



N série:.....

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه 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

**Etude de l'effet toxique des nanoparticules de
l'oxyde de fer et l'effet antidote du quercétine
chez les lapins**

Présenté par :
BEGGAT Khaoula
KORTI Naima

Soutenue le : 29 Mai 2016 devant le jury composé de :

Président:	Mr. KHELEF Yahia	M.A.B, Université d'El Oued.
Examineur:	Mr. DEROUICHE Samir	M.A.A, Université d'El Oued.
Promotrice:	M ^{elle} . AOUIMEUR Meriem	M.A.A, Université d'El Oued

Remerciements

Nos sincères remerciements vont d'abord à Dieu tout puissant qui nous entoure avec ses soins et qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promoteur M^{lle} AOUIMEUR Meriem, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son assistance et ses conseils pour assurer le succès de ce travail, pour ses efforts, son disponibilité, son soutien et son confiance.

Nous exprimons aussi nos remerciements à Mr. KHELEF Yahia, qui nous avons fait l'honneur de présider ce Jury et à Mr. DEROUCHE Samir. d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous tenons à exprimer notre grand respect à eux, 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 d'EL-OUED, et à M^{me} ADAIKA Aicha pour leur disponibilité et leur aide.

Nos vifs remerciements à toute l'équipe de laboratoire d'établissement public de santé de proximité d'EL-OUED le 19 mars, tout les travailleurs du laboratoire d'établissement hospitalier public DJILANI BEN OMAR d'EL-OUED, le responsable de pharmacie LAMAA et à tous les collaborateurs dans la pharmacie pour leur aide. Nous remercions aussi au directeur du laboratoire de CPB BEN BORDI Yakoub pour son aide concernant la réalisation des coupes histologiques.

Naima

Khaoula

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer et de valider l'effet antidote de quercétine chez les lapins. 20 lapins mâles Albinos pesant $910,4 \pm 357,54$ g ont été divisés en cinq groupes: le 1^{er} groupe considéré comme témoin, le 2^{ème}, le 3^{ème} et le 4^{ème} groupe (D1, D2 et D3) recevant chaque jour respectivement 50 µg/kg, 100 µg/kg et 150 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION) pendant 21 jours, le 5^{ème} groupe (Q) recevant chaque jour 100 µg/kg de SPION dissous dans l'eau distillé et 10 mg/kg de quercétine pendant 21 jours.

Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que le traitement par les SPION induit une surcharge en fer augmentation d'urée, créatinine et d'acide urique et une diminution de l'activité des transaminases et l'augmentation de l'activité de phosphatase alcaline donc les SPION induit une perturbation de fonction hépatique et rénale. Les résultats indiquent aussi la présence d'une anémie microcytaire, coagulopathie, inflammation et le plus grave la présence d'un stress oxydative au niveau de foie, des reins, de cœur et de la rate avec une diminution de poids relatif de cœur. En outre, les résultats obtenus d'après l'étude histologique, montre la présence d'une inflammation tissulaire dans le foie, la présence d'un nécrose hépatique et une fibrose pour la 3^{ème} dose. Cependant, l'administration orale de la quercétine a provoqué une diminution de l'effet toxique de SPION en maintenant l'homéostasie de fer dans l'organisme donc en inhibant les effets néfastes de la surcharge en fer.

Mots clés: SPION, toxicité, stress oxydative, quercétine, lapins Albinos.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير السمي للجزيئات النانوية لأكسيد الحديد والتحقق من التأثير المضاد للأكسدة للكيرسيتين عند الأرانب، أجريت هذه الدراسة على 20 ذكر من أرانب Albinos البيضاء تزن $357,54 \pm 910,4$ غ، قسمت الأرانب إلى خمس مجموعات: المجموعة الأولى غير معالجة، إذ تعتبر كشاهد، عولجت المجموعة الثانية، الثالثة والرابعة على الترتيب بـ 50، 100، 150 ميكروغرام/كيلوغرام (من الوزن الكلي) من جزيئات أكسيد الحديد النانوية، أما المجموعة الخامسة فقد عولجت بـ 100 ميكروغرام/كيلوغرام من جزيئات أكسيد الحديد النانوية بالإضافة إلى 10 ميكروغرام/كيلوغرام من الكيرسيتين مدة واحد وعشرون يوما و بشكل يومي.

النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تبين أن المعالجة بجزيئات أكسيد الحديد النانوية تسبب تراكم جزيئات الحديد في الجسم، زيادة الكرياتينين واليوريا وحمض اليوريك في الدم و انخفاض في نشاط نواقل الأمين، وزيادة في نشاط الفوسفاتاز القلوي ، إذا جزيئات أكسيد الحديد النانوية تسبب اضطراب وظيفة الكبد والكلى . تبين أيضا نتائج هذه الدراسة وجود فقر الدم صغير الكريات، أمراض تخثر الدم، التهاب والأكثر خطورة وجود الإجهاد التأكسدي في نسيج الكبد، الكلى، القلب والطحال مع انخفاض الوزن النسبي للقلب. بالإضافة إلى ذلك، فإن النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة التشريحية تبين وجود التهاب في النسيج الكبدي، كما تبين وجود نخر كبدي، وتليف كبدي بالنسبة للجرعة العالية. مع ذلك، تناول كيرسيتين عن طريق الفم تؤدي إلى انخفاض التأثير السمي لجزيئات أكسيد الحديد النانوية وذلك بالحفاظ على توازن تركيز جزيئات الحديد في الجسم وبالتالي يحول دون الآثار السلبية لتراكم الحديد الزائد.

الكلمات المفتاحية: جزيئات أكسيد الحديد النانوية، السمية، الإجهاد التأكسدي، كيرسيتين، أرانب Albinose.

SOMMAIRE

Remerciements	
Résumé	
Liste de figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I: Nanoparticules d'oxyde de fer et toxicité	3
I.1. Oxyde de fer	3
I.1.1. Définition d'oxyde de fer	3
I.1.2. Formes d'oxyde de fer	3
I.1.2.1 Magnétite	3
I.1.2.2. Maghémite	4
I.1.3. Structure d'oxyde de fer	4
I.2. Nanoparticules d'oxyde de fer	5
I.2.1. Définition des nanoparticules d'oxyde de fer	5
I.2.2. Oxyde de fer superparamagnétique	6
I.2.3. Propriété magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer	6
I.2.4. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer	8
I.2.4.1. Coprécipitation	8
I.2.4.2. Microémulsion	9
I.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer	9
I.3.1. Métabolisme de fer	9
I.3.2. Régulation de l'homéostasie de fer	10
I.3.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer	11
Chapitre II : Quercétine et effet antioxydant	13
II.1. Quercétine	13
II.1.1. Historique	13
II.1.2. Définition de la quercétine	13
II.1.3. Distribution de la quercétine	13
II.1.4. Structure de la quercétine	14
II.1.5. Propriétés physiques	14
II.1.6. Propriétés chimiques	15

Sommaire

II.1.7. Pharmacocinétique et la biodisponibilité	15
II.1.8. Méthodes de séparation	16
II.2. Stress oxydant	16
II.2.1. Définition de stress oxydant	16
II.2.2. Radicaux libres	17
II.2.3. Sources des radicaux libres	17
II.2.4. Rôle des d'espèces oxygénées activées	18
II.2.5. Cibles biologiques des radicaux libres	18
II.2.5.1. Acide désoxyribonucléique ADN	18
II.2.5.2. Protéines	19
II.2.5.3. Lipides	19
II.2.5.4. Lipoprotéines	19
II.2.5.5. Glucides	20
II.2.6. Systèmes de défenses antioxydants	20
II.2.6.1. Systèmes enzymatique	21
II.2.6.2. Antioxydants non enzymatiques	22
II.3. Importance pharmacologique de la quercétine	24
II.3.1. Effet antioxydant	24
II.3.2. Effets neurologiques	24
II.3.3. Maladie cardiovasculaire	24
II.3.4. Activité anticancéreuse	24
II.3.5. Activité hépatoprotecteur	25

PARTIE II : PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériels et méthodes	26
I.1. Matériels	26
I.1.1. Matériel animal	26
I.1.1.1. Animaux et conditions d'élevage	26
I.1.1.2. Conception expérimentale	26
I.1.1.3. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes	26
I.1.1.4. Réactifs et produits utilisés	28
I.1.1.5. Matériels de laboratoire	28
I.2. Méthodes	29
I.2.1. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique	29
I.2.1.1. Méthode de dosage de fer sérique	29

Sommaire

I.2.1.2. Méthode de dosage d'urée sérique	29
I.2.1.3. Méthode de dosage d'acide urique	29
I.2.1.4. Méthode de dosage de créatinine	29
I.2.1.5. Méthode de dosage de bilirubine total	30
I.2.1.6. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)	30
I.2.1.7. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT)	30
I.2.1.8. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	31
I.2.2. Méthode de dosage des paramètres hématologiques	31
I.2.3. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif	31
I.2.3.1. Préparation de l'homogénats des organes	31
I.2.3.2. Méthode de dosage des protéines tissulaire	31
I.2.3.3. Méthode de dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires	32
I.2.3.4. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaires	33
I.2.3.5. Méthode de mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs)	34
I.2.3.6. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du catalase	34
I.3. Méthode d'analyse statistique	35
Chapitre II: Résultats et Discussion	36
II.1. Résultats et interprétation	36
II.1.1. Poids relative des organes des lapins	36
II.1.2. Evaluation des paramètres biochimiques sériques	37
II.1.3. Evaluation des paramètres hématologiques	41
II.1.4. Evaluation des paramètres de stress oxydant	43
II.1.4.1. Concentrations de malondialdéhyde (MDA) tissulaires	43
II.1.4.2. Concentrations de glutathion réduit (GSH) tissulaires	45
II.1.4.4. Activité tissulaires de glutathion -S - transférase (GST)	47
II.1.4.5. Activité tissulaires de catalase	49
II.2. Discussion	51
Conclusion générale	62
Références bibliographiques	64
Annexes	80

Résumé et mots-clés

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure de magnétite.	5
Figure 2	Différentes orientations de dipôle magnétique.	7
Figure 3	Régimes magnétiques de magnétite et de maghémite en fonction de leur taille.	8
Figure 4	Absorption intestinale de fer.	10
Figure 5	Mécanisme de cytotoxicité induit par les nanoparticules d'oxyde de fer.	12
Figure 6	3-hydroxyflavone avec l'emplacement numérotés pour l'attachement possible de groupes hydroxyle (OH) et les groupes glycosyle.	14
Figure 7	Modifications oxydatives dans la réaction de quercétine avec des radicaux DPPH dans des solvants portiques	15
Figure 8	Sources des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	18
Figure 9	Mécanisme de la peroxydation lipidique.	19
Figure 10	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	20
Figure 11	Protocol expérimentale de l'étude	27
Figure 12	Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire.	32
Figure 13	Poids relatif des organes (foie, cœur, reins et rate) chez le groupe témoin et les groupes traités.	36
Figure 14	Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.	38
Figure 15	Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités.	40
Figure 16	Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités.	42
Figure 17	Concentrations tissulaires de malondialdéhyde (MDA) chez le groupe témoin et les groupes Traités.	44
Figure 18	Concentrations de glutathion réduit (GSH) tissulaires chez le groupe témoin et les groupes traités.	46

Liste des figures

Figure 19	Activités tissulaires de glutathion –S - transférase (GST) chez le groupe témoin et les groupes traités.	48
Figure 20	Activités tissulaires de catalase chez le groupe témoin et les groupes traités.	49
Figure 21	Lapins au cours de l'expérience (photo originale)	80
Figure 22	Sacrifice, prélèvement de sang et mesure de glycémie (photo originale)	80
Figure 23	Dissection et prélèvement des organes (photo originale)	81
Figure 24	Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (photo originale)	81
Figure 25	Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800 (photo originale)	82
Figure 26	Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240 (photo originale)	82
Figure 27	Bain-marie de type MEMMERT (photo originale)	83
Figure 28	Microscope optique avec appareil photo (camera) (photo originale)	83

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Différentes formes d'oxyde de fer.	3
Tableau 2	Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant.	17
Tableau 3	Poids relatif des organes (foie, cœur, reins et rate) chez le groupe témoin et les groupes traités.	36
Tableau 4	Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.	37
Tableau 5	Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités.	39
Tableau 6	Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités.	41
Tableau 7	Concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) chez le groupe témoin et les groupes traités.	43
Tableau 8	Concentrations de glutathion réduit (GSH) tissulaires chez le groupe témoin et les groupes traités.	45
Tableau 9	Activités tissulaires de glutathion S - transférase (GST) chez le groupe témoin et les groupes traités.	47
Tableau 10	Activités tissulaires de catalase chez le groupe témoin et les groupes traités.	49

LISTE DES ABREVIATIONS

8-OH-dG:	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
ALA:	D-aminolévulinique
ALT:	Alanine Aminotransférase
Asc:	Ascorbate
AST:	Aspartate Aminotransférase
CAT:	Catalase
CK:	Créatine Kinase
DCR:	Diamètre Critique
DPPH:	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
ECM:	Extracellular Matrix
EOA:	Espèces Oxygénées Activées
EPO:	Erythropoïétine
ERK:	Extracellular signal-regulated kinases
ERN:	Reactive Nitrogen Species
ERO:	Espèces Oxygénées Réactivés
G6PD:	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GCL:	Glutamate Cystéine Ligase
GPx:	Glutathion Peroxydase
GR:	Glutathion Réductase
GSH:	Glutathion réduit
GS-SG:	Glutathion oxydé
GST:	Glutathion-S-Transférases
HDL:	High Density Lipoprotein
HNE:	hydroxynonéal
HO:	Hème Oxygénase
Hp:	Héphaesine
IONP:	Nanoparticules d'oxyde de fer
IRM:	Imagerie par Résonance Magnétique
ISO:	Organisation Internationale de Normalisation
JNK:	c-Jun N-Terminal kinases
LDL:	Low Density Lipoprotein
MAP:	Mitogen-Activated Protein

Liste des abréviations

MDA:	Malondialdéhyde
NADPH:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NK:	Natural Killer
NOS:	Oxyde Nitrique Synthase
NTBI:	Non-Transferrin Bound Iron
OHCl:	Oxydants Chlorés
PAL:	Phosphatase Alcaline
PBL:	Lymphocytes de sang périphérique
RL:	Radicaux Libres
SOD:	Superoxyde Dismutase
SPION:	Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques
Tf:	Transferrine
TGO:	Aspartate Aminotransférase
TGP:	Alanine Aminotransférase
α-TH:	Alpha-tocopherol

Introduction générale

La nanotechnologie est une branche de la science multidisciplinaire qui englobe de nombreux domaines de la science et de la technologie, y compris la biomédecine, la pharmacie, les sciences agricoles, sciences de l'environnement, la chimie, la physique, l'électronique, la technologie de l'information, et d'autres (**Chatterjee et al., 2014**). En 2008, l'Organisation internationale de normalisation (ISO) a classé les nanomatériaux en trois groupes principaux, à savoir, les nanoparticules, nanoplaques et nanofibres. Une nanoparticule est définie comme un matériau à trois dimensions externes sur une échelle nanométrique (1 nm-100 nm) (**Lei et al., 2013**).

Dans la biomédecine, des matériaux à l'échelle nanométrique sont d'une importance particulière en raison de leur taille compatible avec les cellules, les virus, des protéines et les gènes (**Estelrich et al., 2015**). Leur petite taille peut, cependant, être responsable à des effets biologiques néfastes. Par conséquent, plus récemment, la sécurité sanitaire et environnementale des nanomatériaux ont attiré une attention croissante, un manque d'information sur les impacts des nanomatériaux sur la santé humaine et l'environnement étant en surbrillance. À l'heure actuelle, les nanomatériaux les plus importants sont les oxydes métalliques simples, tels que l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3), de silice (SiO_2), l'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde de cuivre (CuO), l'oxyde de titane (TiO_2) d'oxyde de manganèse (MnO_2) et l'oxyde de fer (Fe_3O_4 , Fe_2O_3). Les risques de ces nanomatériaux sur la santé humaine et l'environnement sont largement inconnus. Les études toxicologiques sur les nanomatériaux précédentes étaient fréquemment effectuées sur TiO_2 , CdO_2 , C_{60} , et des nanotubes de carbone seuls (**Szalay et al., 2012**).

Pour des applications biologiques et biomédicales, des nanoparticules d'oxyde de fer magnétique sont le premier choix en raison de leur biocompatibilité, de leur stabilité chimique et leur propriété superparamagnétique (**Hyeon, 2002**). Les nanoparticules d'oxyde de fer (II, III) (IONPs) ont attiré beaucoup d'attention, non seulement en raison de leurs propriétés magnétiques, mais aussi en raison de leur grand potentiel dans plusieurs applications cliniques biomédicales et in vivo (**Abdalla et al., 2012**), tels que l'administration de médicaments, imagerie par résonance magnétique (IRM), amélioration du contraste, la réparation des tissus et de traitement du cancer de l'hyperthermie magnétique. Il a également été rapporté que IONPs peut améliorer l'efficacité des médicaments anticancéreux et d'inverser la multirésistance, et pourrait donc être utilisé comme vecteurs de médicaments ciblés. Donc, Il

Introduction générale

est crucial d'obtenir des données supplémentaires sur les grands effets toxiques et de potentiel génotoxique des nanomatériaux **(Singh et al., 2010)**.

Selon les études précédentes, l'exposition à IONP induit une cytotoxicité et des altérations cellulaires via le stress oxydative. Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme **(Meziti, 2009)**.

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes à des fins médicales rencontre un succès grandissant. 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 **(Boyaud, 2009)**. Parmi ces principes actifs, on trouve les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des substances phénoliques isolées à partir d'un large éventail de plantes vasculaires, avec plus de 8000 composés individuels connus. De nombreuses études ont suggéré que les flavonoïdes présentent des activités biologiques, y compris antiallergique, antivirale, anti-inflammatoire. Cependant, le plus grand intérêt porté sur les flavonoïdes provient du fait que ces composés présentent de nombreuses actions biologiques bénéfiques et principalement les activités antioxydantes dues à leur capacité à réduire la formation de radicaux libres et à piéger les radicaux libres **(Fiorucci, 2006)**. La capacité des flavonoïdes à agir comme antioxydants in vitro a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, mais, l'efficacité antioxydante des flavonoïdes in vivo est moins documentée **(Pietta, 2000)**.

La quercétine est l'un des composés les plus représentatifs de la famille des flavonoïdes et a été attribué à un certain nombre d'avantages potentiels pour la santé, y compris antioxydant, prévention du cancer, l'action anti-inflammatoire et l'activité cardio-protecteur **(Boots et al., 2008)**.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer et de valider l'effet antidote de quercétine chez les lapins.

Ce travail est divisé en deux parties. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres. Le premier chapitre concernant les nanoparticules d'oxydes de fer et leur effet toxique dans l'organisme et le deuxième chapitre concernant la quercétine et leur effet antioxydant. La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui contient la partie des matériels et méthodes utilisées durant ce travail et la partie 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.

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Nanoparticules d'oxyde de fer et toxicité

I.1. Oxyde de fer

I.1.1. Définition d'oxyde de fer

Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, et qui constitue en masse d'environ 5,1%. Selon les conditions environnementales, le fer peut former des composés en état bivalent ou trivalent telle que l'oxyde de fer (**Straub *et al.*, 2001**). L'oxyde de fer se trouve naturellement dans l'environnement sous forme de matière particulaire de la pollution atmosphérique et les éruptions volcaniques (**Szalay, 2012**).

I.1.2. Formes d'oxyde de fer

Seize phases pures d'oxydes de fer, à savoir, des oxydes, hydroxydes ou oxyhydroxydes sont connues à ce jour (**Tableau 1**), dans la plupart de ces composés, le fer est à l'état trivalent (**Mohapatra & Anand, 2010**). La magnétite (Fe_3O_4) ou de la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sont les deux oxydes de fer les plus fréquemment utilisés dans les applications biomédicales (**Estelrich *et al.*, 2015**).

Tableau 01: Différentes formes d'oxyde de fer (**Cornell & Schwertmann, 2003**).

Mineral	Chemical Composition
Goethite	$\alpha\text{-FeOOH}$
Lepidocrocite	$\gamma\text{-FeOOH}$
Akaganéite	$\beta\text{-FeOOH}$
Schwertmannite	$\text{Fe}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_y(\text{SO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$
	$\delta\text{-FeOOH}$
Feroxyhyte	$\delta'\text{-FeOOH}$
High pressure	FeOOH
Ferrihydrite	$\text{Fe}_5\text{O}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Bernalite	FeOH_3
	FeOH_2
Haematite	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Magnetite	Fe_3O_4
Maghemite	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
	$\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$
	$\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Wüstite	FeO

I.1.2.1 Magnétite

La Magnétite (Fe_3O_4) est un minéral ferrimagnétique noir contenant à la fois Fe II et Fe III (**Duguet *et al.*, 2012**). Les électrons peuvent sauter entre les ions Fe^{2+} et Fe^{3+} dans les sites octaédriques, même à la température ambiante, rendu la magnétite un matériau

demimétallique importante (**Andrade et al., 2009**). Il peut être produit par une variété de procédés d'oxydoréduction et de transformation, et la plupart des autres oxydes de fer peuvent être converties en magnétite. Magnétite peut également être produite par des bactéries réductrices de fer qui couplent la réduction des oxydes de Fe (III) avec le métabolisme des matières organiques (**Jentsch, 2007**). Les particules de magnétite ont été découvertes dans de nombreux organismes, y compris les bactéries, les poissons, les pigeons, les abeilles et les êtres humains (**Szalay, 2012**).

I.1.2.2. Maghémite

La Maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) est un minérale rouge-brun, ferromagnétique, isostructural de magnétite. Maghémite peut se former pendant la pédogenèse par plusieurs voies (**Cornell & Schwertmann, 2003**). L'un est par l'oxydation de la magnétite héritée de la roche-mère ou formé dans les sols. Un autre mécanisme, implique la conversion d'autres oxydes de fer tels que la goethite; les conditions essentielles sont la chaleur et la présence de matière organique. Une autre voie de synthèse qui est souvent utilisé dans le laboratoire, mais il est peu probable pour fonctionner dans la nature. Maghémite 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, 2000**). Structurellement, la différence entre la magnétite et la maghémite est l'état de charge; il y a en magnétite Fe^{3+} et Fe^{2+} , alors il n'y a qu'un Fe^{3+} dans la structure de la maghémite (**Zhang & Olin, 2012**).

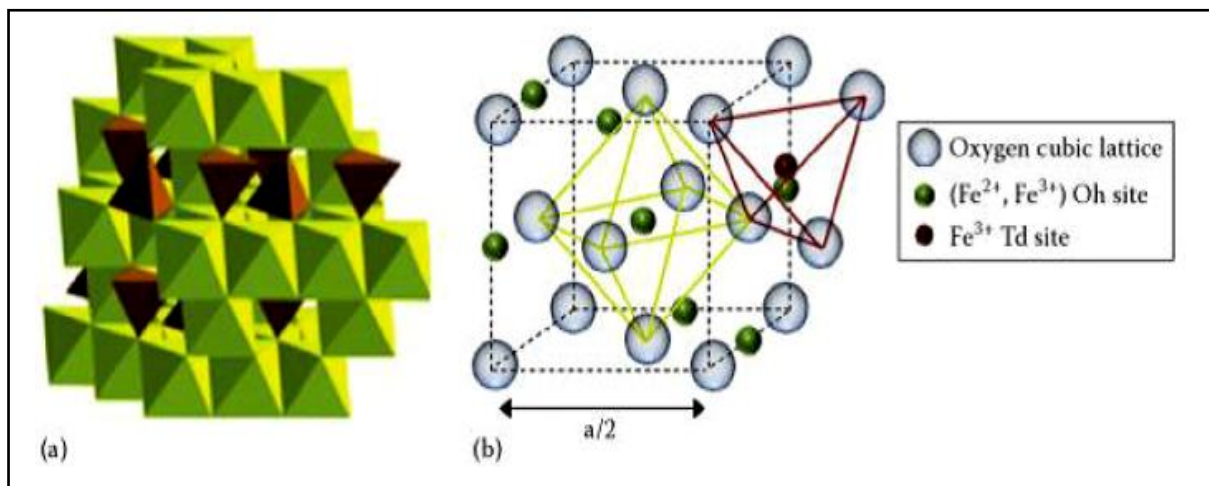
I.1.3. Structure d'oxyde de fer

Presque tous les oxydes de fer, les hydroxydes et les oxydes des hydroxydes sont cristallins. Le degré d'ordre structurel et la taille des cristaux sont toutefois variables et dépendent des conditions dans lesquelles les cristaux ont été formés. Tous les oxydes de Fe affichent une gamme de cristallinités sauf pour ferrihydrite et schwertmannite qui sont mal cristalline (**Cornell & Schwertmann, 2003**).

La structure de base d'oxydes de fer est un octaèdre dans lequel chaque atome de Fe est entouré soit par six ions d'O ou par les ions d'O et d'OH au même temps. L'oxyde de fer se compose d'un réseau d'anions dans laquelle l'octaèdre et, dans certains cas, les interstices tétraédriques sont partiellement remplis avec Fe trivalent ou divalent (**Kandori, 2006**).

