المفتاحية: جزيئات اكسيد الحديد النانوية، تسمم، اجهاد تأكسدي، كرسيتين، فلافونويد الشاي الأخضر، فئران وستار.