



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département: Biologie Appliquée



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD

En : Sciences biologiques

Option : Toxicologie cellulaire

Par : Me. BOUTERAA Zina

Intitulée

*Nanotoxicologie d'un oxyde de fer et titane chez
les rats et l'effet opposé de diféruoyl-méthane*

Devant le jury :

M. BENHAJ Mabrouka	MCA	Université de Tébessa	Présidente
M. ROUABHI Rachid	Prof	Université de Tébessa	Rapporteur
M.GOUDJIL Tahar	MCA	Université de Tébessa	Examineur
M.GASMI Salim	MCA	Université de Tébessa	Examineur
M. DEROUICHE Samir	Prof	Université d'Eloued	Examineur
M. MEDILA Ifriqya	MCA	Université d'Eloued	Examinatrice

Date de Soutenance

Le 06/ 07/2023

Remerciements

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et la capacité d'effectuer ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier mon encadreur, Monsieur ROUABHI Rachid professeur à l'université de Tébessa de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, je vous remercie particulièrement de m'avoir procuré soutien et disponibilité permanente pour les séances de travail tout le long de ces années de thèse. Il n'a pas cessé de m'encourager en me faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques et surtout sa permanente bonne humeur au sein du laboratoire.

Mes sincères remerciements vont à Madame **BENHAJ Mabrouka** maitre de conférences à l'université de Tébessa de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury. Qu'elle trouve ma reconnaissance et mon respect les plus sincères.

Je tiens à remercier aussi Monsieur **DEROUICHE Samir**, Professeur à Université d'Eloued et Madame **MEDILA Ifriqya** maitre de conférences à Université d'Eloued pour avoir accepté de juger ce travail, merci de vous être déplacés ainsi que pour vos remarques et conseils fructueux

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **GOUDJIL Tahar** maitre de conférences à l'université de Tébessa de m'avoir fait l'honneur de participer au jury

Mes remerciements sincères et respectueux vont au Monsieur **GASMI Salim** maitre de conférences à l'université de Tébessa pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme Examineur.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur aide surtout pour tous les bons moments passés en leur compagnie : Karima et Soued

Il m'est agréable d'exprimer mes remerciements à tous mes amis qui m'ont aidé pour le bon achèvement de ce travail

J'adresse également mes sincères remerciements à tous les personnels enseignants du département de biologie appliquée et le département des êtres vivants de

l'université Echahid Cheikh Laarbi Tébessi à Tébessa et à toutes les personnes qui m'ont aidé de ou de loin tout au long de mes études

En fin, je ne peux terminer ces remerciements sans citer ma famille, à qui je dois tant. Sans son encouragement, son soutien et son affection, je n'aurais pu mener ce travail à bien.

Dédicace

Je dédie ce travail

*A ma maman GHARBI Teffaha qui m'a soutenu et encouragée durant ces années
d'études*

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A la mémoire de mon père BOUTERAA Ferhat, disparu trop tôt. Puisse dieu, le toute
puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde*

A l'homme de ma vie Roudouane et ma fille Ritedj et mon fils Iyad

A mon frère Mohammed et sa femme CHAWEICHE Lila

A mon petit frère saber

A ma sœurs dalel et douniazed et son mari SLIMANE med Saleh

Aux parents de mon mari BOUCHIHA Said et BOUCHIHA Mabrouka

A mon cher cousin GHARBI Fethi

A ma famille et la famille de mon mari

A mes nièces et neveux : Sabile, Amir, Nidhal, Maryeme, Adem, liliane, yakine

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite plus de succès

Surtout ma chère YOUSFI Ameni

إشكالية البحث تميل إلى تسليط الضوء على نوع من الجسيمات النانوية فائقة الدقة و المتمثل في أكسيد التيتانيوم و أكسيد الحديد و التأثير العكسي لمستخلص الكركم (الكركمين) على خلايا كبد الفئران وستار