La structure spinelle contient deux sites interstitiels, occupés par des cations métalliques, avec tétraédrique, (T_d) site, et octaédrique, (O_h) site, la coordination de l'oxygène résultant dans différents symétrie locale (**Pedis, 2016**). Généralement, les cations divalents

occupent les sites -T et les ions métalliques trivalents remplissent les sites -O. Cependant, les structures de spinelle inverse de magnétite et de maghémite sont formées avec Fe^{+2} au sites-T et Fe^{+3} répartis également à la fois aux sites -T et -O (**Fig.1**). Cet arrangement cristallographique donne aux nanoparticules de magnétite et de maghémite leurs propriétés magnétiques uniques (**Melnyczuk & Palchoudhury, 2014**).



I.2. Nanoparticules d'oxyde de fer

I.2.1. Définition des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules sont des fragments de taille inférieure au micron, de diamètres allant de 1 à 100 nm selon l'utilisation, en matériaux inorganiques ou organiques (**Wu et al., 2008**). Dans la dernière décennie, les nanoparticules ont été de plus en plus appliquées pour différents buts (**Szalay et al., 2012**). Ils comprennent un grand classe des particules ayant des propriétés médicales, environnementales et commercialement importantes ne figurent pas dans les éléments ou les matériaux en vrac (**Teeguarden et al., 2014**). L'oxyde de fer est l'un des nanoparticules magnétiques le plus populaire en médecine et en biotechnologie. L'application des petites particules d'oxyde de fer dans le diagnostic in vitro a été pratiquée pendant près de 40 ans (**Gilchrist et al., 1957**). Les nanoparticules d'oxyde de fer (IONPs) sont les seuls nanoparticules d'oxyde de métal approuvé pour l'utilisation clinique. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont très intéressantes en raison de leurs propriétés superparamagnétiques et leur large application (**Zhang & Olin, 2012**).

I.2.2. Oxyde de fer superparamagnétique

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPION) maintenir un potentiel immense dans une grande variété d'applications biomédicales (**Ito et al., 2005**). Les agents SPION ont une propriété unique de superparamagnétisme qui confère des avantages tels que la génération de chaleur dans des champs magnétiques alternatifs; ou une aptitude à être guidée vers un tissu ou un organe spécifique par un champ magnétique externe. Cette propriété est donc au cœur de l'exploitation de SPION dans la plupart des applications technologiques et biomédicales (**Singh et al., 2010**).

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION) sont constituées de deux composants de base, un noyau d'oxyde de fer magnétique cristallin et un revêtement de surface hydrophile. Le noyau d'oxyde de fer est composé d'un mélange de deux oxyde magnétique de fer, la magnétite (Fe_3O_4) et maghémite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), tous deux possèdent cubique oxygènes près emballés dans un spinelle inverse structures cristallographiques. En effet, la magnétite peut être convertie en maghémite dans des conditions d'oxydation ou de maghémite à magnétite dans des conditions réductrices. La magnétite et la maghémite présentent également des propriétés magnétiques similaires, bien que la saturation de l'aimantation de maghémite soit légèrement inférieure (**Weissleder et al., 2010**).

I.2.3. Propriété magnétique des nanoparticules d'oxyde de fer

Le magnétisme est un terme pour décrire comment les matériaux répondent à un champ magnétique. Lorsqu'un champ magnétique externe (H) est appliqué sur un matériau, les dipôles nucléaires ont tendance à s'aligner sur le terrain, ce qui provoque un moment magnétique. Le moment magnétique est la quantification des propriétés magnétiques, ces derniers sont déterminés par la disposition des électrons dans les orbitales d'une molécule donc le moment magnétique dépend de rotation globale d'électrons (**Zhang & Olin, 2012**). La quantité de moment magnétique par unité de volume est définie comme l'aimantation (M). La configuration électronique du Fe^{III} est $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^5$ et Fe^{II} est $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6$. Les électrons circulant autour les noyaux atomiques qui est chargés positivement et tournant sur leurs axes sont tous des dipôles magnétiques, également appelés magnétons (**Cornell & Schwertmann, 2003**).

Il existe différentes formes de magnétisme qui se pose en fonction de la façon dont les dipôles interagissent les uns avec les autres. Les formes courantes de magnétisme sont paramagnétisme, ferromagnétisme, antiferromagnétisme et ferrimagnétisme (**Fig.2**) (**Zhang & Olin, 2012**).

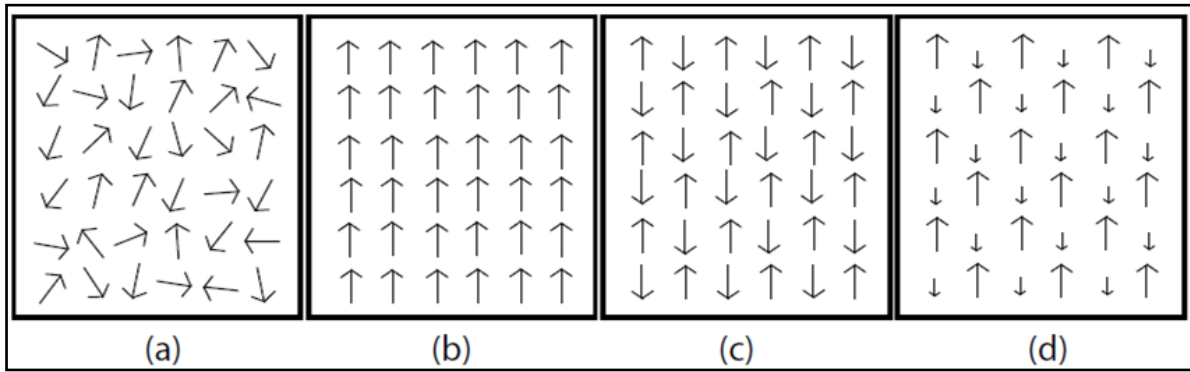


Figure 2: Différentes orientations de dipôle magnétique. (a) paramagnétique, (b) ferromagnétique, (c) antiferromagnétique et (d) ferrimagnétique (**Salazar-Alvarez, 2004**).

Des changements fondamentaux se produisent dans la structure magnétique de matériaux macroscopique magnétiquement ordonné lorsque leur taille physique est réduite. Dans les matériaux ferromagnétiques, les aimants sont associés en groupes appelés domaines. Un domaine magnétique se réfère à un volume de matériau ferromagnétique dans lequel tous magnétons sont alignées dans la même direction, en échangeant des forces (Fig.3). Un ferromagnétique en vrac subdivise spontanément en une structure multi-domaine pour réduire l'énergie magnétostatique associée à un grand champ de dispersion (**Bogart et al., 2014**).

Dans chaque domaine, l'aimantation ne varie pas; mais, entre les domaines, il y a relativement minces parois de domaine, dans lequel la direction d'aimantation tourne de la direction d'un domaine à celui de l'autre. La formation des parois des domaines est un processus piloté par l'équilibre entre l'énergie magnétostatique, ce qui augmente proportionnellement au volume de la matière, et l'énergie de paroi de domaine, qui augmente proportionnellement à la surface inter-faciale entre les domaines. Lorsque la taille d'un matériau ferromagnétique est réduite en dessous d'une valeur critique, le diamètre dite critique DCR, plus d'énergie est nécessaire pour créer une paroi de domaine puis de soutenir l'énergie magnétostatique extérieure de l'état de domaine unique; le matériau devient un seul domaine. La valeur de la DCR est typiquement de quelques dizaines de nanomètres et dépend du matériau. DCR d'une particule sphérique est atteinte lorsque l'énergie magnétostatique est égale à l'énergie inter-faciale (**Fig.3**) (**Estelrich et al., 2015**).

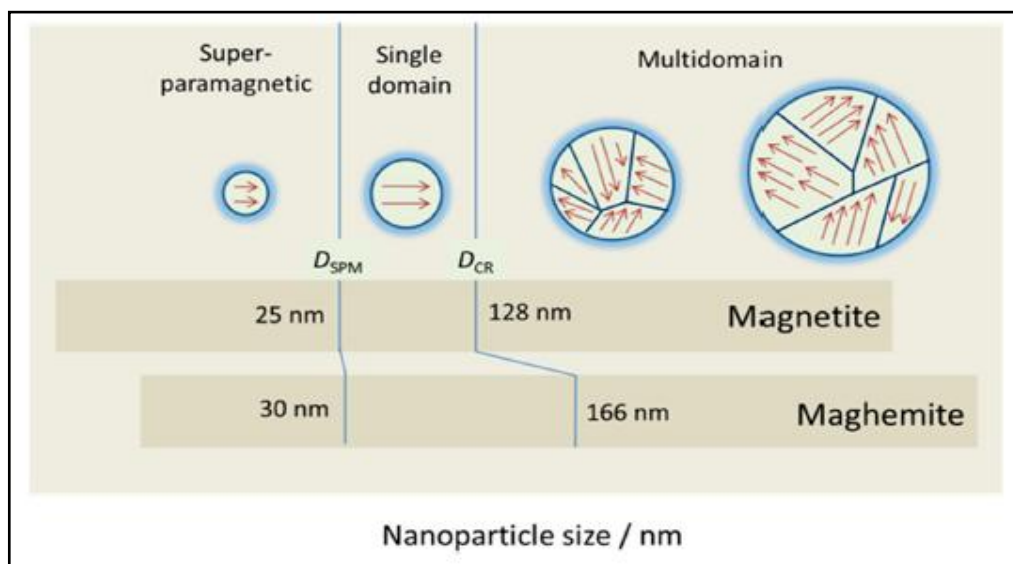


Figure 3: Régimes magnétiques de magnétite et de maghémite en fonction de leur taille (superparamagnétique, domaine unique, multi domaine) (Estelrich *et al.*, 2015).

Aujourd'hui, les IONP ont suscité beaucoup d'intérêt de la recherche et ont été largement utilisés dans les biosciences et la recherche clinique. Grâce à leur propriété magnétique, les nanoparticules d'oxydes de fer ont été le point de grandes applications potentielles telles que la livraison de la drogue, la séparation magnétique de cellules départ, mais, en particulier, leur utilisation pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM), car ils sont très efficaces comme promoteurs de relaxation, donc, ils sont amélioré le contraste des tissus et d'aider à former des images plus nettes de la zone d'intérêt (Lei *et al.*, 2013).

I.2.4. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Diverses méthodes peuvent être utilisées dans la fabrication des nanoparticules d'oxyde de fer, mais les plus utilisés est la coprécipitation et la microémulsion (Laurent *et al.*, 2008).

I.2.4.1. Coprécipitation

La technique de coprécipitation est probablement la voie chimique la plus simple et la plus efficace pour obtenir des particules magnétiques. Les oxydes de fer (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) sont habituellement préparés par un mélange stœchiométrique de sels ferreux et ferriques en milieu aqueux. Fe^{2+} ou Fe^{3+} sont ajoutées à une base sous atmosphère inerte ou à des températures élevées, et la particule magnétique est ensuite précipité (Melancon & Li, 2009). Bien que de nombreuses variantes existent, les méthodes peuvent être différenciées en fonction des sels utilisés comme précurseurs (Landmank, 2008). Il est essentiel de contrôler

la cinétique de réaction, qui est fortement liée à la vitesse d'oxydation des espèces de fer (Abdalla *et al.*, 2012).

I.2.4.2. Microémulsion

Une microémulsion est un système thermodynamiquement stable composé d'au moins trois éléments: deux composants non miscibles (habituellement de l'eau et huile) et d'un agent tensio-actif, qui fournit un milieu micro-hétérogène pour la production de nanoparticules (Bao *et al.*, 2004). Les molécules tensioactives peuvent former une monocouche à l'interface entre l'huile et l'eau, avec les queues hydrophobes des molécules tensioactives dissous dans la phase huileuse et les groupes de tête hydrophiles dans la phase aqueuse. En particulier, dans les microémulsions eau-dans-huile, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont précipitées et oxydées à l'intérieur de la micelle nanométrique (Wu *et al.*, 2008). Dans les microémulsions huile-dans-eau, les nanoparticules sont synthétisées par mise en suspension d'un précipité de sel ferreux tensio-actif dans une solution aqueuse (Mohammadi, 2008).

I.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

I.3.1. Métabolisme de fer

Quand IONPs sont digérées par un acide, la structure cristalline et le superparamagnétisme sont détruits, et un sel paramagnétique est résulté. La conversion des oxydes de fer d'un matériau paramagnétique à un matériau superparamagnétique se produit dans les systèmes biologiques comme une première étape chimique de la dégradation et l'utilisation des IONP. (Weissleder *et al.*, 2010). Ensuite, les lysozymes de mucus de tube digestif (Roberfroid *et al.*, 2008) dégradent IONP en ions de fer par hydrolyse enzymatique efficaces à faible pH (Arbab *et al.*, 2005).

Le fer est ensuite absorbé, mais seulement la forme ferreuse (Fe^{2+}) de fer qui est absorbé. Il y a une activité Fe^{3+} réductase associée au transporteur de fer dans la bordure en brosse des entérocytes. Il y a très peu d'absorption de fer dans l'estomac, l'absorption a lieu presque entièrement dans le duodénum. Le Fe^{2+} entre dans les entérocytes via les transporteurs DMT1. Une partie est stockée dans la ferritine et le reste est transporté hors des entérocytes par un transporteur basolatéral, le ferroportine 1, le seul exportateur connu de fer. Une protéine appelée héphaestine (Hp) est associée à la ferroportine 1, elle facilite le transport basolatéral. Dans le plasma, le Fe^{2+} est converti en Fe^{3+} et lié à la protéine de transport du fer, la transferrine (Fig.4) (Ganong, 2004; Beaudoux & Durand, 2010).

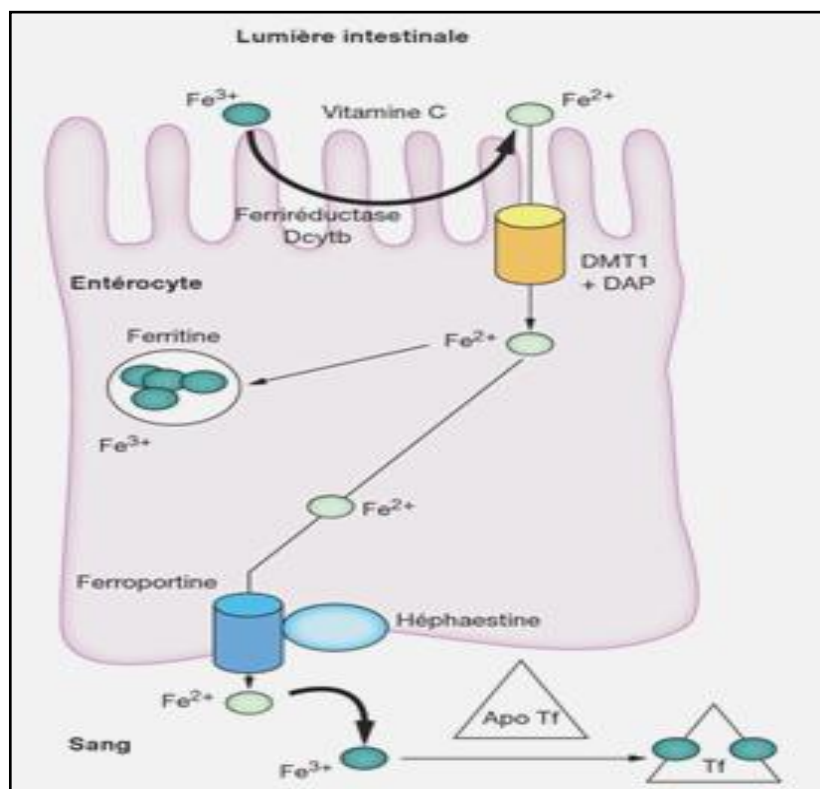


Figure 4: Absorption intestinale de fer (Beaudeux & Durand, 2010).

La transferrine est la principale protéine de transport de fer. Le fer absorbé par l'intestin ou libéré lors du catabolisme de l'hémoglobine se fixe à l'apotransferrine. Une molécule de transferrine peut fixer deux ions Fe^{+++} . 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). 70% du fer de l'organisme est dans l'hémoglobine, 3% dans la myoglobine et le reste dans la ferritine. Le fer de réserve se trouve essentiellement au niveau des cellules réticulo-endothéliales du foie, de la rate et de la moelle osseuse (Ganong, 2004). Très peu de fer est filtré par le glomérule rénal, ce fer est totalement réabsorbé le long du néphron (Beaumont & Canonne-Hergaux, 2005).

I.3.2. Régulation de l'homéostasie de fer

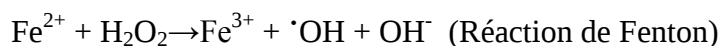
Le métabolisme et l'homéostasie du fer sont tributaires de la bonne régulation de l'hepcidine, un petit peptide antimicrobien exprimé dans le foie (Nemeth *et al.*, 2004). Les études génétiques chez des souris dépourvues ou surexprimant l'hepcidine suggèrent que ce peptide inhibe à la fois l'absorption du fer dans l'intestin grêle et la libération du fer recyclé à partir de macrophages. Pour limiter l'exportation de fer, hepcidine bloque le ferroportine, le seul exportateur connu de fer, en se liant à elle et provoquant son neutralisation

(Nicolas *et al.*, 2002). La régulation positive de l'hépcidine est en réponse à des stimuli inflammatoires chroniques (par exemple, un cancer, une infection, l'auto-immunité) conduit à l'anémie de maladie chronique, tandis que la régulation négative de l'hépcidine est associée à la maladie de surcharge en fer de l'hémochromatose (Peyssonnaud *et al.*, 2007).

I.3.3. Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

À ce jour, une grande attention a été accordée à la biocompatibilité de IONPs dans le corps humain. De nombreuses études ont été démontré que à des doses de 100 µg/mL ou plus, IONPs à différentes caractéristiques physico-chimiques peuvent causer une faible toxicité ou une cytotoxicité (Fig.5). 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. Mais, ils peuvent induire une toxicité par l'intermédiaire d'une surcharge en fer. Depuis que IONPs doivent être magnétiquement ciblée à un tissu/organe particulier en application biomédicale, une forte concentration de fer serait localisée dans le tissu/organe ciblé (Fig.5) (Lei, *et al.*, 2013).

Par la suite, des niveaux élevés d'ions de fer libres dans le tissu exposé peut conduire à un déséquilibre dans son homéostasie et peuvent provoquer des réponses cellulaires aberrantes, y compris la cytotoxicité, le stress oxydatif, les événements épigénétiques et les processus inflammatoires (Häfeli *et al.*, 2009). Ce «fer libre» peut potentiellement traverser la membrane nucléaire ou mitochondrial et dans ce dernier cas, le fer libre sous la forme d'ions ferreux (Fe^{2+}) peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène produit par les mitochondries pour produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs et des ions ferrique (Fe^{3+}) via la réaction Haber-Weiss, puis la réaction de Fenton (Kehrer, 2000):



Par conséquent, les radicaux hydroxyles générés par le fer libre pourraient endommager l'ADN, des protéines, des polysaccharides et des lipides *in vivo* (Singh *et al.*, 2010), ce qui peut initier la cancérogenèse ou avoir une influence significative sur les générations futures (Lei, *et al.*, 2013).

D'autre part, les fonctions biologiques de fer sont dues à sa capacité à former une dextérité diversifiée avec des ligands organiques et un potentiel d'oxydoréduction. Ces caractéristiques essentielles de cet élément rendent une entité dangereuse si laissé sans

surveillance. Ceci est la raison pour laquelle la majorité du fer dans le corps se trouve être associée à des biomolécules protéiques et non protéiques pour protéger sa toxicité. Dans le plasma, la majorité du fer est lié à la transferrine (Tf). Le fer non lié à transferrine (NTBI) est le terme utilisé pour le fer libre présent dans le plasma, en cas d'excès de fer à cause de la saturation de transferrine, y compris toutes les formes de fer présent dans le sérum ou le plasma qui ne sont pas liés à Tf et des protéines comme l'hème, apoferritine, hemosidérine...etc (**Meghna & Ramavataram, 2012**).

Le fer non lié a la capacité de générer les radicaux libres très réactif et connu pour causer une immense quantité de dommages à divers organes du corps. Il y a une lacune dans la littérature concernant la manière précise de l'enlèvement et de la durée de vie de NTBI, bien que certaines études indiquent son jeu d'organes hautement vasculaires comme le foie et le cœur. Les principaux organes influencés par la toxicité du fer sont le foie, le cœur, le pancréas, les reins, les organes impliqués dans l'hématopoïèse principalement la rate (**Hider, 2002**).

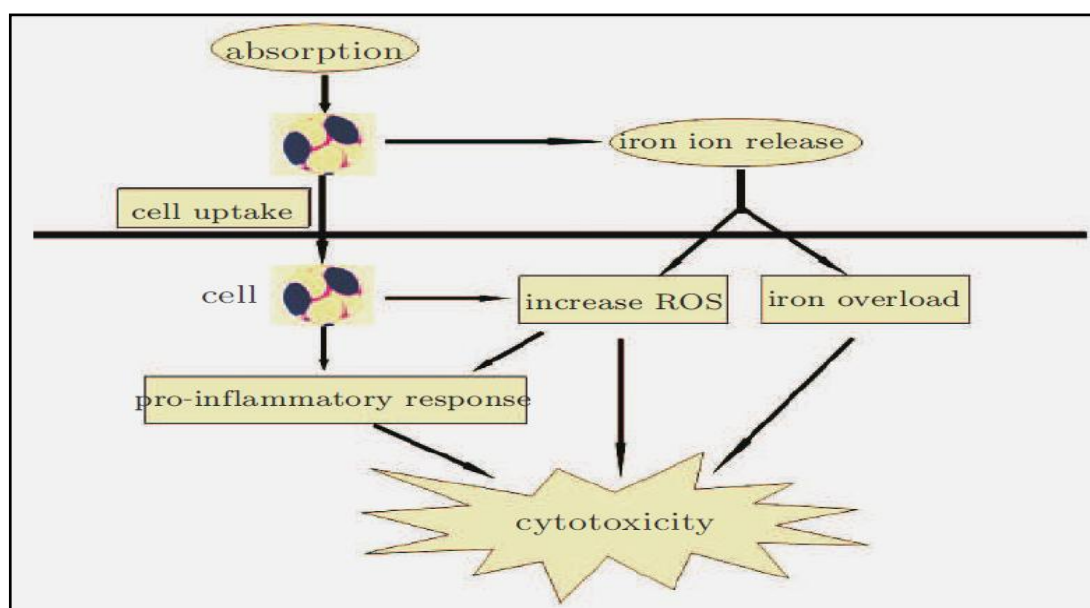


Figure 5: Mécanisme de cytotoxicité induit par les nanoparticules d'oxyde de fer (**Singh et al., 2010**).

Chapitre II

Quercétine et effet antioxydant

II.1. Quercétine

II.1.1. Historique

Les flavonoïdes appartiennent à un groupe de substances naturelles à structure phénolique variable et se trouvent dans les fruits, les légumes, les céréales, les racines de l'écorce, tige, fleurs et le thé (**Ross & Kasum, 2002**). Ces produits naturels sont connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiés, et dans beaucoup des végétaux sont responsables de leurs couleurs attrayantes de fleurs, de fruits et laisse (**Cao et al., 2010**).

La quercétine est une bioflavonoïde qui a été largement étudiée par les chercheurs au cours des 30 dernières années. Ils ont été découverts par le lauréat du prix Nobel, Albert Szent Györgyi en 1930 (**Ross & Kasum, 2002**).

II.1.2. Définition de la quercétine

La quercétine, ce nom vient du latin - quercetum, qui signifie chênes de la forêt ou Quercus, et est un membre de la classe des flavonols et forme l'épine dorsale des beaucoup d'autres flavonoïdes, notamment les flavonoïdes d'agrumes comme la rutine, l'hespéridine, la naringénine et tangéritine. 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**).

II.1.3. Distribution de la quercétine

La quercétine est largement distribués dans les plantes supérieures et constitue donc une partie de notre alimentation quotidienne avec un apport quotidien de moyen de 16 mg (**Graefe et al., 2001**). Elle présente dans les fruits comestibles, légumes (**Heim et al., 2002**), des herbes, des huiles et de la thé (**Das et al., 2008**), ou des produits connexes, par exemple les pommes, les oignons, *Ginkgo biloba* et le vin rouge (**Soheir & Abd El-Rahmanand, 2014**). La quercétine se trouve aussi en abondance dans le brocoli, les baies, framboises, raisin rouge, cerises, les agrumes (**Gregory & Kelly, 2011**). Aussi, des travaux préliminaires de feuilles par l'Université du Queensland, en Australie, suggère que quercétine se retrouve également dans les variétés de miel tels que celui dérivé de l'*eucalyptus* (**Formica & Regelson, 1995**).

II.1.4. Structure de la quercétine

La Quercétine (3,3', 4', 5,7-pentahydroxyflavone), se compose de 3 anneaux et 5 groupes hydroxyles (**Fig.6**). Elle se trouve généralement dans les plantes comme glycone (principalement liés au glucose et rutinose) ou sous forme du hydrates de carbone conjugués (**Gregory & Kelly, 2011**). Par exemple, quercétine conjugués glycone comprennent Rutine et Thujin, Rutine est également connu comme la quercétine-3-rutinoside et Thujin est également connu sous la quercitrine, la quercétine-3-O-rhamnoside et la quercétine 3-rhamnosyl (**Parul, & Deepak, 2007**).