أجريت هذه التجربة في المخبر على 35 فار من فصيلة ويستار مقسمة الى 6 مجموعات المجموعة 01 تعتبر كشاهد, المجموعة 02 معالجة بمستخلص الكركم (الكركمين) (20مل\كغ) المجموعة 03 أكسيد التيتانيوم (10مل\كغ), المجموعة 04 أكسيد الحديد (10 مل\كغ), المجموعة 05 أكسيد التيتانيوم + الكركمين(10 مل\كغ+20مل\كغ) و المجموعة 06 أكسيد الحديد+ الكركمين(10 مل\كغ+20مل\كغ) عن طريق الفم لمدة 28 يوم.

نتائجنا تظهر أن التسمم بالجسيمات النانوية والتأثير العكسي للكركمين عند ذكور الفئران وستار تسبب آثار الأكسدة و آثار بيوكيميائية على مستوى الكبد ويمكن تلخيصها في النقاط التالية

الجانب الفيزيولوجي: يظهر أن أكسيد التيتانيوم و أكسيد الحديد يتسبب في نقص وزن الفئران مع زيادة وزن الكبد مقارنة مع الشاهد. أما **الجانب الكيميائي** يبين أن أكسيد التيتانيوم و أكسيد الحديد أدى إلى تغيير القياسات البيوكيميائية و المؤشرات الحيوية من وظائف الكبد عن طريق زيادة تركيز اليوريا - كرياتين هذا يرافقه زيادة النشاط الانزيمي الكبدى الذى يتم تعديله باضافة الكركمين

بالنسبة للإجهاد التأكسدي في الخلية يؤثر كل من أكسيد التيتانيوم وأكسيد الحديد على نظام الأكسدة مما يتسبب في اختلال المؤشرات البيولوجية للأكسدة CAT.MDA.GSH .GSH,GPx كما يتجلى في زيادة حجم و نفاذية الميتوكوندري

نتائج هذه الدراسة تشير أن الجسيمات النانوية تسبب الأكسدة الخلوية , كما أن نتائجنا الوقائية تؤكد الدور الدفاعي للكركمين ضد التسمم بالجسيمات النانوية

الكلمات المفتاحية: أكسيد التيتانيوم ,أكسيد الحديد. الإجهاد التأكسدي. المؤشرات البيوكيميائية, الميتوكوندري

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier et d'évaluer l'effet de deux nanoparticules (TiO_2 Fe_3O_4) et l'effet opposé de Dif-méth (Curcumine) sur les paramètres biochimiques, cytosolique et mitochondrial chez le rats mâle de la race Wister.

L'étude expérimentale menée au laboratoire sur 35 rats male Wistar repartis en 06 lots, le premier lot sert de témoin, lot traité par Dif-méth à une dose (20ml/Kg) lot traité par le TiO_2 (10mg/Kg), lot traité par le Fe_3O_4 (10mg/Kg), lot traité par TiO_2 +Dif-méth (10mg/Kg et 20ml/kg) et lot traité par Fe_3O_4 + Dif-méth (10mg/Kg et 20ml/kg) par voie oral pendant 28jours de traitement

Nos résultats montrent que l'intoxication du NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) et l'effet protecteur de Dif-méth chez rats Wister provoque des effets oxydatifs, biochimiques et hépatotoxiques qu'on peut les résumés dans les points suivants

- L'aspect physiologique montre que le TiO_2 , Fe_3O_4 induit un déficit pondéral avec une augmentation des poids relatifs du foie et une diminution de la consommation alimentaire par rapport au lot témoin
- L'aspect biochimique montre que le TiO_2 Fe_3O_4 induit une altération des paramètres biochimiques, biomarqueurs de la fonction hépatiques, augmentation de la concentration de l'urée, de la créatinine et une augmentation de l'activité enzymatique des marqueurs hépatiques ASAT, ALAT et ALP
- Stress oxydatif cytosolique : L'effet oxydatif du NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) se manifestent par altération du système antioxydant cellulaire caractérisé par une action directe sur l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px), de la catalase, de GST, le taux du glutathion hépatique (GSH) et le taux de MDA.
- Effet mitochondrial : se manifeste par une augmentation de gonflement et de perméabilités mitochondrial et perturbation des biomarqueurs oxydatif mitochondrial

Les résultats de cette étude montrent que ces nanoparticules sont à l'origine d'un stress oxydatif au niveau hépatique cytosolique et subcellulaire. Nos résultats confirment l'effet protecteur de Dif-méth contre le stress oxydatif par une amélioration dans tous les marqueurs biochimiques et oxydatifs.

Mots clés : TiO_2 , Fe_3O_4 , rats Wistars, stress oxydant, Dif-méth, perméabilité, gonflement

Abstract

The aim of this work is to study and evaluate the effect of nanoparticle (TiO_2 and Fe_3O_4) and the opposite effect of Dif-méth (Curcumin) on liver cells, on the biochemical, cytosolic and mitochondrial parameters in the male wistar rats.

The experimental study conducted in the laboratory on 35 male wistar rats distributed in 06 batches, the first batch serves as a control, batches treated with Dif-méth at the dose (20ml/Kg), batch treated with TiO_2 (10mg/g), batch treated with Fe_3O_4 (10mg/g), batch treated with TiO_2 +Dif-méth (10mg/g et 20ml/kg) and batch treated with Fe_3O_4 + Dif-méth (10mg/g et 20ml/kg) orally for 28 days of treatment

Our results show those NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) and the effects protective in the male rats wistar causes oxidative, biochemical and hepatotoxic effects that can be summarized in the following points

- The physiological aspect shows that TiO_2 , Fe_3O_4 and their associations induce a weight deficit with an increase in relative liver weights and a decrease in food compared to the control group
- The biochemical aspect shows that the TiO_2 , Fe_3O_4 and their associations induce an alteration of the biochemical parameters, biomarkers of the liver function, increase of the concentration of glucose, urea, creatinine and increase in the enzymatic activity of ASAT, ALAT and ALP liver markers.
- Cytosolic oxidative stress: The oxidative effect of TiO_2 , Fe_3O_4 are manifested by alteration of the cellular antioxidant system characterized by a direct action on the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase, GST, hepatic glutathione level (GSH) rate of MDA
- Mitochondrial effect: manifested by an increase in swelling and mitochondrial permeability and disruption of mitochondrial oxidative biomarkers

The results of this study show that these nanoparticles cause oxidative stress at the cytosolic and subcellular hepatic level. Our results confirm the protective effect of Dif-méth against oxidative stress by an improvement in all biochemical and oxidative markers

Key words: TiO_2 , Fe_3O_4 , rats' wistar, oxidative stress, Dif-méth, biochemical parameters, permeability, swelling.

ملخص

Résumé**Abstract****Introduction****Partie bibliographique**

I-Généralités sur les nanomatériaux.....	5
I-1 Définition des nanoparticules.....	5
I-1-1- Origine du TiO ₂	5
I-1-2- Principales applications.....	5
I-1-2-1- Applications utilisant le principe de la photo-catalyse	6
I-1-2-2-Comme pigment	6
I-1-2-3- Utilisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique	6
I-1-2-4- Dans les écrans solaires.....	6
I-1-2-5- Dans les implants biologiques.....	6
I-1-3- Propriétés physiques.....	7
I-1-4- Propriétés chimiques	7
I-1-5- Toxicité des nanoparticules de TiO ₂	7
I-2- Nanoparticules d'oxydes de fer.....	8
I-2-1- Caractéristique physico-chimiques	8
I-2-2- Utilisation des nanoparticules du d'oxyde de fer.....	9
I-2-3- Toxicité de l'oxyde de fer.....	10
I-3- Mécanismes de toxicité des nanoparticules.....	10
I-3-1- Mort cellulaire.....	10
I-3-2- Inflammation.....	11
I-3-3- Stress oxydant.....	12
I-3-4-Génotoxicité.....	12
I-3-5- Carcinogénicité.....	13
II-Généralité sur le diferylol-méthane	14
II-1-Définition du curcuma ;.....	14
II-2-Etymologie.....	14
II-3- Répartition géographique.....	14