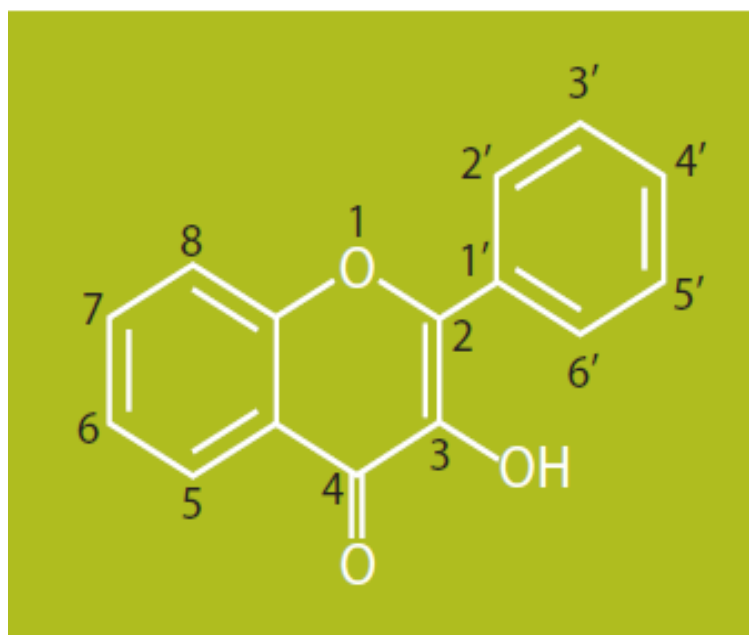


Figure 6: 3-hydroxyflavone avec l'emplacement numéroté pour l'attachement possible de groupes hydroxyle (OH) et les groupes glycosyle (**Gregory & Kelly, 2011**).

II.1.5. Propriétés physiques

Malgré la présence de cinq groupes hydroxyle, la molécule quercétine a un caractère lipophile, ces dérivés peuvent être à la fois lipo-hydrophile, ils sont synthétisés par des glandes situées à la surface des feuilles, des fleurs ou des fruits. La glycosylation d'au moins un groupe hydroxyle des dérivés de la quercétine se traduit par une augmentation de son caractère hydrophile (**Rice-Evans et al., 1997**). Ce changement de caractère de lipophile hydrophile est très important pour les plantes pour les dérivés glycosidiques de quercétine, qui sont soluble dans le cytosol, pour être plus facile à transporter entre les diverses parties de la plante et stockées dans des vacuoles (**Williams & Grayer, 2004**).

II.1.6. Propriétés chimiques

La propriété chimique le plus largement étudié des composés phénoliques est leur activité antioxydant. Les propriétés antioxydants des composés phénoliques sont liés 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 (**Rice-Evans *et al.*, 1997**). Aussi, elle a été soutenue par une recherche comparant l'activité anti-radicalaire des dérivés glycosidiques de la quercétine. En réaction avec DPPH, la quercétine fait donne deux atomes d'hydrogène et se transforme en une quinone intermédiaire (**Fig.7**).

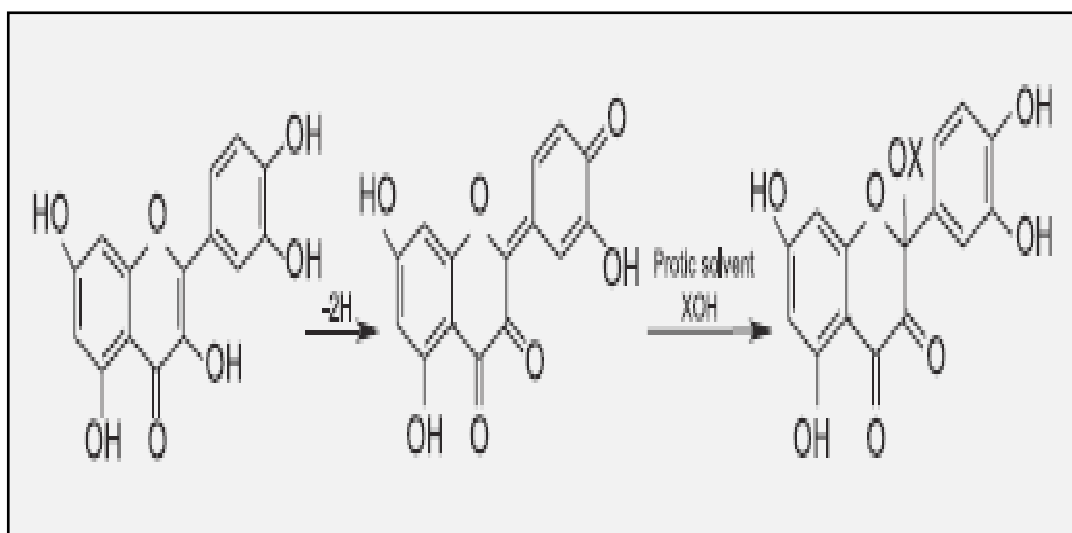


Figure 7: Modifications oxydatives dans la réaction de quercétine avec des radicaux DPPH dans des solvants portiques (**Goupy *et al.*, 2003**).

Même si la présence d'un groupe hydroxyle en C-3 de la quercétine permet de la régénération de l'ion catéchol par l'ajout de protons de la solution (**Goupy *et al.*, 2003**). Dans le cas des dérivés de la quercétine, la glycosylation en C (4') - OH nettement diminué la capacité de H-donneur, tandis que C (3) -OH dérivés de la quercétine a montré un potentiel de réduction comparable à celui de la libre aglycone (**Burda & Oleszek, 2001**).

II.1.7. Pharmacocinétique et la biodisponibilité

La quercétine circule dans le plasma uniquement sous forme conjuguée (**Graefe *et al.*, 2001**). Des groupes acides glucuronique, le sulfate ou le méthyle, sans des quantités importantes de quercétine libre. Elle a été trouvée pour atteindre 0,1 à 10 $\mu\text{mol/l}$ dans la circulation. Sa concentration est principalement due à la présence de métabolites de quercétine plutôt que son aglycone (**Murota & Terao, 2003**). En ce qui concerne la

pharmacocinétique des glucosides conjugués de la quercétine, il semble que le principal déterminant de l'absorption de ces conjugués est la nature de la fraction sucre. Par exemple, la quercétine glucoside est absorbé par l'intestin grêle, tandis que la quercétine rutinosides est absorbé dans le côlon après l'élimination du fragment d'hydrate de carbone par des enzymes bactériennes **(Parul & Deepak, 2007)**.

Après avoir été absorbé dans l'intestin grêle, la quercétine est transporté 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 liée 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)**.

II.1.8. Méthodes de séparation

La méthode de l'extraction par solvant à partir de matrices solides est utilisée pour extraire la quercétine à partir de fruits, végétales, et d'autres matières végétales. Une partie pesée d'échantillon solide et soigneusement broyé et placé dans un récipient. Le solvant choisi est ajouté et le mélange est agité un certain temps (de quelques minutes à plusieurs heures **(Wach et al., 2007)**). Les phases sont séparées par filtration. Pour augmenter l'efficacité de l'extraction de la quercétine, des échantillons solides sont non seulement soigneusement broyés mais aussi trempé dans le solvant pour les 1-12 h. Pour l'extraction liquide-liquide de la quercétine à partir des échantillons solides, du méthanol de l'éthanol ou leurs mélanges avec de l'eau et /ou acide hydrochlorique sont le plus souvent utilisé **(Biesaga et al., 2007)**.

II.2. Stress oxydant

II.2.1. Définition de stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (ERO) et les défenses antioxydants de l'organisme, en faveur des premières **(Haleng et al., 2007)**. Ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes **(Durackova et al., 2008)**. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant **(Favier., 2003)**.

II.2.2. Radicaux libres

Les radicaux libres (RL) (**Tableau 02**) sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (**Halliwell, 2006**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène et appelés espèces oxygénées réactives (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

Tableau 02: Nature des différentes espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant (**Delattre, 2005**).

<i>Radicaux libres primaires</i>	<i>Dérivés oxygénés non radicalaires</i>
$O_2^{\bullet -}$ = Radical superoxyde.	$1/2O_2$ = Oxygène singulet
$HO_2^{\bullet}$ = Radicale perhydroxyle	H_2O_2 = Peroxyde d'hydrogène.
$^{\bullet}OH$ = Radical hydroxyle	$ONOOH$ = Nitroperoxyde
$RO_2^{\bullet}$ = Radical peroxyde	$ONOO^-$ = Peroxynitrite
$RO^{\bullet}$ = Radical alkoxyle.	
$NO^{\bullet}$ = monoxyde d'azote	

II.2.3. Sources des radicaux libres

Les RL sont produits par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes: phagocytose, chaîne respiratoire mitochondriale, cellules endothéliales, cellules micro gliales, métaux lourds, rayonnements ultraviolets ou ionisants, oxydation dans l'organisme des catécholamines, des pesticides ou certains médicaments...etc. (**Fig.8**) (**Leverve et al., 2001**).

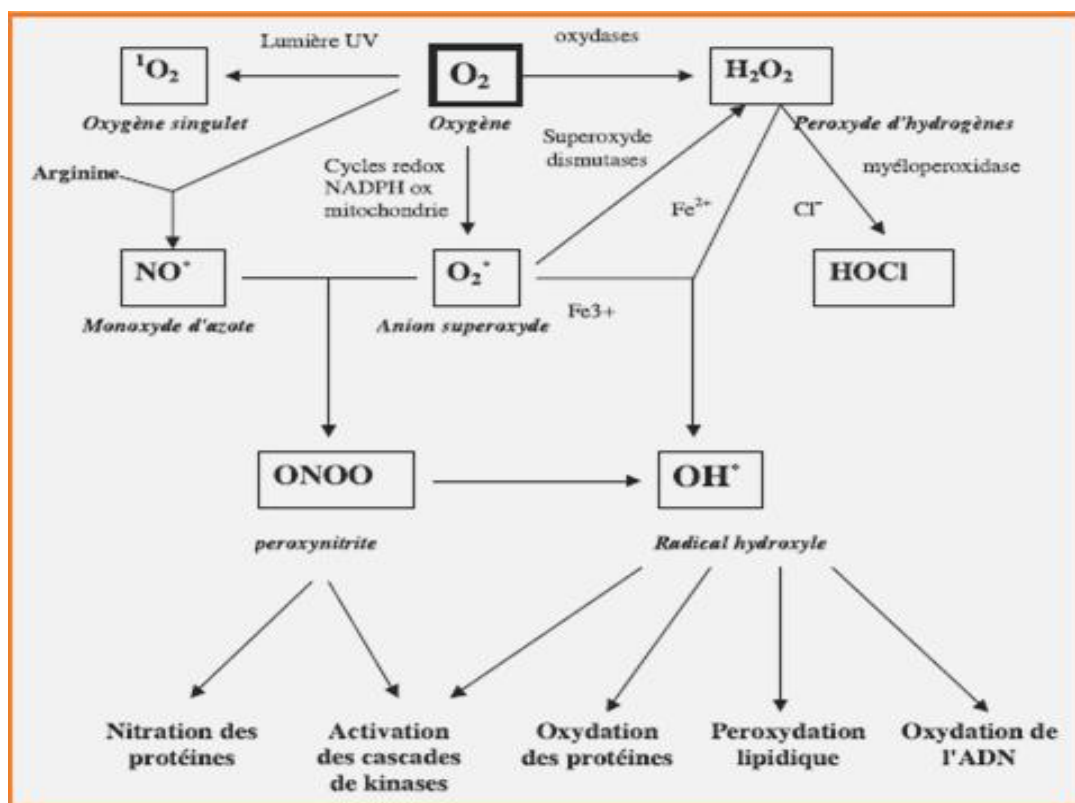


Figure 8: Sources des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

II.2.4. Rôle des d'espèces oxygénées activées

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration (Haleng *et al.*, 2007). Les RL participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire et au fonctionnement de certains neurones (Favier, 2003). Ce paradoxe peut être, au moins en partie, expliqué par des effets dose-dépendants (Delattre, 2005).

II.2.5. Cibles biologiques des radicaux libres

Toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles des ERO (Barouki, 2006).

II.2.5.1. Acide désoxyribonucléique ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\cdot OH$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le

déclenchement du cancer et le vieillissement (HALENG., *et al* 2007). Encore, Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (4- HNE et l'MDA) sont des agents carcinogènes via la formation des adduits avec les bases nucléiques (Feng *et al.*, 2004).

II.2.5.2. Protéines

Les structures (primaire, secondaire et tertiaire) et les fonctions des protéines sont altérées par les ERO. Les protéines sont aussi des cibles pour les EAO en particulier certains acides aminés comme la cystéine, la méthionine et la tyrosine (Tratner, 2003). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

II.2.5.3. Lipides

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme l'acide linoléique ou l'acide arachidonique sont les cibles privilégiées des ERO (Pincemail *et al.*, 2005) qui conduisent à la formation des radicaux et des peroxydes lipidiques (Tratner, 2003; Delattre, 2005).

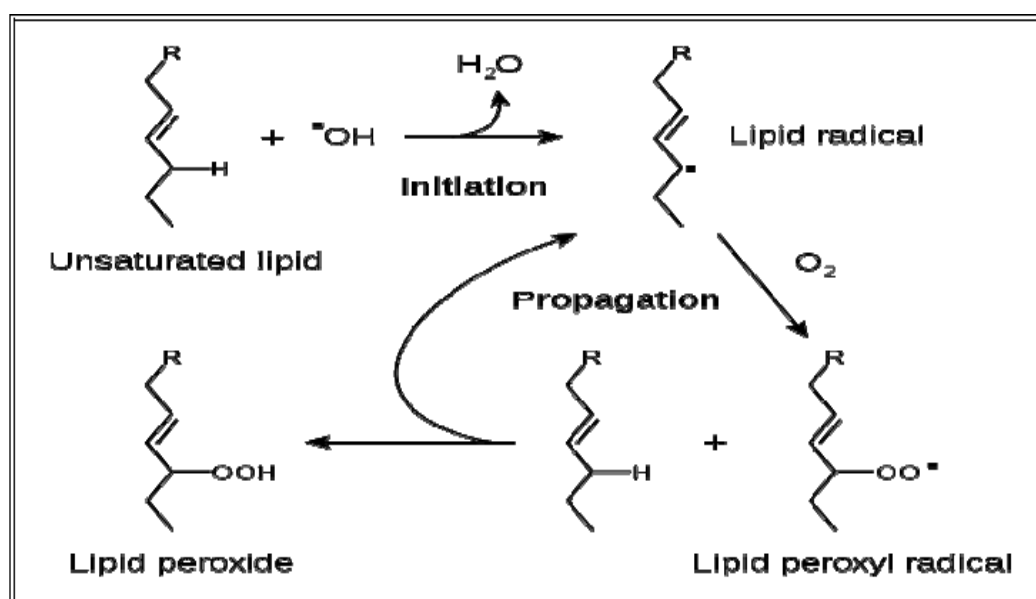


Figure 9 : Mécanisme de la peroxydation lipidique (Tim., 2009).

II.2.5.4. Lipoprotéines

Les lipoprotéines de faible densité sont susceptibles d'être oxydés par les RL qui provoquent un changement dans leur structure conduisant à la formation des aldéhydes (MDA et HNE) (Nicolosi *et al.*, 1999). EAO peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un nombre de changements structuraux et fonctionnels (Aruoma, 1999). Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au

sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose (Pincemail *et al.*, 1999).

II.2.5.5. Glucides

Le glucose peut s'oxyder en présence des ions métalliques conduisant à la libération des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $OH^\cdot$ qui peuvent entraîner la coupure des protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycose oxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

II.2.6. Systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'EAO (Favier, 2003). Il existe une quantité innombrable d'antioxydants et ceux-ci peuvent être non enzymatiques ou enzymatiques (You *et al.*, 2003).

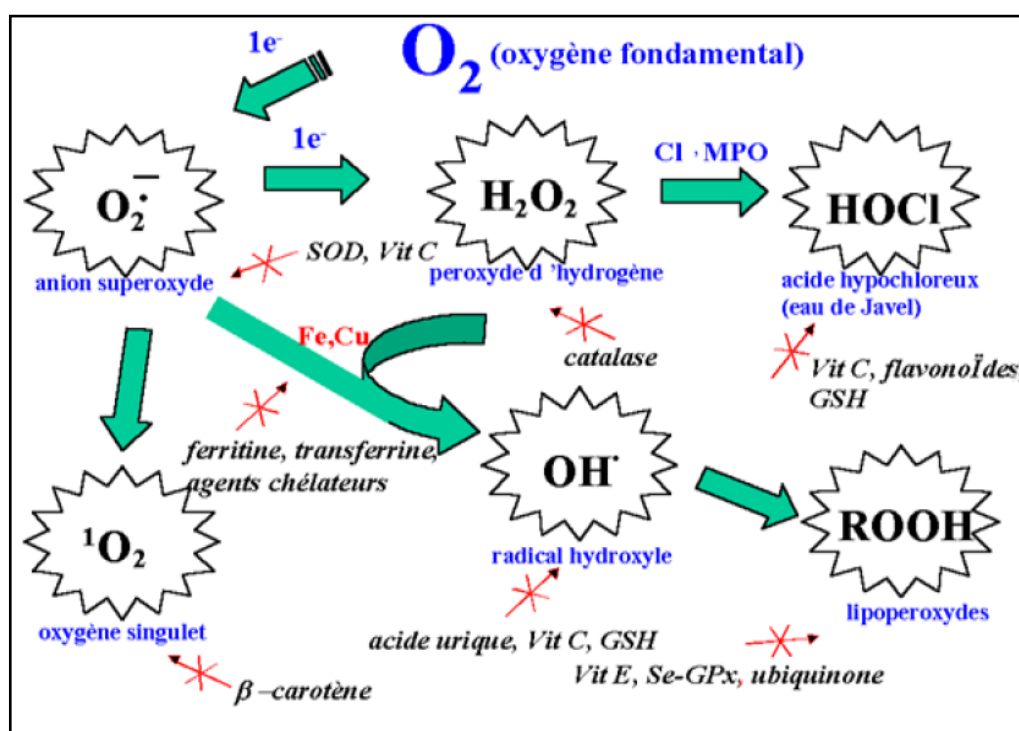


Figure 10: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Haleng *et al.*, 2007).

II.2.6.1. Systèmes enzymatique

A. Superoxide dismutase

Le superoxyde dismutase (ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, le contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (**Zelko et al., 2002**).



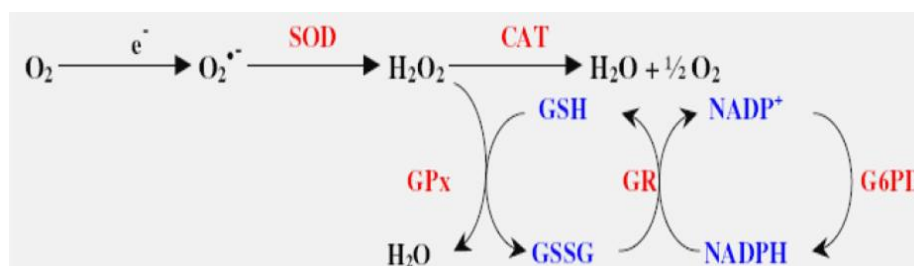
B. Catalase

La Catalase (Ec 1,11,1,6 ; H₂O₂ oxydoréductase)Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Sorg, 2004**).



C. Glutathions peroxydases et réductases

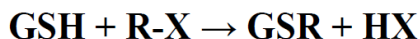
Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004**). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



D. 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**). La glutathion-S-

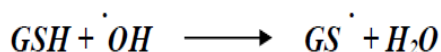
transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhihua et al., 2004**). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



II.2.6.2. Antioxydants non enzymatiques

A. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol.L⁻¹ (**Halliwell, 2006**). La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur, qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles:



Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R· (**Gardès-Albert et al., 2003**):



B. Protéines plasmatiques

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe²⁺/Fe³⁺ ou Cu²⁺/Cu⁺ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (**Martinez-Cayuela., 1995**).

C. Acide urique

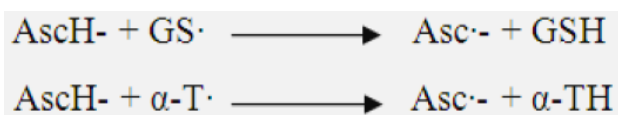
Produit terminal majeur du métabolisme des purines, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH·, ROO·, NOO·...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (**Haleng et al., 2007**).

D. 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**).

E. Acide ascorbique

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO• ou O₂ (**Vertuani et al., 2004**). De plus, l'ascorbate 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 (**Gardes et al., 2003**).



F. Vitamine E

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (α , β , δ , γ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls α et δ tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (**Vertuani et al., 2004**).

G. Oligoéléments

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

H. 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 (**Delattre, 2005**).

II.3. Importance pharmacologique de la quercétine

Les recherches in vitro et in vivo, a mis l'accent sur l'intérêt thérapeutique de la quercétine (**Meyers et al., 2008**). Une preuve animale suggère des effets antioxydants de la quercétine qui offrent la protection du cerveau, le cœur, et d'autres tissus contre les lésions induisent par des composés toxiques, et d'autres facteurs qui peuvent provoqué le stress oxydative (**Annapurna et al., 2009**).

II.3.1. Effet antioxydant

La quercétine agit comme piègeurs des radicaux libres et exerce un effet protecteur dans les dommages tissulaires (**Santos et al., 1998**). Elle empêche le dommage des tissus. Une façon est le balayage direct des radicaux libres. Les flavonoïdes en particulier la quercétine peut inhiber l'oxydation des LDL in vitro. Cette action protège contre l'athérosclérose (**Halliwell, 1994**).

II.3.2. Effets neurologiques

La quercétine est un neuroprotecteur (**Joseph & Muralidhara, 2013**), elle a des effets bénéfiques contre les maladies neuro-dégénératives (par exemple, Maladie d'Alzheimer) où il montre un effet inhibitrice contre l'acétylcholinestérase (**Choi et al., 2012**). En outre, la quercétine a été rapporté pour réduire le stress oxydatif induit par la 6- hydroxydopamine dans les neurones du cerveau de rat (**Haleagrahara et al., 2013**).

II.3.3. Maladies cardiovasculaires

La quercétine peut avoir un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires, mais il n'y a pas des essais cliniques contrôlés. Une étude épidémiologique suggère que des apports élevés en diététique des flavonoïdes, en particulier la quercétine, sont associés avec un risque réduit de maladies cardiovasculaires chez les hommes plus âgés (**Hertog et al., 1993**). Cet effet protecteur est en raison d'une variété d'activités de quercétine (**Di Santo et al., 2003**).

II.3.4. Activité anticancéreuse

La quercétine a été rapporté comme un agent anticancéreux puissant au cours des études in vitro sur diverses lignées de cellules cancéreuses et dans des études in vivo chez les rongeurs, en particulier les souris. Elle a un potentiel de piégeage des radicaux, Par conséquent, elle est capable de prévenir le cancer induite par le stress oxydatif (**Dajas, 2012**).

II.3.5. Activité hépato-protecteur

L'étude in vivo chez des souris traités par la quercétine contre l'hépatotoxicité indique une diminution de la concentration plasmatique de l'alanine aminotransférase (**Lekic et al., 2013**). Les dommages oxydatifs induits par l'éthanol chez les hépatocytes des rat a été signalé à être curable avec l'administration de la quercétine (**Liu et al., 2012**).

PARTIE II

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I

Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes**I.1. Matériels****I.1.1. Matériel animal****I.1.1.1. Animaux et conditions d'élevage**

Notre étude a été réalisée sur vingt (20) lapins mâles de type Albinos de race néo-zélandaise, blancs, âgés de 3 à 6 mois et dont le poids varie de 500 à 1300g. Les lapins ont été traités premièrement par deux types de vaccins; Eveen 0.5 ml et Coclavax 1 ml. Ces animaux sont élevés au sein de l'animalerie de la faculté de sciences de la nature et de la vie, département de la biologie cellulaire et moléculaire à l'université d'El-Oued. Les animaux sont logés dans des cages avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.

I.1.1.2. Conception expérimentale

Premièrement, les lapins ont été soumis à une période d'adaptation pendant 20 jours. Durant cette phase, 1ml de l'eau distillée a été gavé chaque jour aux lapins. Les lapins ont été divisés en cinq groupes gardés dans les mêmes conditions:

Groupe 1 (témoin): 4 lapins, recevant 1ml/jour d'eau distillée.

Groupe 2 (dose 1 de SPION): 4 lapins, recevant chaque jour 50 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours.

Groupe 3 (dose 2 de SPION): 4 lapins, recevant chaque jour 100 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours.

Groupe 4 (dose 3 de SPION): 4 lapins, recevant chaque jour 150 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé pendant 21 jours.

Groupe 5 (SPION dose 2 + quercétine): 4 lapins, recevant chaque jour 100 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques dissous dans l'eau distillé et 10 mg/kg de quercétine pendant 21 jours.