II-4-Classification.....	15
II-5-Description de la plante.....	15
II-6- Composition chimique.....	16
II-7- Usages courants.....	16
II-8- Usages en Médecine traditionnelle.....	16
II-9-Définition de la Curcumine	17
II-9-1-Propriétés chimiques	18
II-9-2-Pharmacocinétique et métabolisme	19
II-9-2-1-Etude de l'absorption	19
II-9-2-2-Etude de la distribution.....	19
II-9-2-3-Métabolisme.....	20
II-9-2-4-Elimination.....	20
II-9-3-Toxicité	20
II-9-4-Pharmacologie.....	21
II-9-5-Un puissant antioxydant	21
II-9-6-Curcumine et inflammation.....	22
II-9-7-Problèmes digestifs.....	22
II-9-8-Arthrite et allergies.....	22
II-9-9-Problèmes circulatoires.....	22
II-9-10-Dermatologie.....	22
II-9-11-Activité cytotoxique	23
II-9-12- Inhibition de l'angiogenèse.....	23
II-9-13 Potentialisation des anticancéreux	23
Partie pratique	
I-Matériel et méthodes	24
I-1- Matériel	24
I-1-1-Matériel biologique	24
I-1-2- Matériels chimiques.....	25
I-2- Méthode	26
I-2-1- Lotissement et traitement	26
I-2-2- Sacrifice et prélèvement d'organes	27
I-2-3- Méthodes dosage des paramètres biochimiques.....	28
I-2-3-1- L'aspartate aminotransférase (TGO)	28

I-2-3-2- L'alanine aminotransférase (TGP)	29
I-2-3-3- Phosphatase alcalin (PALc).....	29
I-2-3-4-Urée.....	30
I-2-3-5- Créatinine	31
I-2-4- Dosages biochimiques	31
I-2-4-1- Extraction des métabolites	31
I-2-5- Etude biochimique et enzymatique.....	34
I-2-5-1- Suivi de l'activité catalase	34
I-2-5-2- Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST).....	35
I-2-5-3-Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx).....	36
I-2-6- Dosage des biomarqueurs non enzymatiques.....	37
I-2-6-1-Malonaldéhyde (MDA).....	37
I-2-6-2-Dosage du glutathion (GSH).....	39
I-2-7- Étude subcellulaire.....	40
I-2-7-1- Isolement et gonflement mitochondrial.....	40
I-2-8- Mesure des paramètres mitochondriales	40
I-2-8-1-Détermination de GSH.....	40
I-2-8-2- Détermination de GPx	41
I-2-8-3- Détermination de GST	41
I-2-8-4- Détermination de CAT	41
I-2-8-5- Détermination de MDA	41
I-2-8-6- Dosage du cytochrome c oxydase	41
I-3- Analyses statistiques	42
II- Résultats	
II-1-Etude physiologique	44
II-1-1-Effet sur gain du poids corporel.....	44
II-1-2-Effet sur le poids relatif du foie.....	44
II-2- Étude des paramètres biochimiques sanguins.....	45
II-2-1-Urée et créatinine	45
II-2-2-Transaminases.....	47
II-2-3- Phosphatase alcaline.....	47
II-3- Étude des paramètres biochimiques tissulaire.....	48