I.1.1.3. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes

Après 16 h de jeûne, les lapins sont sacrifiés (par décapitation) après la mesure de poids de chaque lapin. Au moment du sacrifice, le sang est collecté dans des tubes secs et des tubes EDTA pour chaque lapin. Le sang des tubes secs est ensuite centrifugé à 3000 tours/minute

pendant 15 minutes pour la récupération du sérum. Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques.

Après la dissection, le foie, les reins, le cœur et la rate sont attentivement prélevés, rincés avec l'eau physiologique 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 au niveau du laboratoire de Centre du Pathologie Benbordi (CPB). Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, glutathion réduit, glutathion-s-transférase, catalase et MDA).

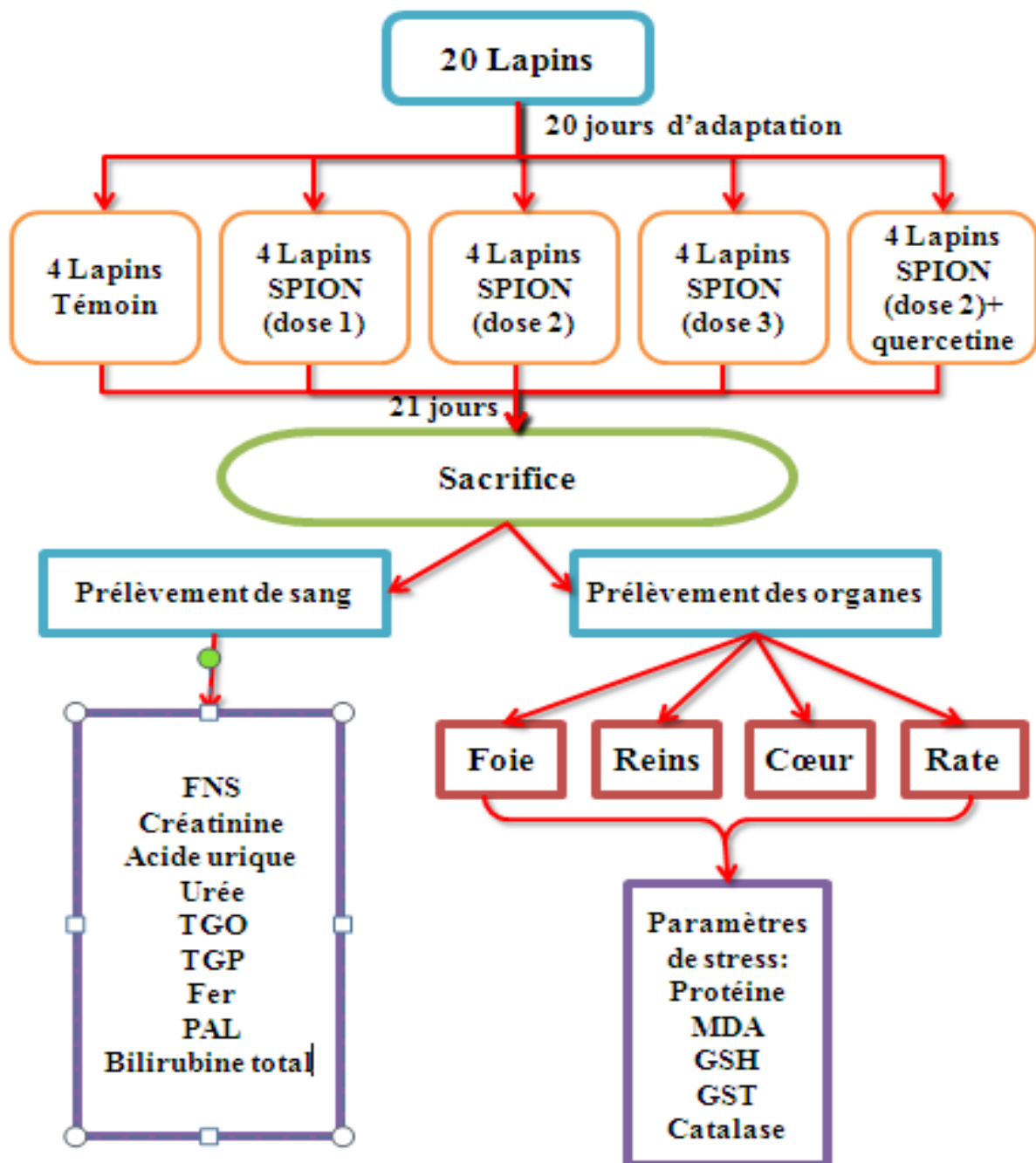


Figure 11: Protocol expérimentale de l'étude.

I.1.1.4. Réactifs et produits utilisés

- ✓ Nanoparticules d'oxyde de fer.
- ✓ Quercétine.
- ✓ Chlorure de sodium (NaCl).
- ✓ Méthanol, Bleu de Comassie.
- ✓ Acide phosphorique (H_3PO_4).
- ✓ Sérum bovin albumine (BSA).
- ✓ Acide trichloroacétique (TCA).
- ✓ Acide thiobarbiturique (TBA).
- ✓ butylhydroxytoluène (BHT).
- ✓ Chlorure d'hydrogène HCl.
- ✓ Tris.
- ✓ Acide salicylique.
- ✓ DTNB(5-5'-dithiobis2-nitrobenzoïque).
- ✓ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- ✓ GSH, acide sulfurique.
- ✓ CDNB (1chloro 2,4 di nitrobenzène).
- ✓ KH_2PO_4 .

Le kit de réactif de fer sérique, le kit de réactif de l'urée, le kit de réactif de créatinine, le kit de réactif de TGP, le kit de réactif de TGO, le kit de réactif de PAL.

I.1.1.5. Matériels de laboratoires

- ✓ Centrifugeuse horizontale de type SIGMA
- ✓ Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240
- ✓ Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800.
- ✓ 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
- ✓ Microtome
- ✓ Microscope optique avec appareil photo (camera)
- ✓ Micropipette
- ✓ Pipette graduée
- ✓ Hown

I.2. Méthodes

I.2.1. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique

I.2.1.1. Méthode de dosage de fer sérique

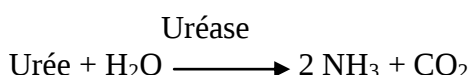
✓ Principe

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 *et al.*, 1977**).

I.2.1.2. 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 :

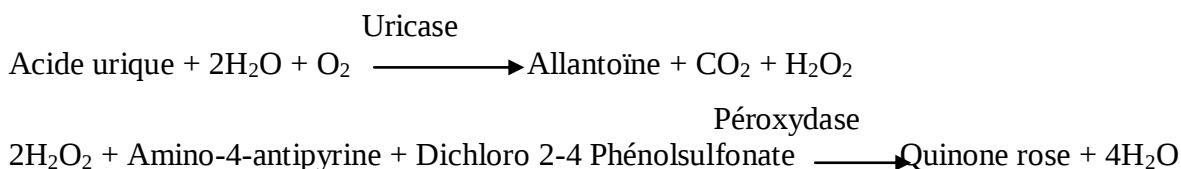


Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée (**Mac Key & Rackeyll, 1927**).

I.2.1.3. 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**):



I.2.1.4. 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).

I.2.1.5. Méthode de dosage de bilirubine total

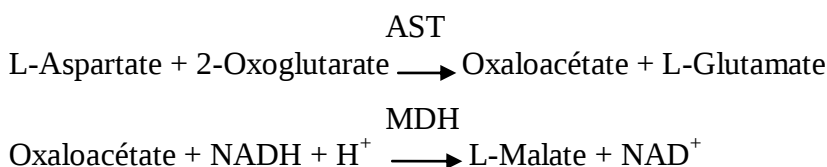
✓ Principe

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).

I.2.1.6. 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:

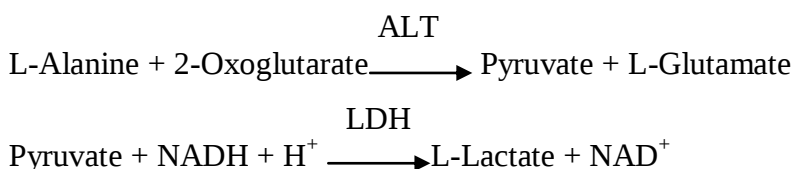


La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P₅P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (Henry *et al.*, 1960).

I.2.1.7. 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 :

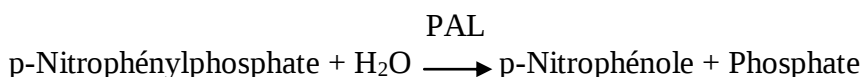


La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P₅P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (**Bergmeyer et al., 1978**).

I.2.1.8. 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 et al., 1993**).

I.2.2. 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, hématocrite et plaquettes.

I.2.3. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif

I.2.3.1. Préparation de l'homogénats des organes

Pour préparer l'homogénats, un gramme de tissu (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 lapin. L'homogénat est centrifugé à 3000 t/min pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré puis conservés à -20°C. Cette surnageant est utilisé pour le dosage des paramètres de stress oxydatif.

I.2.3.2. 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**).

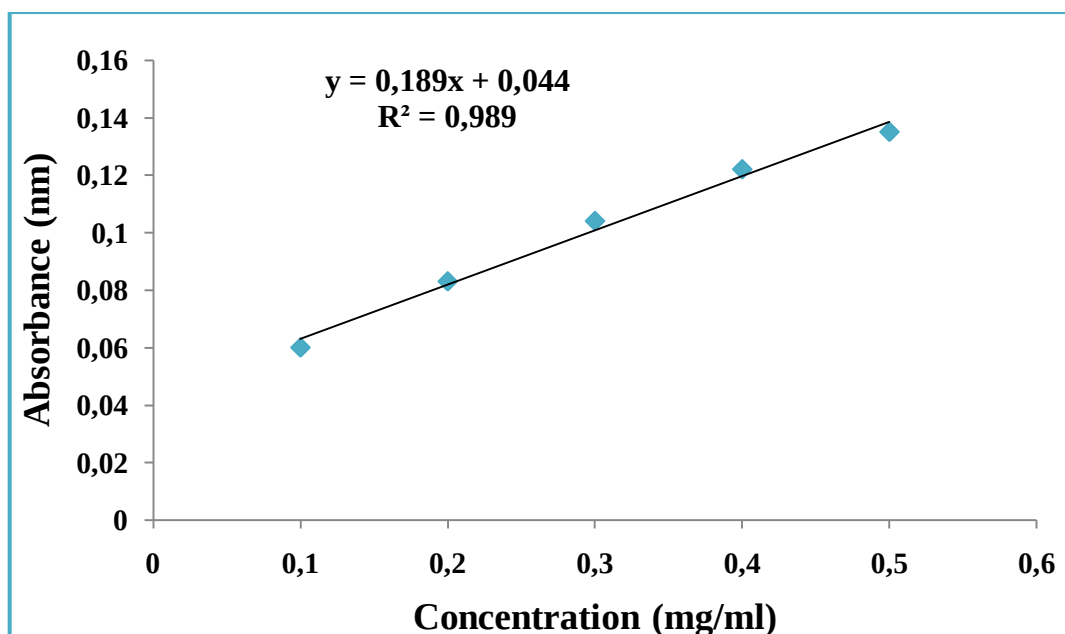


Figure12: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire.

I.2.3.3. Méthode de dosage des Malondialdéhyde (MDA) tissulaires

✓ 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, 100 µl 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 ($\epsilon = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol/l}$.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon} / 1.53 \times 10^5) / \text{mg de prot}$$

I.2.3.4. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaires

✓ Principe

Le glutathion a été déterminé suivant une méthode colorimétrique de **(Weckbercker & Cory, 1988)** par un spectrophotomètre, la mesure de la densité optique résulte de la formation de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique à partir de la réduction de l'acide dithio-bis-2-nitrobenzoïque ce qu'on appelle réactif de d'Ellman avec les groupements SH existant dans le GSH.

✓ Mode opératoire

- Peser 250mg de tissus hépatique.
- Broyer le tissu avec 10 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
- Prendre 0.8 ml de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) solution 2.
- Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minute dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 t/min pendant 5 minutes et le surnagent utiliser pour le dosage de glutathion comme suite.

✓ Mélangé

- 0.5 ml de surnagent.
- 1ml de solution tampon tris avec NaCl solution 1.
- 0.025 ml 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

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

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.

I.2.3.5. Méthode de mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs)

✓ Principe

La méthode utilisée 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.

✓ 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 :

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

I.2.3.7. Méthode de dosage de l'activité enzymatique du catalase

✓ Principe

Un mélange est constitué de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0.1 M, pH 7.2), 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 (**Clairborne, 1985**).

✓ **Calcule**

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

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

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

I.3. Méthode d'analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de quatre répétitions pour chaque groupe ($\pm$ l'écart type), 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 $\alpha < 0.05$ pour les analyses significatives des résultats, et pour les comparaisons des moyennes en utilisant logiciel **MINITAB** 13. Si $P < \alpha$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité.

Chapitre II

Résultats et discussion

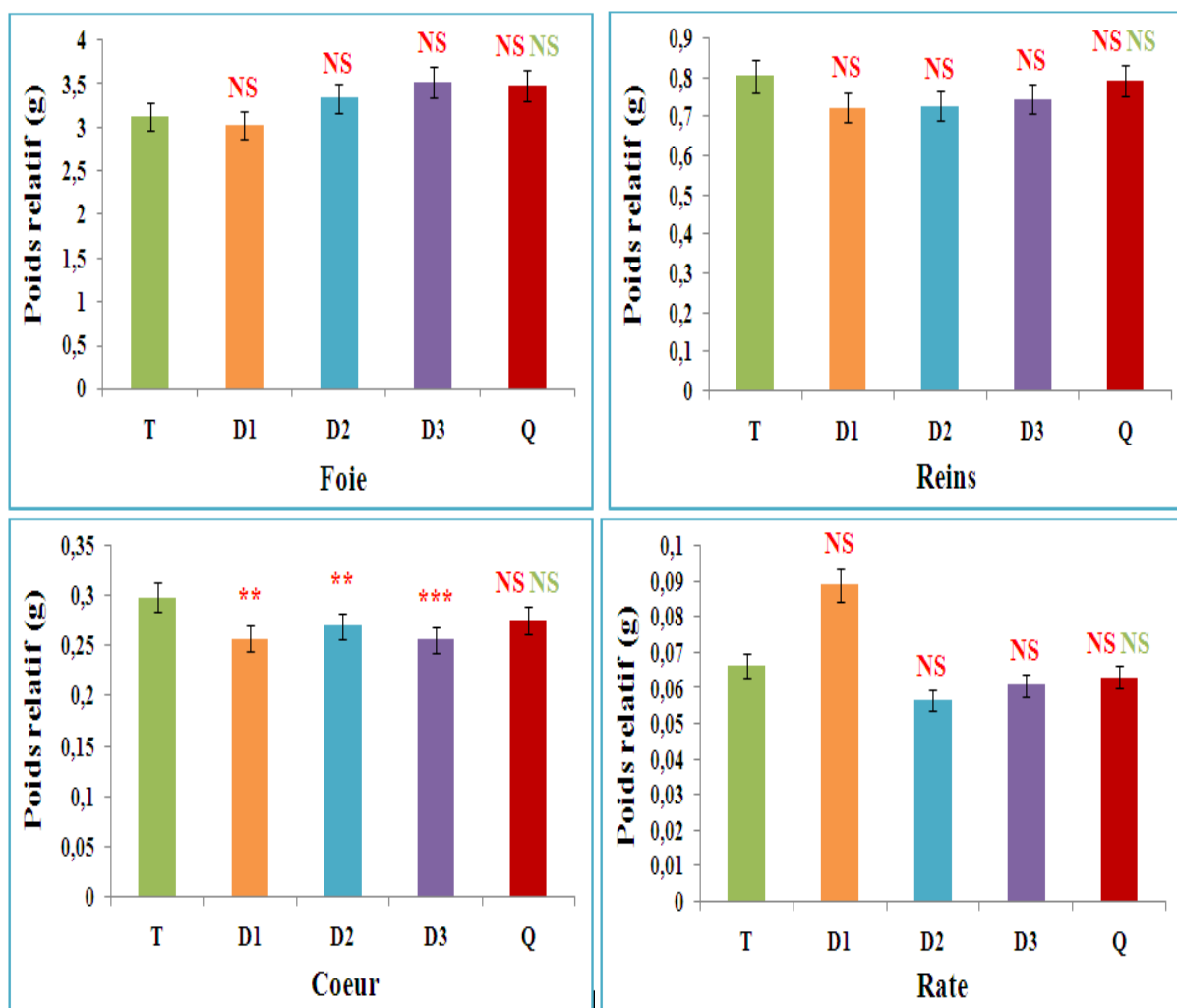
II.1. Résultats et interprétation

II.1.1. Poids relative des organes des lapins

Tableau 03: Poids relatif des organes (foie, cœur, reins et rate) chez le groupe témoin et les groupes traités.

Poids relatif (g)	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Foie	3,121±0,313	3,03±0,392 ^{NS}	3,335±0,864 ^{NS}	3,525±1,394 ^{NS}	3,482±0,354 ^{NS, NS}
Rein	0,804±0,248	0,7243±0,08 ^{NS}	0,728±0,151 ^{NS}	0,746±0,237 ^{NS}	0,793±0,164 ^{NS, NS}
Cœur	0,298±0,041	0,257±0,0248 ^{**}	0,269±0,0248 ^{**}	0,256±0,0202 ^{***}	0,275±0,029 ^{NS, NS}
Rate	0,066±0,018	0,089±0,0173 ^{NS}	0,056±0,0146 ^{NS}	0,0608±0,0196 ^{NS}	0,063±0,0201 ^{NS, NS}

Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

**Fig13:** Poids relatif des organes (foie, cœur, reins et rate) chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p<0.05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

Les résultats présentés dans le tableau 03 et la figure 13 ne montrent aucune différence significative entre les groupes dans le foie, les reins et la rate. Mais dans le cœur les résultats indiquent que le poids relatif diminue de façon hautement significative ($p < 0,01$) chez le groupe traité par la dose 1 (D1) et le groupe traité par dose 2 de SPION (D2), il aussi diminue de façon très hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe traité par dose 3 de SPION mais chez le groupe traité par dose 2 de SPION avec quercetine (Q), les résultats n'indiquent aucune variation significative ($p > 0,05$) ni par rapport au groupe témoin (T) ni par rapport au groupe traité par dose 2 de SPION (D2).

II.1.2. Evaluation des paramètres biochimiques sériques

Tableau 04: Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètre	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Fer sérique (mg/l)	2,179±0,766	2,935±0,578 [*]	3,37±0,73 [*]	3,62±0,375 ^{***}	1,938±1,129 ^{NS, β}
Bilirubine totale (μg/l)	10,43±2,644	4,845±1,934 [*]	5,357±0,94 ^{***}	3,938±0,777 ^{***}	9,698±1,715 ^{NS, γ}
Acide urique (mg/dl)	1,333±0,516	3,133±0,539 ^{***}	2,525±0,542 ^{***}	3,4±1,129 ^{***}	1,5±0,577 ^{NS, β}
Urée sérique (g/l)	0,24±0,0089	0,27±0,00894 [*]	0,275±0,0164 [*]	0,605±0,333 ^{**}	0,272±0,043 ^{NS, NS}
Créatinine (mg/l)	6,85±0,719	12,8±1,386 ^{**}	10,55±0,635 ^{**}	10,475±0,548 ^{**}	8±0,924 ^{NS, β}

Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^β $p < 0,01$; ^γ $p < 0,001$.

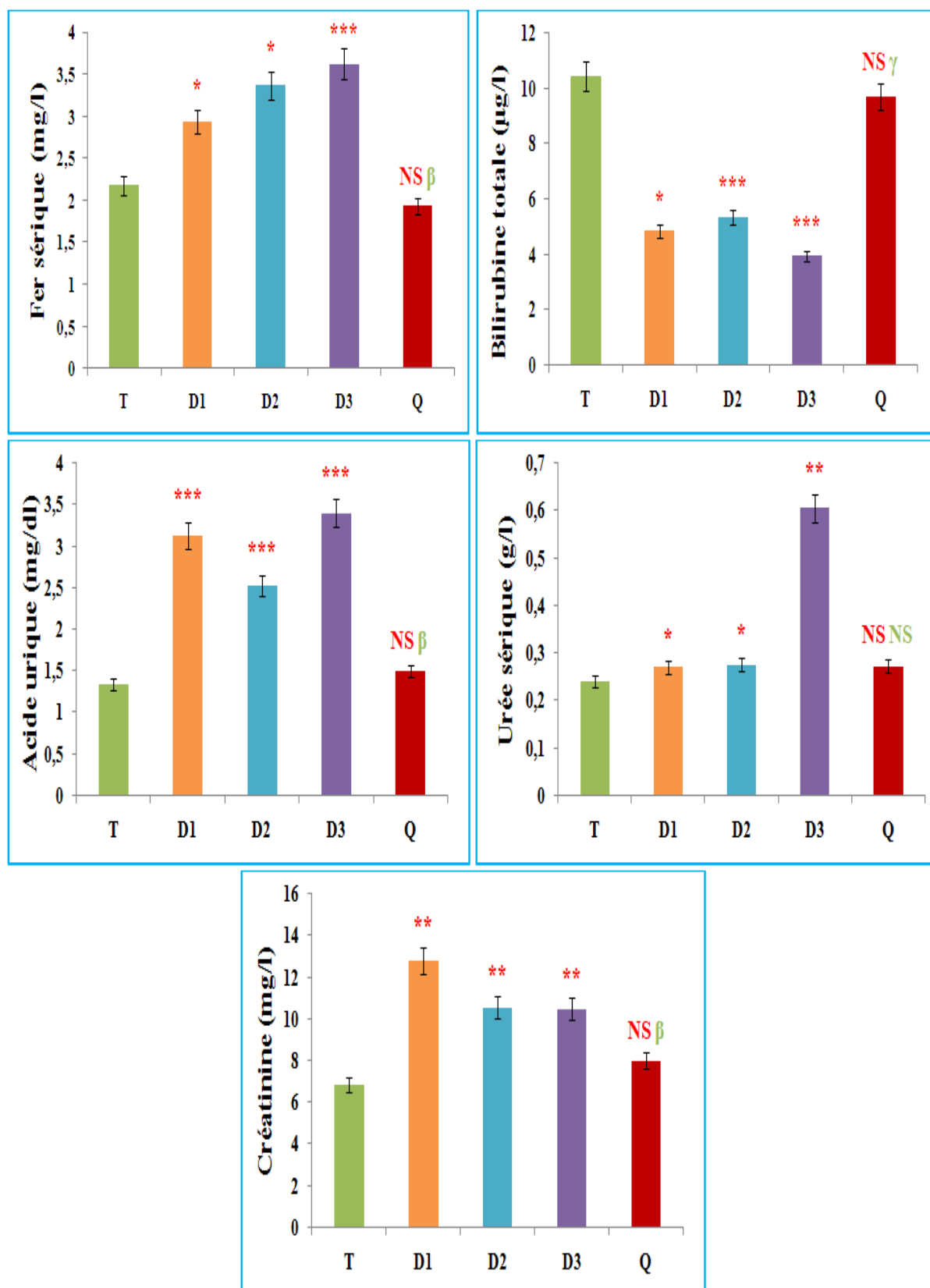


Fig14: Concentration sérique du fer, bilirubine totale, acide urique, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): β $p < 0.01$; γ $p < 0.001$.

Les résultats présentés dans le tableau 04 et figure 14 montrent que la concentration sérique de fer augmente de façon significative ($p < 0,05$) chez les groupes D1 et D2 et de façon très hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe D3 par rapport au témoin. D'autre part, nos résultats indiquent une diminution significative ($p < 0,05$) de concentration de bilirubine totale chez le groupe D1 et très hautement significative ($p < 0,001$) chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin (T).

Aussi, les résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) et très hautement significative ($p < 0,001$) respectivement de concentration de créatinine et de concentration d'acide urique chez les groupes D1, D2 et D3, mais pour l'urée l'augmentation est significative chez les groupes D1 et D2 et hautement significative chez le groupe D3 par rapport au témoin (T).

Cette étude ne montre aucune différence significative ($p > 0,05$) des paramètres biochimiques présentés au-dessus chez le groupe Q par rapport au témoin (T), mais par rapport au groupe D2, les résultats indiquent une augmentation très hautement significative ($p < 0,01$) de concentration de bilirubine totale, mais, ils montrent une diminution hautement significative ($p < 0,01$) de la concentration de fer, d'acide urique et de créatinine, mais pour urée cette étude n'indique aucune variation significative ($p > 0,05$).

Tableau 05: Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètre	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
TGO (U/l)	36±3,85	27,4±8,5 [*]	20,68±4,98 ^{***}	17,608±1,912 ^{***}	32,5±5,1 ^{NS, γ}
TGP (U/l)	32,5±0,577	27,26±14,66 ^{NS}	22,24±3,37 ^{***}	23,67±0,0462 ^{***}	37,75±8,7 ^{NS, γ}
PAL (U/l)	131,5±0,45	182,5±29,3 ^{**}	254,7±91,7 ^{**}	192,5±13,86 ^{**}	133±33,7 ^{NS, β}

Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^β $p < 0,01$; ^γ $p < 0,001$.

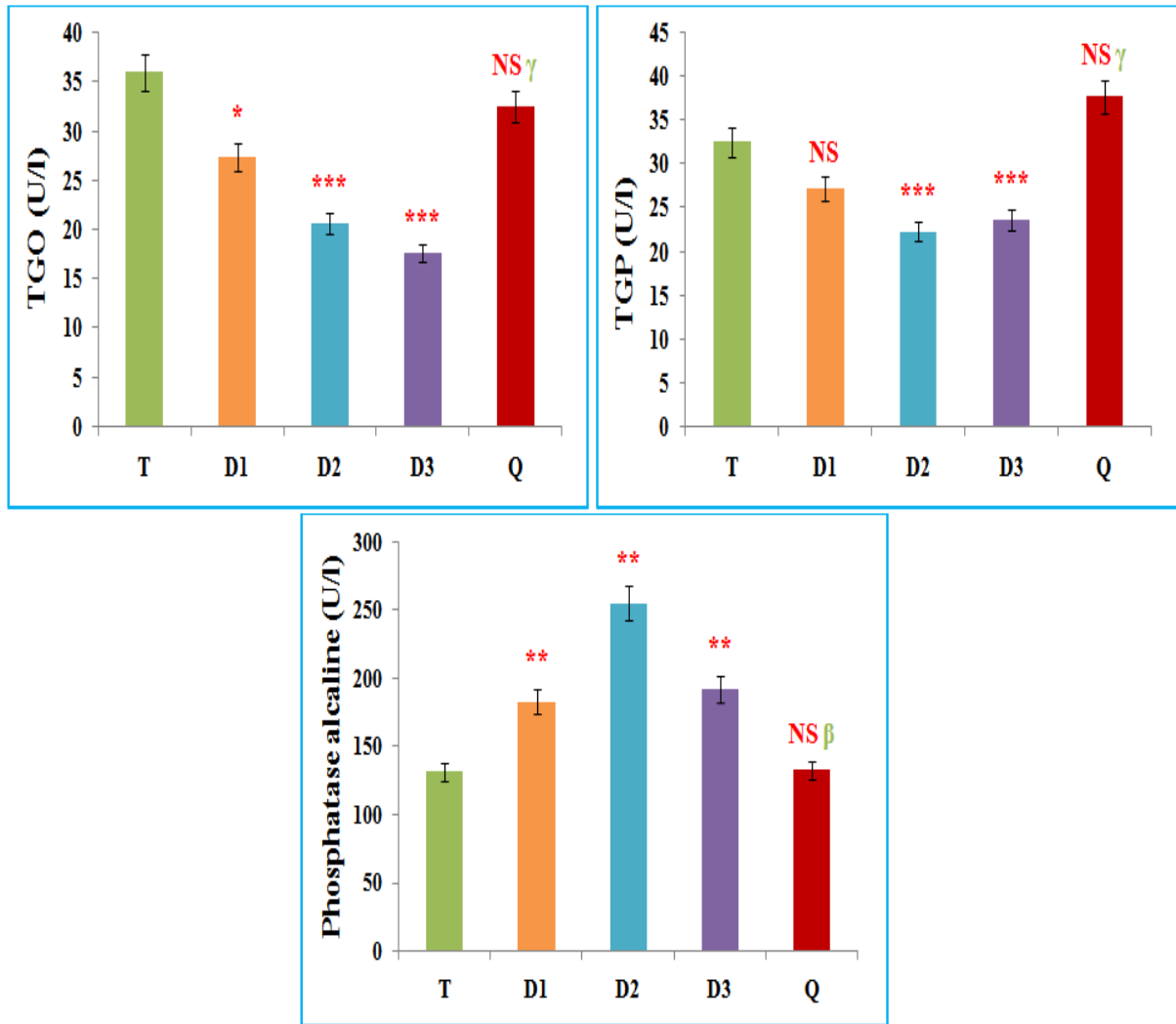


Fig15: Activité enzymatique de TGO, de TGP et de phosphatase alcaline chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, avec groupe D2: ^β $p < 0.01$; ^γ $p < 0.001$.

Chez le groupe D1, les résultats indiquent une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de TGO et non significative ($p > 0.05$) de l'activité de TGP par rapport au témoin. Aussi, l'activité de TGO et de TGP diminuent de façon très hautement significative ($p < 0.001$) chez les groupes D2 et D3, par contre l'activité de phosphatase alcaline augmente de façon hautement significative ($p < 0.01$) chez les groupes D1, D2 et D3 par rapport au témoin. D'autre part, les résultats n'indiquent aucune différence significative ($p > 0.05$) chez le groupe Q par rapport au témoin, mais par rapport au groupe D2, les résultats indiquent une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de TGO et de TGP et une diminution hautement significative ($p < 0.01$) de l'activité de phosphatase alcaline.

II.1.3. Evaluation des paramètres hématologiques

Tableau 06: Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités.

FNS	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Hémoglobine (g/dl)	10,55±0,588	10,425±0,1389 [*]	9,38±1,086 ^{**}	9,15±0,83 ^{**}	11,52±2,058 ^{NS, γ}
Globules rouges (x10 ³ /μl)	2,225±0,526	4,275±2,055 [*]	5,38±3,031 ^{**}	6,26±2,029 ^{***}	2,367±0,372 ^{NS, α}
Hématocrite (%)	34,05±1,949	29,4±2,182 ^{**}	27,825±2,64 ^{***}	27,47±2,79 ^{***}	35,58±4,54 ^{NS, γ}
Lymphocytes (x10 ³ /μl)	2,95±0,661	3,225±0,801 ^{NS}	3,975±0,896 [*]	4,4±1,117 [*]	2,933±0,539 ^{NS, α}
Monocytes (x10 ³ /μl)	1±0,2268	1,325±0,255 ^{**}	1,66±0,45 ^{**}	1,9±0,512 [*]	1,425±0,66 ^{NS, NS}
Plaquettes (x10 ³ /μl)	492,3±145,1	248,8±157,5 ^{**}	196,2±100,2 ^{***}	219,8±92 ^{***}	430±176,6 ^{NS, γ}

Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^αp < 0,05; ^γp < 0,001.

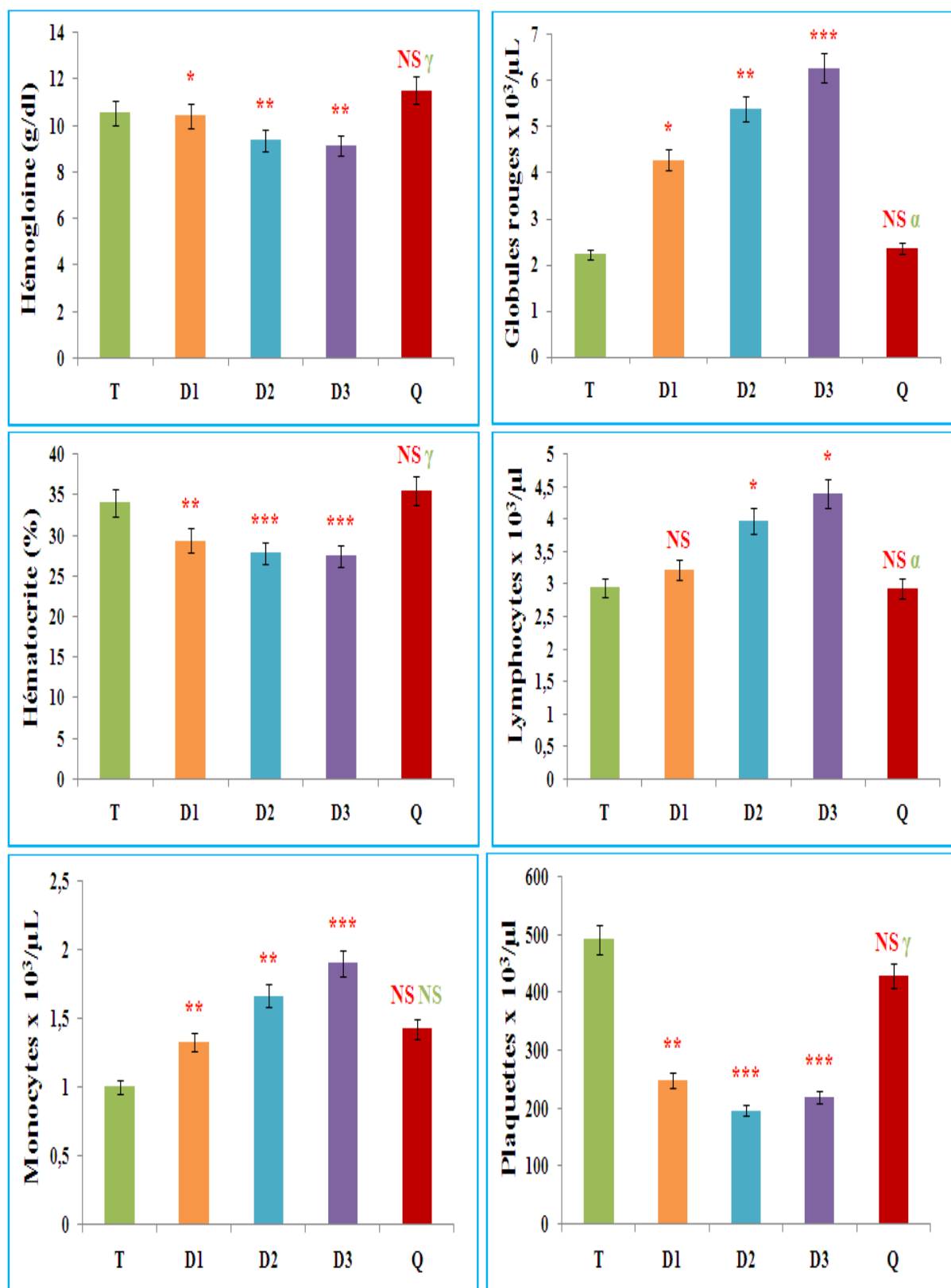


Fig16: Paramètres hématologiques chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^α $p < 0.05$; ^γ $p < 0.001$.

Les résultats présentés dans le tableau 06 et la figure 16 indiquent que la concentration d'hémoglobine diminue de façon significative ($p < 0,05$) chez le groupe D1 et de façon hautement significative chez les groupe D2 et D3. Ainsi, les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0,05$), hautement significative ($p < 0,01$) et très hautement significative ($p < 0,001$) de nombre des globules rouges respectivement chez le groupe (D1), le groupe (D2) et le groupe (D3) par rapport au témoin (T). Les résultats indiquent aussi que le pourcentage d'hématocrite et le nombre de plaquettes diminuent de façon hautement significative ($p < 0,01$) chez le groupe D1 et de façon très hautement significative ($p < 0,001$) chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin (T).

Les résultats n'indiquent aucune différence significative ($p > 0,05$) de nombre des lymphocytes chez le groupe D1, mais chez les groupe D2 et D3 ce nombre augmente de façon significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin (T). Pour le nombre des monocytes, nos résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) chez les groupes D1 et D2 et très hautement significative ($p < 0,001$) chez le groupe D3 par rapport au témoin. Par ailleurs, chez le groupe Q les résultats n'indiquent aucune différence significative ($p > 0,05$) par rapport au témoin, mais par rapport au groupe D2, les résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de concentration d'hémoglobine, de pourcentage d'hématocrite et de nombre de plaquettes et une diminution hautement significative ($p > 0,05$) de nombre des globules rouges et des lymphocytes, mais pour le nombre des monocytes la diminution est non significative.

II.1.4. Evaluation des paramètres de stress oxydant

II.1.4.1. Concentrations de malondialdéhyde (MDA) tissulaires

Tableau 07: Concentrations tissulaires de malondialdéhyde (MDA) (en $\mu\text{mol/mg}$ de protéine) chez le groupe témoin et les groupes Traités.

MDA	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Foie	0,157±0,081	0,244±0,028**	0,2306±0,013***	0,326±0,039***	0,186±0,065 ^{NS,β}
Reins	0,194±0,123	0,489±0,668 ^{NS}	0,342±0,2102 ^{NS}	0,711±0,635*	0,203±0,1305 ^{NS, NS}
Cœur	0,073±0,031	0,239±0,099**	0,159±0,0326**	0,185±0,073**	0,117±0,049 ^{*,β}
Rate	1,057±0,255	1,172±0,691 ^{NS}	1,354±0,326 ^{NS}	1,1606±0,085*	1,053±0,261 ^{NS, NS}

Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^β $p < 0,01$.

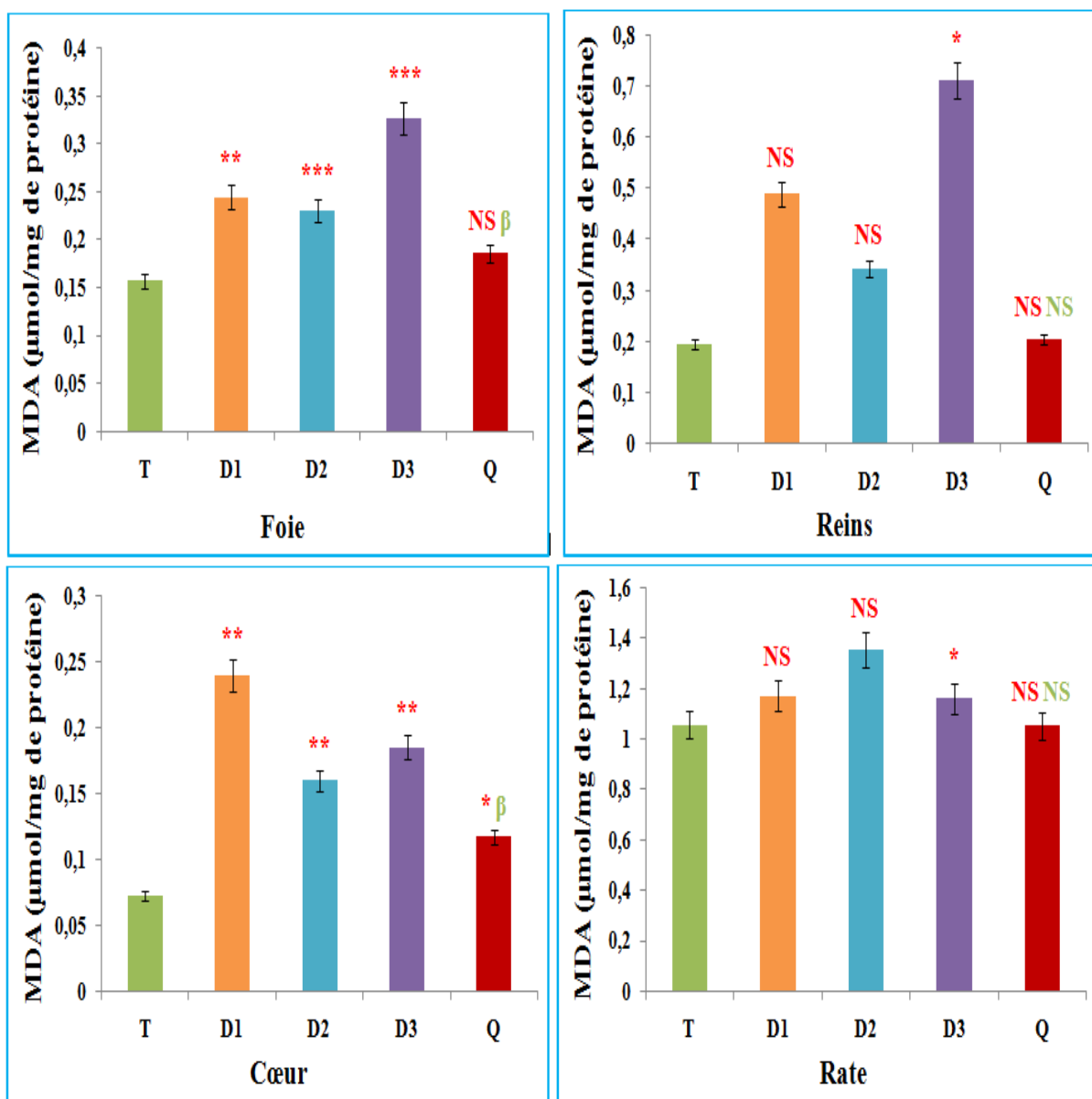


Fig17: Concentrations tissulaires de malondialdéhyde (MDA) chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): β $p < 0,01$.

Les résultats présentés dans le tableau 07 et la figure 17 montrent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) de concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) dans le foie et le cœur chez le groupe D1 par rapport au groupe témoin (T). D'autre par, ils montrent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) et une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) de concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) respectivement dans le cœur et le foie chez le groupe D2 et le groupe D3 de SPION par rapport au groupe témoin (T).

Par contre, les résultats indiquent une augmentation non significative ($p > 0,05$) de concentrations tissulaires de MDA dans les reins et la rate chez le groupe D1 et le groupe D2

de SPION par rapport au groupe témoin (T). Aussi, les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) de concentrations tissulaires de MDA dans les reins et la rate chez le groupe D3 et dans le cœur chez le Q par rapport au groupe témoin (T).

Nos résultats indiquent aussi une augmentation non significative ($p > 0,05$) de concentrations tissulaires de MDA dans le foie, les reins et la rate chez le groupe Q par rapport au groupe témoin (T), mais par rapport au groupe D2 les résultats indiquent une diminution hautement significative ($p < 0,01$) dans le foie et le cœur et une diminution non significative ($p > 0,05$) dans les reins et la rate.

II.1.4.2. Concentrations de glutathion réduit (GSH) tissulaires

Tableau 08: Concentrations de glutathion réduit (GSH) (en nM/mg de protéine) tissulaires chez le groupe témoin et les groupes traités.

GSH	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Foie	0,029±0,0089	0,034±0,019 ^{NS}	0,0247±0,0035 [*]	0,0242±0,0094 [*]	0,0416±0,029 ^{NS, β}
Reins	0,036±0,035	0,119±0,185 ^{NS}	0,0956±0,089 ^{NS}	0,124±0,131 [*]	0,0421±0,024 ^{NS, NS}
Cœur	0,0204±0,012	0,0305±0,017 ^{NS}	0,0283±0,0042 [*]	0,0516±0,035 ^{**}	0,0266±0,012 ^{NS, NS}
Rate	0,106±0,0392	0,129±0,077 ^{NS}	0,103±0,0153 ^{NS}	0,127±0,0285 [*]	0,109±0,0506 ^{NS, NS}

Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^β $p < 0,01$.

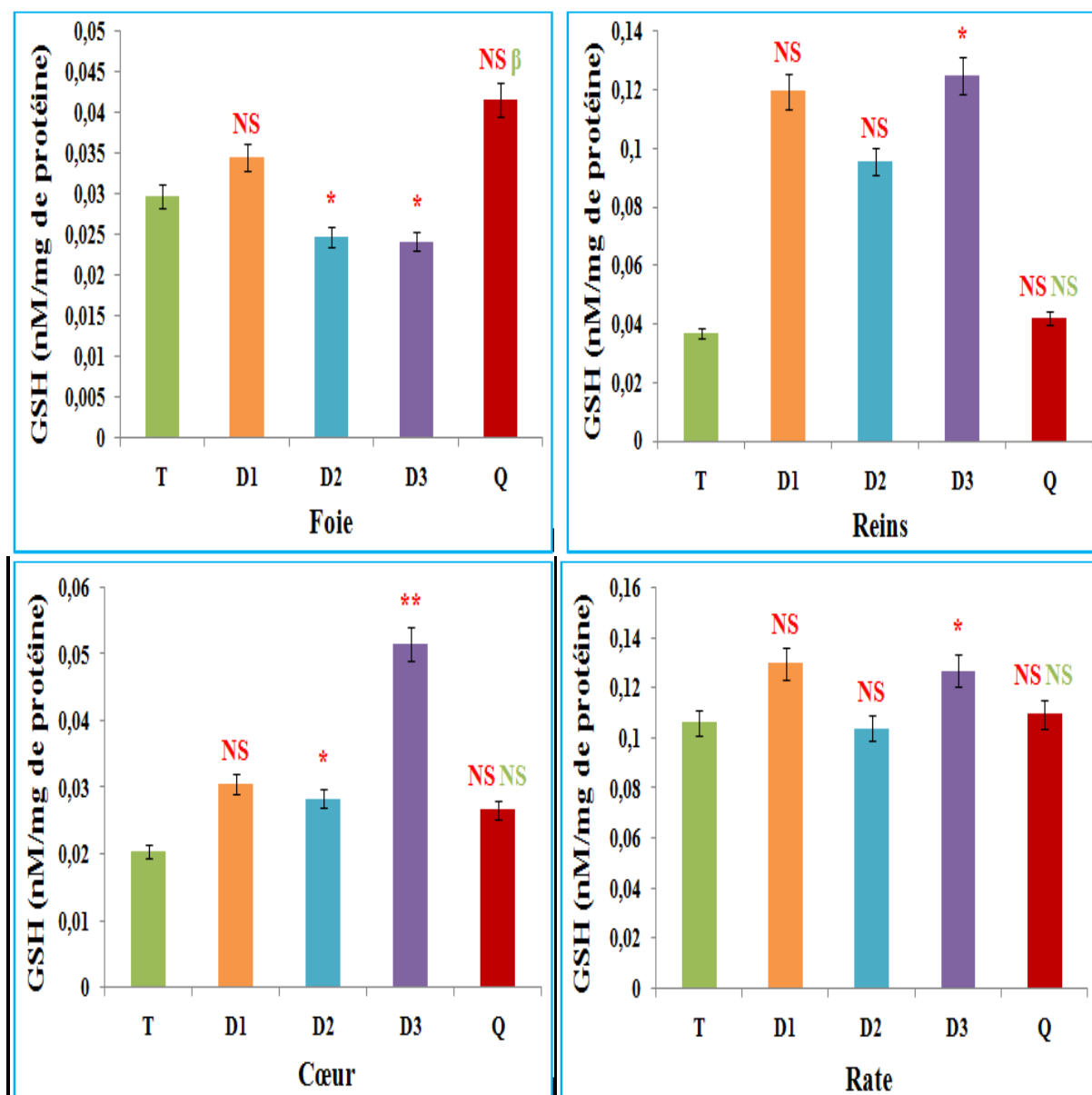


Fig18: Concentrations de glutathion réduit (GSH) tissulaires chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): $\beta p < 0,01$.

Les résultats présentés dans le tableau 08 et la figure 18 montrent une augmentation non significative ($p > 0,05$) de la concentration de glutathion réduit (GSH) tissulaires dans le foie, les reins, le cœur et la rate chez le groupe traité D1 et le groupe Q par rapport au groupe témoin (T). Chez le groupe D2, les résultats indiquent une augmentation significative ($p < 0,05$) et non significative ($p > 0,05$) de la concentration de GSH tissulaires respectivement dans le cœur et dans les reins, par contre, ils indiquent une diminution significative ($p < 0,05$) et non significative ($p > 0,05$) de la concentration de GSH tissulaires respectivement dans le foie et dans la rate par rapport au groupe témoin (T).

Aussi, les résultats indiquent une augmentation significative ($p < 0,05$) de la concentration de glutathion réduit (GSH) tissulaires dans les reins et la rate, une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) dans le cœur, mais une diminution significative ($p < 0,05$) dans le foie chez le groupe D3 par rapport au groupe témoin (T). D'autre par, les résultats indiquent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) et non significative ($p > 0,05$) de la concentration de GSH tissulaires respectivement dans le foie et la rate, mais une diminution non significative ($p > 0,05$) dans le cœur et les reins chez le groupe Q par rapport au groupe D2.

II.1.4.3. Activité tissulaires de glutathion - S - transférase (GST)

Tableau 09: Activités tissulaires de glutathion - S - transférase (GST) (nmol GST/min/mg protéine) chez le groupe témoin et les groupes traités.

GST	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Foie	1,1788±0,1249	2,542±1,784 ^{NS}	3,305±1,926 [*]	5,4±5,15 [*]	1,805±0,709 ^{*,NS}
Reins	8,77±3,87	0,908±0,408 ^{***}	3,417±1,906 ^{***}	2,473±1,628 ^{***}	5,13±4,16 ^{*,NS}
Cœur	2,495±1,822	3,848±2,169 ^{NS}	2,68±1,434 ^{NS}	5,445±2,33 [*]	2,794±0,298 ^{NS,NS}
Rate	8,8±3,14	5,736±0,513 [*]	5,75±4,54 [*]	7,393±1,441 [*]	9,02±5,19 ^{NS, ^a}

Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^a $p < 0,05$.

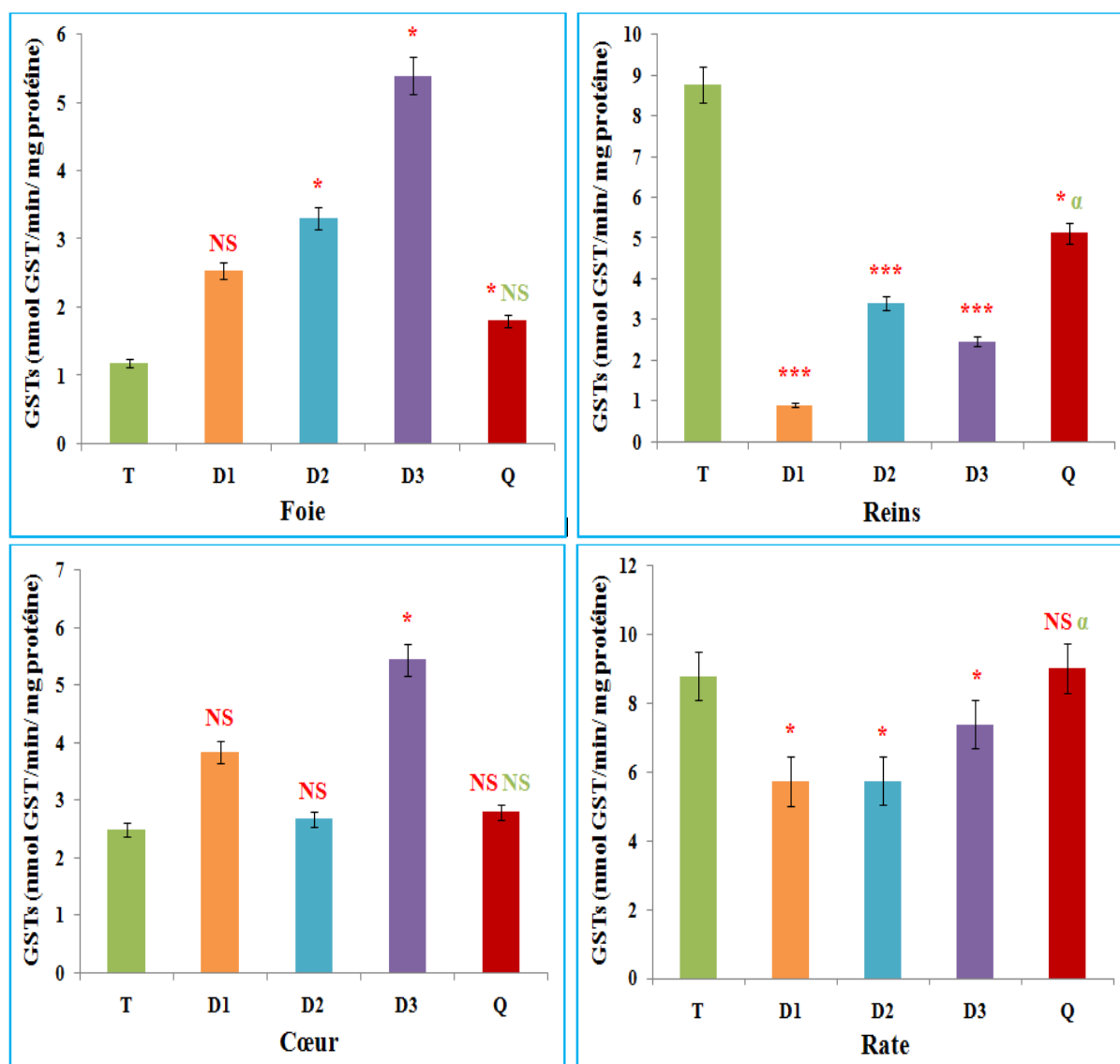


Fig19: Activités tissulaires de glutathion -S - transférase (GST) chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^a $p < 0.05$.

Les résultats présentés dans le tableau 09 et la figure 19 montrent que l'activité tissulaire de GST diminue de façon très hautement significative ($p < 0,001$) et de façon significative ($p < 0,05$) respectivement dans les reins et dans la rate chez les groupes D1, D2 et D3 par rapport au groupe témoin (T). D'autre part, l'activité tissulaire de GST augmente de façon non significative ($p > 0,05$) chez le groupe D1 dans le foie et le cœur, chez le groupe D2 dans le cœur et chez le groupe Q dans le cœur et la rate par rapport au groupe témoin (T).

Aussi pour le groupe Q, les résultats indiquent que l'activité tissulaire de GST diminue de façon significative ($p < 0,05$) dans les reins par rapport au témoin, mais par rapport au groupe D2, il augmente de façon significative ($p < 0,05$) dans les reins et la rate et il ne varie pas significativement ($p > 0,05$) dans le cœur et le foie.

II.1.4.4. Activité tissulaires de catalase

Tableau 10: Activités tissulaires de catalase (en UI/g) chez le groupe témoin et les groupes traités.

Catalase	T	D1	D2	D3	Q
	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es	Moy±Es
Foie	24,12±13,14	37,6±42,7 ^{NS}	23,31±13,29 ^{NS}	19,42±13,53 ^{NS}	25,57±11,84 ^{NS, NS}
Reins	40,7±29,8	32,9±50,1 ^{NS}	75,5±37,8 [*]	95±57 [*]	27,98±22,96 ^{NS, β}
Cœur	11,12±5,05	12,827±0,722 [*]	17,11±5,08 ^{**}	17,07±4,03 ^{**}	15,32±8,47 ^{NS, NS}
Rate	100,32±17,92	101,9±91,4 ^{NS}	113,5±49,6 ^{NS}	116,5±32,3 ^{NS}	81,5±36,3 ^{NS, NS}

Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0,05; ** p < 0,01, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^βp < 0,01.

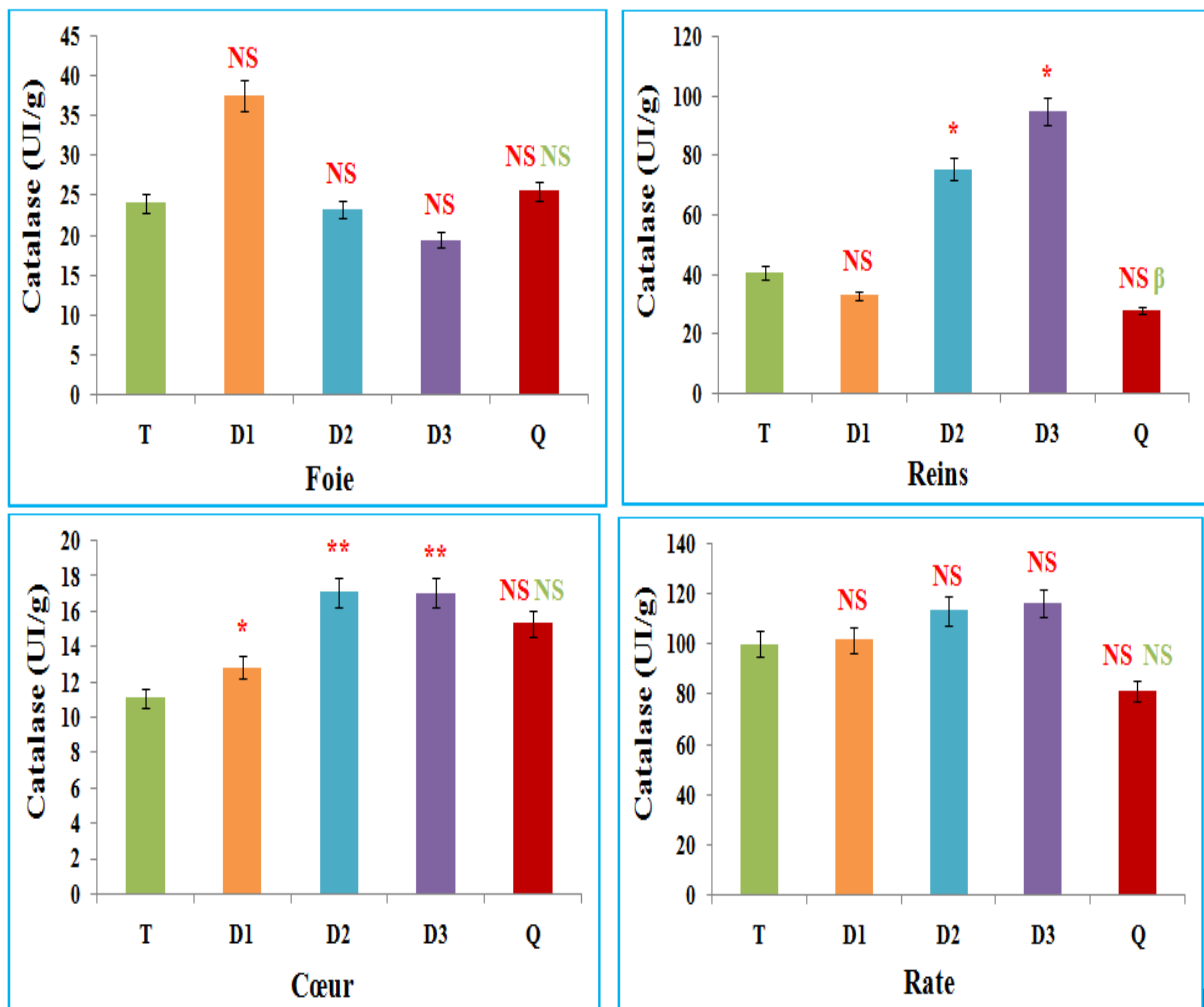


Fig20: Activités tissulaires de catalase chez le groupe témoin et les groupes traités. Comparaison avec groupe témoin (T): * p < 0,05; ** p < 0,01, avec groupe traité par la 2^{ème} dose de SPION (D2): ^βp < 0,01.

Les résultats présentés dans le tableau 10 et la figure 20 ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de catalase dans le foie et dans la rate chez tous les groupes, chez les groupe D1 et Q dans les reins mais seulement chez le groupe Q dans le cœur par rapport au groupe témoin (T).

Aussi, les résultats montrent que l'activité tissulaire de catalase augmente de façon significative ($p<0,05$) dans les reins chez les groupes D2 et D3 et chez le groupe D1 dans le cœur par rapport au groupe témoin (T), et de façon hautement significative ($p<0,01$) dans le cœur chez le groupe D2 et D3 de SPION par rapport au groupe témoin (T).

Ainsi, chez le groupe Q, les résultats ne montrent aucune différence significative ($p>0,05$) de l'activité tissulaire de catalase dans le foie, le cœur et dans la rate mais cette activité diminue de façon hautement significative ($p<0,01$) dans les reins par rapport au groupe D2.

II.2. Discussion

Les nanomatériaux ont été de plus en plus appliqués pour différents buts de la technologie et la médecine, en raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques (**Szalay et al., 2012**). Parmi les nanoparticules les plus prometteurs ; les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (de SPIONs) qui sont les seules nanoparticules magnétiques qui ont été approuvés pour une utilisation clinique à ce jour (**Lei et al., 2013**). Malgré la large gamme d'applications, il ya un grave manque d'informations sur l'impact des nanoparticules sur la santé humaine et l'environnement (**Oberdörster et al., 2004**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer et de valider l'effet antidote de quercétine chez les lapins.

Les résultats obtenus n'indiquent aucune variation significative de poids relatif de foie, des reins et de rate, mais ils indiquent une diminution hautement significative de poids relatif de cœur chez les groupes D1 et D2 et très hautement significative chez le groupe D3 par rapport au témoin. Aussi, l'étude de **Szalay et al. (2011)** n'indique aucune variation significative de poids relatif de foie, de rein, de cœur et de la rate. D'autre part, on peut expliquer la diminution du poids relatif du cœur par l'effet de stress oxydative d'oxyder les protéines et les lipides de cœur (**Dennis et al., 2013**).

Nos résultats montrent que la concentration de fer sérique est augmentée de façon significative chez les groupes D1 et D2 et de façon très hautement significative chez le groupe D3 par rapport au témoin. Ce résultat est en accord avec l'étude de **Babadi et al. (2012)**, qui montre que l'exposition à SPION provoque une surcharge en fer dans l'organisme après un traitement avec Fe_2O_3 avec différentes concentrations à 20, 50 et 150 $\mu\text{g/kg}$ de poids corporel pendant 15 jours par voie oral chez des rats Wistar. D'après **Elias & Tsourkas (2009)**, le SPION peut induire une surcharge en fer qui a des conséquences toxiques plus que l'accumulation excessive des SPION. Lorsque le SPION administré par voie oral, il est probablement dégradé en ions de fer sous l'action des enzymes lysosomale à faible pH dans l'estomac (**Singh et al., 2010**). Dans l'état normal, l'absorption des ions de fer, qui se passe dans le duodénum, est contrôlée par un mécanisme de régulation qui maintient l'homéostasie de fer dans l'organisme (**Zhang et al., 2015**). 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 (**Chyka & Banner, 2004**). L'absorption massive peut augmenter la quantité de fer dans l'organisme, par ce qu'il n'y a pas un mécanisme physiologique efficace pour excréter l'excès de fer (**Raghupathy et al., 2010**).

En outre, notre étude montre une diminution significative de la concentration de l'hémoglobine chez le groupe D1 et hautement significative chez le groupe D2 et D3 par rapport au témoin. ALA synthase catalyse la synthèse de l'acide D-aminolévulinique (ALA), le premier précurseur commun dans la biosynthèse de l'hème. Il peut être considéré comme l'enzyme contrôlant la vitesse de biosynthèse de l'hème dans la plupart des circonstances (**Herbert et al., 1979**). La surcharge en fer chez le rat, quelle que soit la voie de sa demande, a entraîné une augmentation non seulement de fer, mais aussi du zinc et du manganèse dans le foie et la rate. L'augmentation du zinc et du manganèse dans le foie et la rate suite à une surcharge en fer était probablement un résultat non seulement de l'augmentation de l'absorption intestinale, mais aussi de l'augmentation de l'absorption à partir de la cellule (**Vayenas et al., 1998**). D'autre part, le zinc réduit l'activité d'ALA synthase (**Cable et al., 1993**) et donc diminue la synthèse de l'hème.

Nos résultats montrent aussi une diminution hautement significative de pourcentage d'hématocrite chez le groupe D1 et très hautement significative chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin. La diminution d'hématocrite et d'hémoglobine peut signifier la présence d'une anémie hypochrome microcytaire. Ce type d'anémie, connue par son petit, pâle globule rouge car, un défaut de la production de globules rouges donne des globules rouges défectueuses (**Insel et al., 2011**). Aussi un déficit de vitamine B6 peut induire une anémie microcytaire (**McGuire & Beerman, 2013**).

Nos résultats indiquent aussi une augmentation de globule rouge de façon significative, hautement significative et très hautement significative respectivement chez le groupe D1, D2 et D3. Chez les animaux de laboratoire, une baisse du rapport hématocrite/concentration d'hémoglobine induit une augmentation modérée de niveau de l'érythropoïétine. En outre, si la concentration d'hémoglobine diminue, les taux d'érythropoïétine commencent à augmenter exponentiellement (**Alpern et al., 2013**). Donc, EPO induit une augmentation des globules rouges en stimulant la formation et la différenciation des cellules précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse (**Scholz et al., 1990**).

D'autre part, et selon l'étude de **Pretorius et al. (2014)**, les concentrations sériques exceptionnellement élevées de ferritine amènent les globules rouges à une morphologie anormale, peut-être le stress oxydatif causé par l'excès de fer provoque une perturbation de l'érythropoïèse, ce qui donne des globules rouges morphologiquement anormaux.

Les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative des plaquettes chez le groupe D1 et très hautement significative chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin. Selon l'étude de **Park et al. (2013)**, le nombre des plaquettes inversement corrélée

avec le fer sérique et la transferrine. Peut être parce que le fer peut diminuer mégacaryopoïèse. La mégacaryopoïèse est le système de production et de régulation de la production des plaquettes. Donc la diminution des plaquettes à cause de la diminution de mégacaryopoïèse par l'excès de fer. Autre cause qui peut induire la diminution de nombre des plaquettes est via le stress oxydatif, qui peut causer par l'excès de fer, 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.

Notre étude montre ainsi une diminution significative de l'activité de TGO chez le groupe D1 et très hautement significative chez les groupes D2 et D3, mais l'activité de TGP diminue de façon non significative chez le groupe D1 et de façon très hautement significative chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Lijuan et al. (2010)** qui indiquent que l'activité de TGO et de TGP diminue chez les rats traités par des nanoparticules d'oxyde ferrique. L'examen histologique de cette étude montre que les nanoparticules d'oxyde ferrique ont causé de graves dommages dans les tissus du foie et du poumon. Bien que ces dégâts aient progressé tant dans le foie et les poumons durant la période de post-exposition, aucune augmentation significative de l'activité des enzymes sériques n'a été observée en réponse à l'exposition aux nanoparticules.

On peut expliquer cette diminution par le niveau faible de vitamine B6 induit par la surcharge en fer (**Claster et al., 2009**). Les faibles niveaux de TGO et TGP sont en partie dus à une carence en pyridoxal phosphate, la forme active de vitamine B6, qui sert de coenzyme pour ces transaminases (**Ono et al., 1995**).

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative de l'activité de phosphatase alcaline chez les groupes D1, D2 et D3 par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Lin & Adams (1991)** qui indique que l'excès de fer induit une augmentation de l'activité de PAL.

Les élévations de l'activité de phosphatase alcaline sérique proviennent essentiellement de deux sources soit le foie soit les os. Le dommage du foie induit une augmentation de l'activité de phosphatase alcaline (**Pratt & Kaplan, 2000**). Peut-être parce que les cellules hépatiques endommagées développent des membranes qui fuient, ce qui permet l'évasion d'enzymes intracellulaires dans la circulation sanguine (**Babadi et al., 2012**). L'augmentation de zinc produite par la surcharge en fer (**Vayenas et al., 1998**) peut augmenter l'activité de phosphatase alcaline, car le zinc fait partie intégrante de la phosphatase alcaline et agit comme coenzyme (**Picon, 1992**).

D'après nos résultats, la concentration de la bilirubine totale diminue de façon significative chez le groupe D1 et de façon très hautement significative chez les groupes D2 et D3 par rapport au témoin. La bilirubine est un métabolite final du catabolisme oxydatif de l'hème et elle résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales (**Haleng et al., 2007**). Hème oxygénase (HO) est l'enzyme qui dégrade l'hème pour produire le monoxyde de carbone, le fer et la biliverdine. La biliverdine est rapidement convertie en bilirubine par la biliverdine réductase (**Vaishnav et al., 2015**). Donc une diminution de taux de l'hémoglobine induit une diminution de taux de bilirubine totale (**Herbert et al., 1979**).

Notre étude indique une augmentation très hautement significative de concentration d'acide urique et hautement significative de concentration de créatinine chez les groupes D1, D2 et D3, mais la concentration d'urée augmente de façon significative chez le groupes D1 et D2 et de façon hautement significative chez le groupe D3 par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude de **Barbosa et al. (2013)** qui montrent qu'une surcharge en fer induit une augmentation de taux d'acide urique, de créatinine et d'urée.

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. Le mécanisme physiologique qui reliant l'acide urique élevé à ferritine élevée est actuellement incertaine. L'acide urique est associé à l'inflammation, mais il fonctionne également comme un puissant endogène antioxydant. Cependant, cette théorie ne soit pas étayée par une preuve. Jusqu'au moment, 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 responsable de ce métabolisme est la créatine kinase (CK) qui catalyse la réaction réversible de la formation de phosphocréatine à partir créatine et ATP. Le phosphocréatine ensuite se dégrade pour donner créatinine (**McLeish & Kenyon, 2006**). Comme nous l'avons mentionné plus tôt, la surcharge de fer entraîne une augmentation de taux de zinc, et d'autre part, l'étude de **Tong et al. (2000)** indique que le zinc peut induit une augmentation de l'activité de CK, ce qui probablement augmente la concentration de créatinine.

D'autre part, l'augmentation de la concentration de l'urée est probablement associée à une augmentation de la dégradation des protéines. De même, les niveaux anormalement élevés de créatinine sérique et de l'urée étaient compatibles avec la fonction rénale altérée, (**Almeida et al., 2012**) car l'excès de fer conduit à un stockage intralysosomal du fer dans les

reins (**Dimitriou et al., 2000**). La surcharge en fer peut provoquer un stress oxydative (**Lei et al., 2013**) qui peut affecter à la fois les cellules rénales endothéliales et épithéliales conduisant à une dysfonction rénale (**Schetz et al., 2010**).

Notre étude indique une augmentation hautement significative des monocytes chez les groupes D1 et D2 et très hautement significative chez le groupe D3, aussi, elle indique une augmentation significative des lymphocytes chez les groupes D2 et D3, mais chez le groupe D1, elle n'indique aucune différence significative par rapport au témoin. Ces résultats montrent la présence d'une inflammation. L'inflammation est une réponse physiologique protectrice qui est généralement étroitement contrôlée par le corps au niveau du site de lésion (**Closa & Folch-Puy, 2004**). Mais, dans notre étude l'inflammation est une réponse de l'état de stress oxydative induit par le fer. Le mécanisme d'induire l'inflammation par le stress est via activation des facteurs de transcription qui régulent les gènes pro-inflammatoires.

La génération de cytokines est jouée un rôle majeur pour induire des réponses inflammatoires (**Gogos et al., 2000**). Un régulateur clé de l'induction de cytokines est le facteur nucléaire κB (NF- κB). Ce facteur constitue une famille de protéines qui se lie à l'ADN à activer la synthèse des cytokines. NF- κB est présent dans le cytoplasme couplé à une protéine inhibitrice (I κB) qui bloque la translocation de NF- κB vers le noyau. Sous un certain nombre de stimuli, I κB devient phosphorylée et dégradée permettant la translocation de NF- κB vers le noyau pour déclencher la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Les radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent activer NF- κB (**Adcock et al., 1994**).

D'autres facteurs de transcription qui régulent les gènes pro-inflammatoires sont également activés par le stress oxydant. Phosphorylation de la famille de MAP kinases, y compris ERK, JNK et p38 kinase, peut être induite par des radicaux libres d'oxygène. Par la suite, ces kinases conduisent à l'activation des facteurs de transcription qui régulent la synthèse de gènes pro-inflammatoires (**Griendling et al., 2000**). En outre, l'activation des MAP kinases pourrait réguler l'expression de gènes différents par leur effet sur l'acétylation/phosphorylation de des histones. A cet égard, il a été rapporté que l'acétylation des histones joue un rôle dans l'expression des gènes de l'IL-8 et IL-6 (**Vanden Berghe et al., 1999**).

En outre, les LDL oxydées formées par l'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes peuvent induire la génération de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Aussi, les LDL oxydées sont immunogènes et les complexes formés peuvent activer la voie classique du complément (**Haleng et al., 2007**).

Mais, des études montrent que l'excès de fer peut perturber le fonctionnement normal des cellules immunitaires. La surcharge en fer peut être induite par une déficience fonctionnelle des monocytes et des granulocytes, et l'excès de fer disponible peut stimuler la croissance bactérienne. Des études montrent des fonctions phagocytaires anormales à cause de la surcharge en fer incluant des diminutions significatives dans la phagocytose des *Staphylococcus albicans* par polynucléaire (PMN), diminution de l'activité bactéricide de monocyte (MN), et une diminution de la réactivité moyenne chimiotactique des leucocytes (Walker & Walker, 2000).

Aussi, l'excès de fer peut induire des changements dans les sous-ensembles lymphoïdes. Des nombreuses études, réalisées principalement sur des lymphocytes du sang périphérique (PBL) ont montré des changements dans les sous-ensembles de lymphocytes T et de leur statut fonctionnel à l'excès de fer (Porto *et al.*, 1997). Le résultat le plus constant est celui d'une diminution des cellules T CD8⁺ dans le sang périphérique, ce qui entraîne une augmentation dans le rapport CD4/CD8. D'autres anomalies des lymphocytes CD8⁺ ont été observées, y compris une réduction de l'activité cytotoxique. La présence d'un rapport CD4/CD8 élevé est en corrélation avec la gravité de la surcharge en fer, et le degré de fibrose. Une réduction du nombre de cellules NK a été aussi observée (Hubscher, 2003).

En effet, la surcharge en fer est associée à la production de radicaux libres. Par conséquent, ces radicaux libres peuvent endommager l'ADN, les protéines, les polysaccharides et les lipides *in vivo* (Kadiiska *et al.*, 1995). La réaction des radicaux libres avec les lipides de la membrane donnant lieu à des produits de dégradation, y compris le malondialdéhyde (MDA) (Singh *et al.*, 2010).

Nos résultats indiquent une augmentation bien définie de concentration de MDA tissulaire du foie, reins, cœur, et de la rate pour les différentes doses de SPION par rapport au témoin. Ces résultats sont en accord avec l'étude d'El-Bahr (2007) qui montrent que l'excès de fer conduit à l'augmentation de concentration tissulaire de MDA de foie, reins, cœur et rate. Dans leur étude, des rats sont traités avec le fer dextran, à une dose de 200 mg/kg de poids corporel une fois par semaine pendant 4,5 mois.

Le MDA a été largement utilisé depuis de nombreuses années comme biomarqueur de la peroxydation lipidique. Il est l'un des marqueurs les plus populaires qui déterminent le stress oxydatif dans des situations cliniques, en raison de leur forte réactivité et de leur toxicité (Ayala *et al.*, 2014).

Le fer libre peut potentiellement traverser la membrane mitochondriale et dans ce dernier cas, le fer libre sous la forme d'ions ferreux (Fe²⁺) peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène

et de l'oxygène produit par les mitochondries pour produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs et des ions ferrique (Fe^{3+}) via la réaction de Fenton (**Singh et al., 2010**). L' $\text{OH}\cdot$ est un oxydant beaucoup plus fort que radical superoxyde anion et pourrait déclencher l'oxydation de la chaîne de phospholipides polyinsaturés donc la génération de MDA, ce qui conduit à la dégradation de la fonction membranaire (**Browne & Armstrong, 2000**).

D'après l'étude de **Bacon et al. (1983)**, a montré une surcharge de fer des cellules de foie avec une augmentation de peroxydation des lipides hépatiques surtout les lipides mitochondriale.

L'étude de **Galleano et al. (1994)** montre que la teneur en fer, après le traitement par un excès de fer, était augmentée 8 fois dans le rein entier et 5 fois dans les mitochondries rénaux avec augmentation des taux de peroxydation des lipides.

Selon l'étude de **Gammella et al. (2015)**, tous les types de cellules qui constituent le cœur peuvent être sensibles aux dommages induits par ERO, y compris les cellules endothéliales, mais les cardiomyocytes sont particulièrement sensibles aux dommages médiée par ERO. En fait, d'une part, compte tenu des besoins élevés de l'énergie du cœur, les cardiomyocytes sont riches en mitochondries et consomment de grandes quantités d'oxygène.

L'étude de **Heys & Dormandy (1980)** montre que le traitement avec grande quantité de fer induit une accumulation de fer dans la rate, ce qui rend la rate l'un des organes les plus gravement touchées par l'attaque des radicaux libres. Peut être parce que la rate, en plus de foie, est l'un des principaux sites de stockage de fer (**Ganong, 2004**).

Nos résultats montrent que la concentration tissulaire de GSH diminue dans le foie chez les groupes D2 et D3, mais elle augmente chez les groupes D2 et D3 dans le cœur, et seulement chez le groupe D3 dans les reins et la rate par rapport au témoin. L'étude d'**El-Bahr. (2007)** montre une augmentation de la concentration tissulaire de GSH de foie, rein, cœur et rate due à l'excès de fer.

Une fonction majeure de GSH est la détoxification 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). Les conjugués formés sont généralement éliminés à partir de la cellule ou dans la bile, comme dans le cas des hépatocytes. Bien que la plupart des réactions de conjugaison GSH entraînent détoxification du composé, de temps en temps le produit lui-même est hautement réactif (**DeLeve & Kaplowitz, 1990**). GSH conjugaison consomme de manière irréversible le GSH intracellulaire, ce qui peut être expliqué la diminution de concentration tissulaire de GSH dans le foie.

Par contre, la concentration tissulaire de GSH augmente dans les autres organes étudiés. On peut expliquer cette augmentation par l'effet de stress oxydatif causée sur l'expression de la synthèse de GSH. Selon l'étude de **Shelly & Lu (2009)**, le stress oxydatif est bien connu pour induire l'expression d'enzymes synthétiques de GSH. Le glutamate cystéine ligase (GCL), un des enzymes clés dans la synthèse de GSH, est composé d'une sous-unité catalytique (GCLC) et une sous-unité modificatrice (GCLM) et ils sont réglementés à des niveaux multiples et parfois différemment. Le stress oxydatif est peut associées à une augmentation des niveaux de GSH cellulaires, de l'activité du GCL, des niveaux de GCLC ARNm et de transcription du gène GCLC (**Yamane et al., 1998**).

Aussi, autre cause, qui peut expliquer l'augmentation de la concentration tissulaire de GSH des reins et de rate, est la diminution de l'activité de GSTs, car le GSTs entre dans le voie enzymatique de conjugaison de GSH.

D'autre part, les résultats indiquent une augmentation significative de l'activité de catalase chez les groupes D2 et D3 dans les reins et chez le groupe D1 dans le cœur, et une augmentation hautement significative chez les groupes D2 et D3 dans le cœur aussi, mais, il n'indique aucune variation significative dans le foie et la rate par rapport au témoin. Ces résultats est contre l'étude de **Abdalla et al. (2011)** qui montre que l'excès de fer diminue l'activité de catalase.

Etant donné que le superoxyde est le principal ERO produit à partir d'une variété des sources, la dismutation du superoxyde se fait par la SOD. Le produit de la SOD est H_2O_2 , qui est manifestement toxiques et doivent être éliminés rapidement. Dans les cellules de mammifères ceci est réalisé par deux familles d'enzymes: les glutathion peroxydases et les catalases. Les deux enzymes détoxifient H_2O_2 en le réduisant à l'eau et l'oxygène. Glutathion peroxydases utilisent le pouvoir réducteur du glutathion (GSH) pour détoxifier le peroxyde d'hydrogène. Deux molécules de GSH sont oxydées pour former le composé à liaison disulfure, le GS-SG dans la réduction d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (**Birben et al., 2012**). La dégradation de H_2O_2 par catalase est réalisée par l'intermédiaire de la conversion entre 2 conformations de catalase. Catalase se lie également NADPH comme un équivalent réducteur pour empêcher l'inactivation oxydative de l'enzyme par H_2O_2 comme il est réduit à l'eau (**Davies, 2000**).

L'augmentation de l'activité de ces enzymes peut expliquer par la capacité de défense équipé par l'organisme (le système antioxydant) qui servent à contrebalancer l'effet des oxydants. Donc, on peut dire que dans le cas de stress, l'organisme induit une augmentation de l'activité des enzymes antioxydants pour réduire l'effet des oxydants (**Birben et al., 2012**).

Peut être c'est pourquoi, l'activité de GSTs, d'après nos résultats augmente de façon significative chez les groupes D2 et D3 dans le foie et seulement dans le groupe D3 dans le cœur, mais, elle diminue de façon significative et très hautement significative respectivement dans la rate et dans les reins chez les groupes D1, D2 et D3 par rapport au témoin. L'étude d'**El-Bahr. (2007)** indique que la surcharge en fer a également provoqué une augmentation significative de l'activité de la GSTs en comparaison avec le groupe témoin. 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 oxydative. D'une manière générale, l'épuisement d'un antioxydant peut perturber l'équilibre entre les antioxydants et les ERO en favorisant les ERO, ce qui peut provoquer un dommage au niveau des organes.

En général, et d'après les résultats de l'activité tissulaire des antioxydants suggèrent que chaque organe a un effet antioxydant spécifique (**Galleano et al., 1994**), ce qui rend la gravité de l'attaque oxydative différente entre les organes, c'est pourquoi on trouve que la variation des antioxydants diffère d'un organe à autre.

Selon l'étude de **Sánchez-Valle et al. (2012)**, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) joue un rôle important dans la production des lésions du foie et d'initier la fibrogenèse hépatique. Le stress oxydative perturbe les lipides, les protéines et l'ADN, induit une nécrose et l'apoptose des hépatocytes et amplifie la réponse inflammatoire. Les ERO également stimuler la production de médiateurs à partir de cellules de Kupffer profibrogénique et faire circuler des cellules inflammatoires et activer directement les cellules stellaires hépatiques, ce qui entraîne l'initiation de la fibrose.

Dans notre étude, on ne trouve pas une différence bien claire entre l'effet des différentes doses de SPION sur les paramètres biochimiques et hématologiques étudiées. Mais pour les paramètres de stress oxydative, on trouve que l'effet toxique de la première dose de SPION (groupe D1) est faible et que la troisième dose de SPION (groupe D3) a un grand effet toxique sur le foie.

Dans notre étude, nous avons évalués la capacité da quercétine à éliminer ou à diminuer l'effet toxique des SPION chez les lapins. Nos résultats montrent que le groupe traité par le SPION et le quercétine (Q) ne présente aucune variation significative par rapport au témoin dans la quasi-totalité des paramètres biochimique, hématologique et de stress oxydative étudiés, ce qui indique que la quercétine corrige les perturbations induites par l'excès de fer par augmentation ou diminution significative par rapport au groupe D2.

Par ailleurs, l'étude de **Bentz. (2009)** montre que la quercétine possède une mauvaise absorption. Mais selon l'étude de **Scalbert et al. (2002)**, il a été proposé que les flavonoïdes,

comme la quercétine, ne doivent pas nécessairement être absorbé pour exercer un effet. Après les chercheurs ont nourri des thés et des vins (les deux sources de quercétine) à des rats, des concentrations élevées de flavonoïdes ont été trouvés sur la lumière intestinale des rats, ce qui entraîne une réduction des dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules cœcaux muqueuses. Cette étude suggère que certains flavonoïdes alimentaires peuvent exercer un effet positif quel que soit leur mauvaise absorption.

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 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. Les effets à long terme de la quercétine sur le transport du fer intestinal sont moins bien étudiés. Mais, l'étude de montre 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. La quercétine se lie au fer entre ses groupes 3-hydroxy et 4-carbonyl. Dans les études à long terme, la quercétine diminue l'expression duodénale de ferroportine les rats traités par la quercétine (**Lesjak et al., 2014**).

En outre, un rapport expérimental récente indiquant que la dose élevée administration de quercétine réduit la glycémie (**Rivera et al., 2008**). Les mécanismes par lesquels la quercétine affiche des effets hypoglycémiant ne sont pas encore bien compris. D'autre part, des études sur la quercétine indiquent leur rôle dans l'augmentation de l'excrétion fécale et biliaire du cholestérol, par conséquent, la diminution du taux de cholestérol sérique et la teneur totale en cholestérol du foie chez le rat (**Igarashi, 1995**). **Kamada et al. (2005)** ont rapporté que la quercétine glucoside réduit de manière significative les quantités de cholestérol total, triglycérides, et acides gras totaux. Peut être c'est pourquoi, on trouve une diminution significative dans la concentration de glucose et de cholestérol sérique par rapport au témoin, on peut dire que les effet hyperglycémiant et hypercholestérolémiant de quercétine est faible (**Lee et al., 2011**).

D'autre coté, une étude réalisée par **Moon et al. (2001)** montre que la quercétine-3-O- β -D-glucuronide, est un des métabolites de quercétine, possède la capacité d'agir comme un antioxydant lors de l'oxydation des LDL du plasma humain induite par des ions cuivre et présentait des propriétés anti-radicalaires, montrant que les métabolites de quercétine peuvent agir comme des antioxydants. Ce qui peut être expliquée l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de quercétine. La quercétine peut exercer ses propriétés anti-inflammatoires et

immuno-modulateurs dans les molécules effectrices telles que les cytokines pro-inflammatoires en supprimant l'activation des voies de transduction du signal de ERK et de p38 et NF-kB/IkB (**Cho et al., 2003**).

Mais, selon **Janisch et al. (2004)**, autres études sont nécessaires pour élucider les effets de la quercétine dans le corps, et d'identifier et d'évaluer l'activité antioxydant de ces métabolites.

Conclusion générale

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. D'autre part, la recherche des nouvelles approches pour résoudre les problèmes de différentes substances toxiques est augmentée. Durant ces deux dernières décennies, la recherche en phytothérapie devient une des plus grandes préoccupations scientifiques. 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.

Ce travail a été fait pour évaluer l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer et de valider l'effet antioxydant de quercétine chez les lapins.

D'après notre étude, nous avons observé que les nanoparticules d'oxyde de fer induit une perturbation de l'hématopoïèse provoquant un changement de la morphologie des érythrocytes, associé à l'apparition d'une anémie microcytaire, et de coagulopathie et dans les cas grave, on peut parler de l'apparition d'un cancer.

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 dans le foie, reins, cœurs et la rate. Alors, on conclure que les nanoparticules d'oxyde de fer conduit à l'apparition des anomalies rénales, cardiaques, hématologiques et principalement hépatiques. L'étude histologique de foie confirme nos résultats car elle indique la présence d'un dommage hépatique qui est exprimé par l'existence d'une nécrose des hépatocytes.

On outre, l'étude de l'effet antioxydant de quercétine contre la toxicité induit par les nanoparticules d'oxyde de fer montre que la quercétine possède des puissantes propriétés antioxydantes avec une capacité à maintenir l'homéostasie de fer en empêchant leur accumulation dans l'organisme via l'influence sur les mécanismes de régulation.

L'ensemble des résultats de cette étude montre que l'exposition aux SPION induit une toxicité via la provocation de stress oxydative. D'autre part, la capacité de quercétine à éliminer cette toxicité. Mais, autre études plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les différents effets observés et évaluer l'effet

Conclusion générale

antioxydant de la quercétine in vivo et son efficacité dans la prévention des maladies résultant des dommages oxydatifs.. Par conséquent, notre travail pourrait être complété premièrement de façon particulière par l'étude de l'impact des nanoparticules d'oxyde de fer sur la morphologie des érythrocytes et la possibilité d'avoir un cancer du sang, mais d'une manière générale l'étude génotoxique est très nécessaire pour bien comprendre les mécanismes de cette perturbation afin d'adapter les mécanismes de défenses.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abdalla, M.O., Turner, T., & Yates, C. (2012). Chemotherapy of prostate cancer by targeted nanoparticles trackable by magnetic resonance imaging. *ISRN Nanotechnology*, 201, 1-9. doi:10.5402/2012/407429.
2. 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.
3. Adcock, I. M., Brown, C. R., Kwon, O., & Barnes, P. J. (1994). Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1518-1524. doi: 10.1006/bbrc.1994.1403
4. 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.
5. Alpern, R.J., Caplan, M.J., & Moe, O.W. (2013). *Seldin and giebisch's the kidney: Physiology & pathophysiology*. USA: Academic press.
6. Andrade, A.L., Souza, D.M., Pereira, M.C., Fabris, J.D., & Domingues, R.Z. (2009). Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach. *Cerâmica*, 55, 420-424. doi: 10.1590/S0366-69132009000400013.
7. Annapurna, A., Reddy, C., Akondi R., & Rao, R. (2009). Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*, 61, 1365-1374. doi: 10.1211/jpp/61.10.0014
8. 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.
9. Aruoma, O. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8(1), 53-63. doi: 10.1046/j.1440-6047.1999.00036.x
10. Ayala, A., Muñoz, M.F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1-31. doi: 10.1155/2014/360438.
11. 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.

12. **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.
13. **Bao, X., Lin, M., Koh, H.Z., & Zhang, Q. (2004).** *Preparation of iron oxide and iron oxide/silicon oxide nanoparticles via water-in-oil microemulsion.* De Guire, M.R., Hu, M.Z., Gogotsi, Y., & Lu, S.W. (Eds.) (2004). *Ceramic nanomaterials and nanotechnology II*. USA: Ceramic transactions.
14. **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.
15. **Barham, & Trinder, (1972).** *Analyst*, 97, 142. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20091.
16. **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*, 22, 266-272.
17. **Bataller, R., & Brenner, D.A. (2005).** Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 115, 209-218. doi:10.1172/JCI200524282.
18. **Beaudeux, J-L., Durand, G. (2010).** *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives* (2è éd.). Paris: Lavoisier.
19. **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.traccli.2005.04.017.
20. **Bentz, A.B. (2009).** A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability. *The Journal of Young Investigators: Appalachian State University*, 19 (10). En line. <http://www.jyi.org/research/re.php?id=3416>
21. **Bergmeyer, H.U. et al. (1978).** *Clin Chem*, 24, 58-73. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80027.
22. **Biesaga, M., Stafiej, A., & Pyrzynska, K. (2007).** Extraction and hydrolysis parameters for the determination of quercetin in *Hypericum perforatum*. *Chromatographia*, 65, 701-706.
23. **Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012).** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5, 9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

24. **Bogart, L.K., Pourroy, G., Murphy, C.J., Puentes, V., Pellegrino, T., Rosenblum, D., Peer, D., & Levy, R. (2014).** Nanoparticles for imaging, sensing, and therapeutic intervention. *ACS Nano*, 8, 3107-3122. doi: 10.1021/nn500962q.
25. **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003).** *Radicaux libres et antioxydants*. Delattre, J., Durand, G., & Jardillier, J.C. (Eds) (2003). *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. France: Médecine Sciences Publications.
26. **Boots, A.W., Haenen, M.M., & Bast, A. (2008).** Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.*, 585, 325-337. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
27. **Bossuyt, X., Boeynaems, J-M. (2001).** *Repères en diagnostic de laboratoire*. Belgique: Garant.
28. **Boyaud, C. (2009).** *Phytothérapie et vigilance : enquête auprès des pharmaciens officinaux de l'Isère*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier, Grenoble.
29. **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
30. **Browne, R.W., & Armstrong, D. (2000).** HPLC analysis of lipid derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. *Clinical Chemistry*, 46(6), 829-836.
31. **Burda, S., Oleszek, W. (2003).** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem*, 51, 615-622. doi: 10.1021/jf001413m
32. **Cable, E.E., Cable, J.W., Bonkovsky, H.L. (1993).** Repression of hepatic delta-aminolevulinate synthase by heme and metalloporphyrins: relationship to inhibition of heme oxygenase. *Hepatology*, 18(1), 119-127. doi: 10.1002/hep.1840180119.
33. **Cao, J., Zhang, Y., Chen, W., & Zhao, X. (2010).** The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr*, 103, 249-255. doi: 10.1017/S000711450999170X
34. **Chatterjee, K., Sarkar, S., Jagajjanani Rao, K., & Paria, S. (2014).** Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 209, 8–39. doi:10.1016/j.cis.2013.12.008.
35. **Cho, S.Y., Park, S.J., Kwon, M.J., Jeong, T.S., Bok, S.H., Choi, W.Y., Jeong, W.I., Ryu, S.Y., Do, S.H., Lee, C.S., Song, J.C., & Jeong, K.S. (2003).** Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem*, 243(2), 153-160.

36. Choi, G., Kim, J., Kwak, J., Jeong, C., Jeong, H., Lee, U., & Heo, H. (2012). Effect of quercetin on learning and memory performance in ICR mice under neurotoxic trimethyltin exposure. *Food Chem*, 132, 1019. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.089
37. Chyka, P.A., & Banner, W. (2004). *Products affecting blood formation: Hematopoietic agents* (3è éd.). Dart, R.C. (Ed.) (2004). *Medical Toxicology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
38. Claiborne, A. (1985). *Catalase activity*. Green Wald, R.A. (Ed.) (1985). *CRC Hand book of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press.
39. Claster, S., Wood, J.C., Noetzli, L., Carson, S.M., Hofstra, T.C., Khanna, R., & Coates, T.D. (2009). Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *Am J Hematol.*, 84(6), 344-348. doi:10.1002/ajh.21416.
40. Closa, D., & Folch-Puy, E. (2004). Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life*, 56(4), 185–191. doi: 10.1080/15216540410001701642.
41. Cornell, R.M., & Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses* (2è éd.). Germany: Wiley-VCH.
42. 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
43. Das, S., Mandal, A., Ghosh, A., Panda, S., Das, N., & Sarkar, S. (2008). Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. *Cur. Aging. Sci*, 1, 74-169. doi: 10.2174/1874609810801030169
44. Davies, K.J.A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279-289. doi: 10.1080/713803728
45. Delattre J. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris: TECDOC.
46. DeLeve, L., Kaplowitz, N. (1990). Importance and regulation of hepatic GSH. *Sem Liver Dis*, 10, 251-266.
47. Dennis, B.A., Ergul, A., Gower, B.A., Allison, J.D., & Davis, C.L. (2013). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk in Overweight Children in an Exercise Intervention Program. *Childhood Obesity*, 9(1), 15-21. doi: 10.1089/chi.2011.0092.
48. Di Santo, A., Mezzetti, A., & Napoleone, E. (2003). Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost*, 1, 1089–1095.

49. Dimitriou, E., Kairis, M., Saraçdou, J., & Michelakakis, H. (2000). Iron overload and kidney lysosomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1501, 138-148. doi:10.1016/S0925-4439(00)00019-3
50. Duguet, E., Delville, M-H., & Mornet, S. (2012). *Synthesis and characterization of iron oxide ferrite nanoparticles and ferrite-based aqueous fluids*. Thanh, N. (Ed.) (2012). *Magnetic nanoparticles from fabrication to clinical applications*. Boca Raton: CRC press.
51. Durackova, Z., (2008). *Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress*. Gvozdkakova, A. (Ed.) (2008). *Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and therapy*. USA: Springer.
52. 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.
53. Elias, A., & Tsourkas, A. (2009). Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 720-726. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.720.
54. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J., & Busquets, M.A. (2015). Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 8070-8101. doi:10.3390/ijms16048070.
55. Eva, U., Graefe, H., Joerg, W., Pharm, D., Silke M., Anne-Kathrin, R., Bernhard U., Bernd, D., Holger, P., G., Hartmut, D., & Markus, V. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41, 492-499.
56. Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
57. Favier, M., Hininger-Favier, I. (2005). Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 33(4), 253-258. doi: 10.1016/j.gyobfe.2005.03.011
58. Feng, Z., Hu, W., & Tang, M. (2004). Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *PNAS*, 101(23), 8598-860. doi: 10.1073/pnas.0402794101
59. Fiorucci, S., (2006). *Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire*. Thèse de doctorat en chimie, Université Nice-Sophia Antipolis, France.
60. Formica, J., Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercétine and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, 33, 1061-1080.

61. **Friedman, S.L. (2003).** Liver fibrosis - from bench to bedside. *J. Hepatol.*, 38, 38-53. doi: 10.1016/S0168-8278(02)00429-4
62. **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
63. **Gammella, E., Recalcati, S., Rybinska, I., Buratti, P., & Cairo, G. (2015).** **Iron-Induced Damage in Cardiomyopathy: Oxidative-Dependent and Independent Mechanisms.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-10. doi: 10.1155/2015/230182.
64. **Ganong, W. F. (2004).** *Physiologie médicale* (M. Jobin, Trad.). Bruxelles: De Boeck. (Œuvre originale publiée en 2003).
65. **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.
66. **Gilchrist, R.K., Medal, R., Shorey, W.D., Hanselman, R.C., Parrot, J.C., & Taylor, C.B. (1957).** Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*, 146, 596-606.
67. **Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., & Skoutelis, A. (2000).** Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis, a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.*, 181, 176-180. doi: 10.1086/315214
68. **Goto, T., Saika, H., Takahashi, T., Maeda, A., Mune, M., & Yukawa, S. (1999).** Erythropoietin supplement increases plasma lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase levels in hemodialysis patients. *Kidney International*, 56, 213-215.
69. **Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2003).** Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary. *J Agric Food Chem*, 51(3), 615-22. doi: 10.1021/jf025938l
70. **Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., & Veit, M. (2001).** Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in human. *J Clin Pharmacol*, 41(5), 492-499.
71. **Gregory, S., & Kelly, N. (2011).** Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 6(2), 172-194.
72. **Griendling, K.K., Sorescu, D., Lassegue, B., & Ushio-Fukai, M. (2000).** Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 2175-2183. doi: 10.1161/01.ATV.20.10.2175

73. 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.
74. 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.
75. Häfeli, U.O., Riffle, J.S., Harris-Shekhawat, L., Carmichael-Baranauskas, A., Mark, F., Dailey, J.P., & Bardenstein, D. (2009). Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Mol Pharm*, 6(5), 1417-1428. doi: 10.1021/mp900083m.
76. Haleagrahara, N., Siew, C., & Ponnusamy, K. (2013). Effect of quercetin and desferrioxamine on 6- hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *J Toxicol Sci*, 38, 25-33.
77. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62(10), 628-638.
78. Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344, 721-724. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
79. Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*, 141(2), 312–322. doi: 10.1104/pp.106.077073
80. Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid anti- oxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*, 13, 572-584. doi:10.1016/S0955-2863(02)00208-5
81. Henry, R.J. *et al.* (1960). *Am J clin Path.*, 34, 381-398. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80025.
82. Herbert, L., Bonkowsky, H.L., Sinclair, P.R., & Sinclair, J.F. (1979). Hepatic heme metabolism and its control. *The Yale journal of biology and medicine*, 52, 13-37.
83. Hertog, M., Feskens E., & Hollman, P. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011. doi:10.1016/0140-6736(93)92876-U
84. Heys, A.D., & Dormandy, T.L., (1981). Lipid peroxidation in iron-overloaded spleens. *Clinical Science*, 60, 295-301.
85. Hider, R.C. (2002). Nature of non transferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest*, 32, 50-54.

86. Hubscher, S.G. (2003). Iron overload, inflammation and fibrosis in genetic haemochromatosis. *Journal of Hepatology*, 38, 521-525. doi:10.1016/S0168-8278(03)00078-3.
87. Hyeon, T. (2002). Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chemical Commun*, 8, 927- 934. doi: 10.1002/chin.200324224.
88. 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
89. Insel, P., Ross, D., McMahon, K., & Bernstein, M. (2011). *Nutrition* (4è éd.). USA: Jones and Bartlett publishers.
90. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., & Kobayashi, T. (2005). Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng*, 100(1), 1-11. doi:10.1263/jbb.100.1.
91. Janisch, K.M. et al. (2004). Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. *Free Radical Research*, 38, 877-884. doi: 10.1080/10715760410001728415
92. Jentzsch, T.L. (2007). *Reactivity of aluminum-doped iron oxide nanoparticles*. Mémoire pour le diplôme de docteur en philosophie, Université du Minnesota, Minnesota.
93. Joseph, D., Muralidhara K. (2013). Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol Psychiatry*, 1024(40), 83-92. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.08.018
94. Kadiiska, M.B., Burkitt, M.J., Xiang, Q.H., Mason, R.P. (1995). Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *J Clin Invest*, 96, 1653-1657. doi: 10.1172/JCI118205
95. 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: 10.1080/10715760400019638
96. Kandori, K. (2006). *Iron oxide particles* (2è éd.). Somasundaran, P. (Ed.) (2008). *Encyclopedia of surface and colloid science* (Vol.4). USA: Taylor & Francis.
97. Katz, O., Stuible, M., Golishevski, N., Lifshitz, L., Tremblay, M.L., Gassmann, M., Mittelman, M., & Neumann, D. (2010). Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models. *Journal of Endocrinology*, 205, 87-95. doi: 10.1677/JOE-09-0425.

98. **Kehrer, J.P. (2000).** The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00231-6.
99. **Landmank, K.J. (2008).** *Dendrimer-coated iron oxide nanoparticles as targeted MRI contrast agents*. Mémoire de l'exigence de diplôme de docteur en philosophie, université de Michigan, USA.
100. **Larsen, K. (1972).** *Clin. Chim. Acta*, 66, 209. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20151.
101. **Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander-Elst, L., & Muller, R.N. (2008).** Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 108, 2064-2110. doi: 10.1021/cr068445e.
102. **Lee, K-H., Park, E., Lee, H-J., Kim, M-O., Cha, Y-J., Kim, J-M., Lee, H., & Shin, M-J. (2011).** Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract*, 5(1), 28-33. doi: 10.4162/nrp.2011.5.1.28.
103. **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.
104. **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
105. **Lesjak, M., Hoque, R., Balesaria, S., Skinner, V., Debnam, E.S., Srail, S.K.S., & Sharp, P.A. (2014).** Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro. *PLoS ONE*, 9(7), 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0102900.
106. **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 J Med Sci*, 10(6), 683-690. doi:10.7150/ijms.5947.
107. **Lijuan, W., Lin, W., Wenjun, D., & Fang, Z. (2010).** Acute toxicity of ferric oxide and zinc oxide nanoparticles in rats. *J N N*, 10(12), 8617-8624. doi: 10.1166/jnn.2010.2483
108. **Lin, E., & Adams, P.C. (1991).** Biochemical liver profile in hemochromatosis. A survey of 100 patients. *J Clin Gastroenterol*. 13(3), 316-320.
109. **Liu, S., Hou, W., Yao, P., Li, N., Zhang, B., Hao, L., Nussler, A., & Liu, L. (2012).** Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. *Toxicol in Vitro*, 26, 74-80. doi:10.1016/j.tiv.2011.10.013

110. Mac Key, E.M., Rackeyll, J. (1927). *Clin. Invest, J. Clin. Invest.*, 4, 295. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20141.
111. 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.
112. Manasa, K., & Vani. R. (2016). Influence of oxidative stress on stored platelets. *Advances in Hematology*, 2016, 1-6. doi. 10.1155/2016/4091461.
113. Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77, 147-161. doi:10.1016/0300-9084(96)88119-3
114. McGuire, M., & Beerman, K.A. (2013). *Nutritional sciences: From fundamentals to food* (3è éd.). USA: Wadsworth, CENGAGE learning.
115. McLeish, M.J., & Kenyon, G.L. (2006). *Using site-directed mutagenesis to elucidate structure and function in creatine kinase*. Christian V. (Ed.) (2006). *Creatine kinase*. USA: Nova science publishers.
116. Meghna, P., & Ramavataram, S.S. (2012). Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. *Ind J Clin Biochem*, 27(4), 322-332. doi: 10.1007/s12291-012-0250-7.
117. Melancon, M.P., & Li, C. (2009). *Core-shell magnetic nanomaterials in medical diagnosis and therapy*. Kumar, C. (Eds.) (2009). *Magnetic nanomaterials*. Weinheim: Wiley-VCH.
118. Meyers, K., Rudolf, J., & Mitchell, A. (2008). Influence of dietary quercetin on glutathione redox status in mice. *J Agric Food Chem*, 56, 830-836. doi: 10.1021/jf072358l
119. Meziti, A. (2009). *Activité antioxydante des extraits des graines de Nigella sativa L étude in vitro et in vivo*. Mémoire de magister en biochimie appliquée .Université El-Haj Lakhdar. Batna.
120. Mohammadi, Z. (2008). *In Situ Synthesis of Iron Oxide Within Polyvinylamine Nanoparticles*. Mémoire de master soumis au programme de diplôme d'études supérieures en génie chimique et du pétrole, Université de Tehran, Iran.
121. Mohapatra, M., & Anand, S. (2010). Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2 (8), 127-146.
122. Montel-Hagen, A., Sitbon, M., & Taylor, N. (2009). Erythroid glucose transporters. *Curr Opin Hematol*, 16(3), 165-172. doi: 10.1097/MOH.0b013e328329905c.

123. Moon, J., Tsushida, T., Nakahara, K., & Terao, J. (2001). Identification of quercetin 3-O-b-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 1274-1285. doi:10.1016/S0891-5849(01)00522-6
124. Moskuag, J.O., & Carlson, H., & Myhrstad, M. (2004). Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetrin-rich foods. *Mechanism of Ageing and Development*, 125, 315-324.
125. Murota, K., & Terao, J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 417, 12-17. doi:10.1016/S0003-9861(03)00284-4
126. Nakajima, K., Nakano, T., & Tanaka, A. (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 367, 36-47. doi: 10.1016/j.cca.2005.12.013.
127. 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.
128. Nicolosi, R.J., Lawton, C., & Wilson, T. (1999). Vitamin E reduced plasma LDL-c, LDL oxidation, and early aortic atherosclerosis compared with black tea in hypercholesterolemic Hamsters. *Nutrition research*, 19 (8), 1201-1214. doi:10.1016/S0271-5317(99)00081-0
129. Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., & Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation toxicology*, 16(6), 437-445. doi: 10.1080/08958370490439597.
130. Ono, K., Ono, T., & Matsumata, T. (1995). The pathogenesis of decreased aspartate aminotransferase and alanine aminotransférase activity in the plasma of hemodialysis patients: the role of vitamin B6 deficiency. *Clin Nephrol.*, 43(6), 405-408.
131. Park, M.J., Park, P.W., Seo, Y.H., Kim, K.H., Park, S.H., Jeong, J.H., & Ahn, J.Y. (2013). The relationship between iron parameters and platelet parameters in women with iron deficiency anemia and thrombocytosis. *Platelets*, 24, 348-351. doi: 10.3109/09537104.2012.699641.
132. Parul, L., & Deepak, R. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37. doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851

133. **Pedis, D. (2016).** *Magnetic properties of spinel ferrite nanoparticles: influence of the magnetic structure*. Trohidou, K.N. (Ed.) (2016). *Magnetic nanoparticle assemblies*. USA: Taylor & Francis.
134. **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. doi:10.1172/JCI31370.
135. **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.
136. **Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63(7),1035-1042. doi: 10.1021/np9904509.
137. **Pincemai, J., Bonjean, K., Cayeux, K & Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233-239. doi:10.1016/S0985-0562(02)00166-8
138. **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4(5), 1-7.
139. **Porto, G., Vicente, C., Teixeira, M.A., Martins, O., Cabeda, J.M., Lacerda, R., Goncalves, C., Fraga, J., Macedo, G., Silva, B.M., Alves, H., Justiça, B., & Sousa, M. (1997).** Relative impact of HLA phenotype and CD4-CD8 ratios on the clinical expression of hemochromatosis. *Hepatology*, 25, 397-402. doi: 10.1002/hep.510250223
140. **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.
141. **Pretorius, E., Vermeulen, N., Bester, J., Plooy, J.L., & Gericke, G.S. (2014).** The effect of iron overload on red blood cell morphology. *Lancet*, 383, 722. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61208-8.
142. **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
143. **Raghupathy, R., Manwani, D., & Little, J.A. (2010).** Iron Overload in Sick Cell Disease. *Advances in Hematology*, 2010, 1-9. doi:10.1155/2010/272940.

144. Rennke, H.G., & Denker, B.M. (2007). *Renal pathophysiology: The essentials* (2^e éd.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
145. 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.
146. Rice-Evans, C., Miller J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*, 2(4), 152-159. doi:10.1016/S1360-1385(97)01018-2
147. Rivera, L., Morón, R., Sánchez, M., Zarzuelo, A., & Galisteo, M. (2008). Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 2081-2087. doi: 10.3410/f.1115498.571531
148. Roberfroid, M.B., Coxam, V., & Delzenne, N.M. (2008). *Aliments fonctionnels* (2^e éd.). Paris: Lavoisier.
149. Rosalki, S. et al. (1993). *Clin Chem*, 39(4), 648-652. Cité par fiche technique SPINREACT. Réf. 1001130.
150. Ross, J.A., & Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Reviv Nutriment*, 22, 19-34. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
151. 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.
152. Sánchez-Valle, V., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis. *Curr Med Chem.*, 19(28), 4850-4860. doi: 10.2174/092986712803341520
153. Santos, A., Vyemura, S., & Lopes, J. (1998). Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 24,1455-61. doi:10.1016/S0891-5849(98)00003-3
154. Scalbert, A., et al. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 276-282. doi:10.1016/S0753-3322(02)00205-6
155. Schetz, M., Vanhorebeek, I., Gunst, J., & Berghe, G.V. (2010). *Glucose, insulin, and the kidney*. Jorres, A., Ronco, C., & Kellum, J.A. (Eds.) (2010). *Management of acute kidney problems*. Berlin: Spring.

156. 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
157. Shelly, C., & Lu, M.D. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(2), 42-59. doi:10.1016/j.mam.2008.05.005.
158. 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
159. Smeltzer, S.C., Bare, B., Hinkle, J.L., & Cheever, K.H. (2010). *Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
160. Soheir, N., & Abd El-Rahmanand Suhailah, S. (2014). Quercetin nanoparticles: preparation and characterization. *IJOD*, 2(3), 96-103.
161. 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
162. Spaia, S., Pangalos, M., Askepidis, N., Pazarloglou, M., Mavropoulou, E., Theodoridis, S., Dimitrakopoulos, K., Milionis, A., & Vayonas, G. (2000). Effect of short-term rHuEPO treatment on insulin resistance in haemodialysis patients. *Nephron*, 84, 320-325. doi:10.1159/000045606
163. Straub, K.L., Benz, M., & Schink, B. (2001). Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 181-186. doi: 10.1016/S0168-6496(00)00088-X
164. Szalay, B. (2012). *Iron oxide nanoparticles and their toxicological effects: in vivo and in vitro studies*. Thèse de doctorat en médecine, University de Szeged, Szeged.
165. Szalay, B., Tátrai, E., Nyíró, G., Vezérb, T., & Duraa, G. (2012). Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro experiments. *J. Appl. Toxicol*, 32(6), 446-453. doi: 10.1002/jat.1779
166. Teeguarden, J.G., Mikheev, V.B., Minard, K.R., Forsythe, W.C., Wang, W., Sharma, G., Karin, N., Tilton, S.C., Waters, K.M., Asgharian, B., Price, O.R., Pounds, J.G., & Thrall, B.D. (2014). Comparative iron oxide nanoparticle cellular dosimetry and response in mice by the inhalation and liquid cell culture exposure routes. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(46), 1-18. doi: 10.1186/s12989-014-0046-4
167. Tim, V. (2009). Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation. *J Am Med Inform Assoc*, 16(4), 471-479.

168. Tong, X., Zeng, X., & Zhou, H.M. (2000). Effects of zinc on creatine kinase: activity changes, conformational changes, and aggregation. *J Protein Chem.*, 19(7), 553-562. doi: 10.1023/A:1007142117037
169. Tratner, I. (2003). Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux. *Médecine Sciences*, 19(12), 1291-1292. doi: 10.1051/medsci/200319121291
170. Turbino-Ribeiro, S.M.L., Silva, M.E., Chianca, D.A., Paula, H., Cardoso, L.M., Colombari, E., & Pedrosa, M.L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *The Journal of Nutrition*, 133, 15-20.
171. 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.
172. Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Boone, E., Plaisance, S., & Haegeman, G. (1999). The nuclear factor-B engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 274, 32091-32098.
173. Vayenas, D.V., Repanti, M., Vassilopoulos, A., & Papanastasiou, D.A. (1998). Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain. *Int J Clin Lab Res*, 28(3), 183-186.
174. Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*, 10, 1677-1694.
175. Wach, A., Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chem*, 100(2), 699-704. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.10.028
176. Walker, E.M., & Walker, S.M. (2000). Effects of iron overload on the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(4), 354-365.
177. Walters, M., & Gerarde, H. (1970). *Microchem J*, 15, 231-243. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80403.
178. 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.
179. Weissleder, R., Ross, B.D., & Rehemtulla, A. (2010). *Molecular imaging: principles and practice*. USA: People's medical publishing house.
180. Williams, C., & Grayer, R. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep*, 21, 539-573. doi: 10.1039/b311404j

181. Williams, *et al.* (1977). *Clin. Chem.*, 23, 237. Cité par fiche technique BIOMAGHREB. Réf. 20061.
182. Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res Lett*, 3, 397–415. doi: 10.1007/s11671-008-9174-9.
183. 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
184. Yamane, Y., Furuichi, M., Song, R., Van, N.T., Mulcahy, R.T., Ishikawa, T., & Kuo, M.T. (1998). Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J Biol Chem*, 273, 31075-31085.
185. You, H., Kim, J., & Jeong, H. (2003). 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(17), 1129-1134.
186. 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.
187. Zelko, I., Marian, T., & Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*, 33, 337-349.
188. Zhang, D-L., Ghosh, M.C., & Rouault, T.A. (2015). *The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis- an update*. Gozzelino, R., & Arosio, P. (Eds.) (2015). *The importance of iron in pathophysiologic conditions*. Espagne: Frontiers research topic.
189. Zhang, R., & Olin, H. (2012). *Magnetic nanoparticles in biomedical applications*. Barh, D., Blum, K., & Madigan, M.A. (Eds) (2012). *OMICS: Biomedical perspectives and applications*. USA: Taylor & Francis.
190. Zhihua, J., Elias, S., Ying, M., Linda, J., Jinming, S., Siqi, 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.

Annexes



Figure21: Lapins au cours de l'expérience (photo originale, 2016).

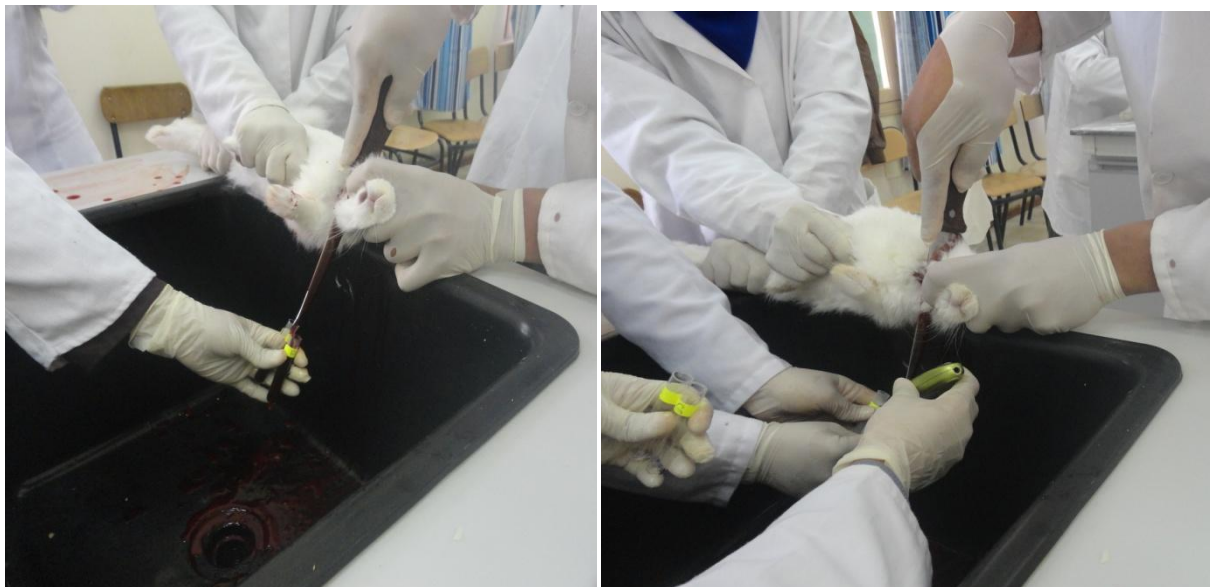


Figure22: Sacrifice, prélèvement de sang et mesure de glycémie (photo originale, 2016).

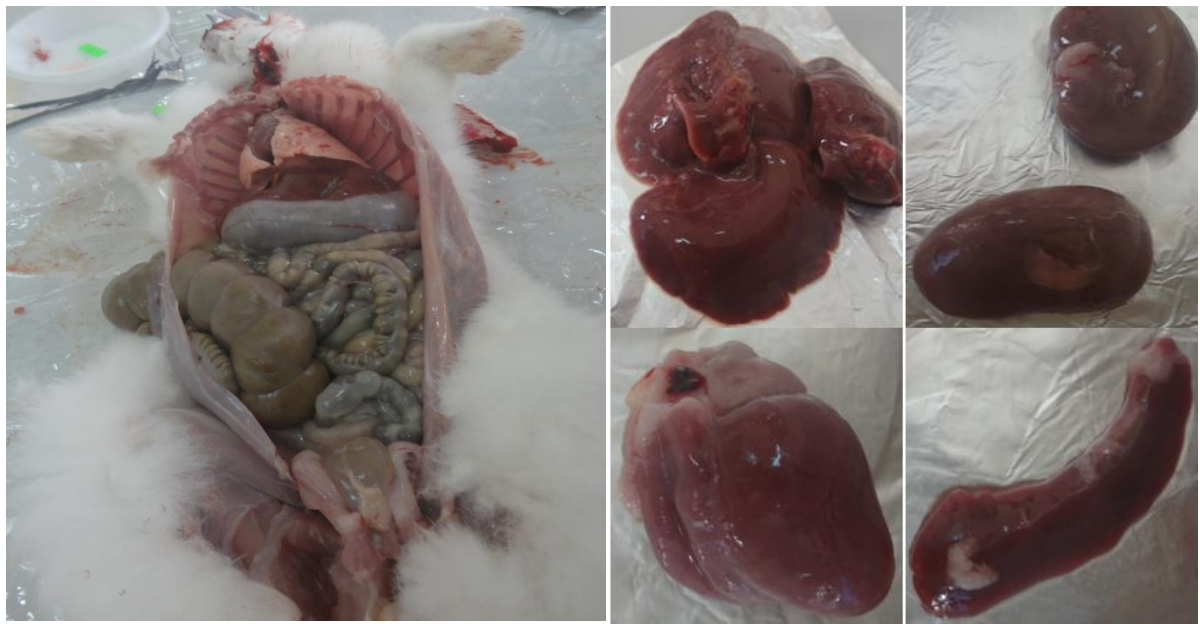


Figure23: Dissection et prélèvement des organes (photo originale, 2016).



Figure24: Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (photo originale, 2016).



Figure25: Analyseur hématologique de type Mindray-BC-2800 (photo originale, 2016).



Figure26: Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240 (photo originale, 2016).



Figure 27: Bain-marie de type MEMMERT (photo originale, 2016).

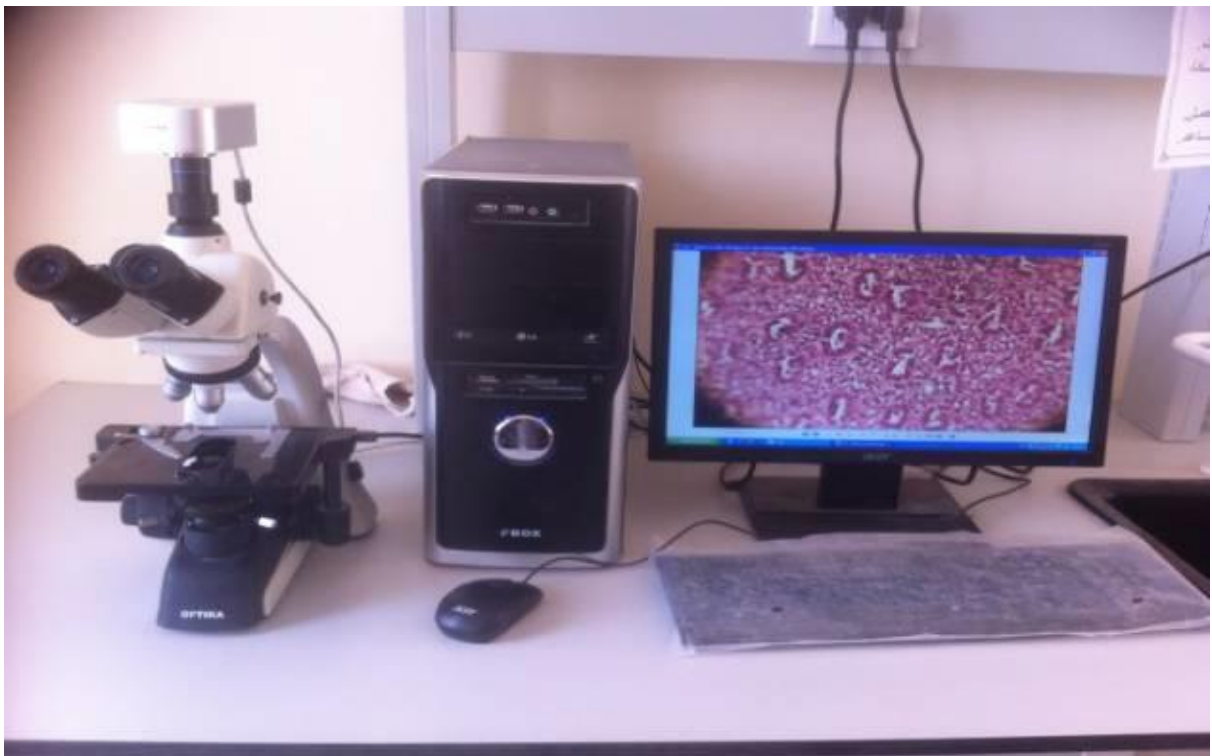


Figure 28: Microscope optique avec appareil photo (camera) (photo originale, 2016).

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet toxique des nanoparticules d'oxyde de fer et de valider l'effet antidote de quercétine chez les lapins. 20 lapins mâles Albinos pesant $910,4 \pm 357,54$ g ont été divisés en cinq groupes: le 1^{er} groupe considéré comme témoin, le 2^{ème}, le 3^{ème} et le 4^{ème} groupe (D1, D2 et D3) recevant chaque jour respectivement 50 µg/kg, 100 µg/kg et 150 µg/kg des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique (SPION) pendant 21 jours, le 5^{ème} groupe (Q) recevant chaque jour 100 µg/kg de SPION dissous dans l'eau distillé et 10 mg/kg de quercétine pendant 21 jours. Les résultats obtenus dans la présente étude, montrent que le traitement par les SPION induit une surcharge en fer, perturbation de fonction rénale exprimée par l'augmentation de créatinine, d'urée et d'acide urique et perturbation de fonction hépatique exprimée par la diminution de l'activité des transaminase et l'augmentation de l'activité de phosphatase alcaline. Les résultats indiquent aussi la présence d'une anémie microcytaire, coagulopathie, inflammation et le plus grave la présence d'un stress oxydative au niveau de foie, des reins, de cœur et de la rate avec une diminution de poids relatif de cœur. Cependant, l'administration orale de la quercétine a provoqué une diminution de l'effet toxique de SPION en maintenant l'homéostasie de fer dans l'organisme donc en inhibant les effets néfastes de la surcharge en fer.

Mots clés: SPION, toxicité, stress oxydative, quercétine, lapins Albinos.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير السمي للجزيئات النانوية لأكسيد الحديد والتحقق من التأثير المضاد للأكسدة للكيرسيتين عند الأرانب، أجريت هذه الدراسة على 20 ذكر من أرناب Albinos البيضاء وزن $910,4 \pm 357,54$ غ، قسمت الأرناب إلى خمس مجموعات: المجموعة الأولى غير معالجة، إذ تعتبر كشاهد، عولجت المجموعة الثانية، الثالثة والرابعة على الترتيب بـ 50، 100، 150 ميكروغرام/كيلوغرام (من الوزن الكلي) من جزيئات أكسيد الحديد النانوية، أما المجموعة الخامسة فقد عولجت بـ 100 ميكروغرام/كيلوغرام من جزيئات أكسيد الحديد النانوية بالإضافة إلى 10 ميكروغرام/كيلوغرام من الكيرسيتين مدة واحد وعشرون يوما وبشكل يومي. النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تبين أن المعالجة بجزيئات أكسيد الحديد النانوية تسبب تراكم جزيئات الحديد في الجسم، اضطراب وظيفة الكلى التي عبر عنها زيادة الكرياتينين واليوريا وحمض اليوريك في الدم و أيضا اضطراب وظيفة الكبد و التي عبر عنها انخفاض في نشاط نواقل الأمين، وزيادة في النشاط الفوسفاتاز القلوي. تبين أيضا نتائج هذه الدراسة وجود فقر الدم صغير الكريات، أمراض تخثر الدم، التهاب والأكثر خطورة وجود الإجهاد التأكسدي في نسيج الكبد، الكلى، القلب والطحال مع انخفاض الوزن النسبي للقلب ومع ذلك، فإن تناول الكيرسيتين عن طريق الفم تؤدي إلى انخفاض التأثير السمي لجزيئات أكسيد الحديد النانوية وذلك بالحفاظ على توازن تركيز جزيئات الحديد في الجسم وبالتالي يحول دون الآثار السلبية لتراكم الحديد الزائد.

الكلمات المفتاحية: جزيئات أكسيد الحديد النانوية، السمية، الإجهاد التأكسدي، كيرسيتين، أرناب Albinose.