II-3-1- Effet sur le taux des protéines hépatiques.....	48
II-3-2- Effet sur le taux des glucides hépatiques.....	49
II-3-3- Teneur en lipides	49
II-3-4- Effet sur le taux de GSH cytosolique.....	50
II-3-5- Effet sur l'activité de GST cytosolique.....	51
II-3-6- Effet sur le taux de MDA cytosolique.....	52
II-3-7- Effet sur l'activité de CAT cytosolique.....	52
II-3-8- Effet sur l'activité de GPx cytosolique.....	53
II-4-Étude des paramètres mitochondriaux	54
II-4-1-Variation du volume des mitochondries traitées par TiO ₂ et Fe ₃ O ₄ et leurs combinaisons avec le Dif-méth.....	54
II-4-2-Variation de la perméabilité mitochondriale lors de l'injection du Ca ²⁺	55
II-4-3- Activité de Catalase mitochondrial.....	55
II-4-4- Activité de GST mitochondrial.....	56
II-4-5- Activité de GPx mitochondriale.....	57
II-4-6-Taux du MDA mitochondrial	57
II-4-7-Taux de GSH mitochondrial	58
II-4-8-Taux de cytochrome C mitochondrial.....	59
III-Discussion	
III-1- Poids corporels et poids relatif de foie.....	59
III -2- Paramètres biochimiques sanguins.....	59
III-3- Stress oxydatives.....	63
III-4- Étude subcellulaire.....	66
IV-Conclusion et perspective.....	70
Références.....	71
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre de tableau	Page N°
01	Propriétés physico-chimiques des oxydes de fer	09
03	Résumé des effets pharmacologiques de la curcumine	21

Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
01	les différents domaines d'application des oxydes de fer	09
02	Illustrations de Curcuma Longa,	14
03	La plante C. longa dont dérive la diferuloyl-méthane et ses structures chimiques	16
04	Constituants de <i>Curcuma longa</i>	16
05	Effets potentiels de la curcumine sur de nombreuses affections	17
06	Structure chimique de la curcumine : 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy-phényl) hepta-1,6-diène-3,5-dione	18
07	Isolement, extraction, structure, usages et changement de couleur en fonction du pH	19
08	Métabolisme de la curcumine dans le foie	20
09	effets pharmacologiques de la curcumine	20
10	Mode d'Action des Curcuminoides	22
11	Rat male Rattus rattus de la race wistar	25
12	La mesure de poids des rats à l'aide d'une balance électronique	27
13	Prélèvement des foies	28
14	Extraction des glucides. Lipides et protéines	33
15	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	43
16	Variations du gain du poids corporel chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	44
17	Variations de poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités Après 28 jours de traitement	45
18	Variations de la concentration sérique en urée chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	46
19	Variations de la concentration sérique en créatinine chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	46

20	Variation de l'activité enzymatique de TGO et TGP chez le lot témoin et les lots Traités après 28 jours de traitement	47
21	Variation de l'activité enzymatique de la PALc chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	48
22	taux des protéines totales chez les lots traités et témoins après 28 jours de traitement	48
23	Variation du taux des Glucide ($\mu\text{g/g}$) chez les rats témoins et traités après 28 jours de traitement.	49
24	Taux des lipides totaux chez les lots traités et témoins après 28 jours de traitement	50
25	Variation de la teneur en glutathion (GSH) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement.	50
26	Variation l'activité enzymatique de (GST) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	51
27	Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	52
28	Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	53
29	Variation de l'activité enzymatique de GPx cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	53
30	Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées par TiO ₂ et Fe ₃ O ₄ et leurs combinaisons au Dif-méth en fonction du temps après 28 jours de traitement	54
31	Effets deTiO ₂ , Fe ₃ O ₄ et le Dif-méth sur la perméabilité mitochondriale après l'addition du Ca ²⁺	55
32	Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique chez le témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	56
33	Variations de l'activité enzymatique de la GST mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	56

34	Variations de l'activité enzymatique de la GPx mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	57
35	Variations des taux du MDA mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	58
36	Variations des taux de GSH mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	58
37	Taux de cytochrome C chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement	59

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
ADN	Acide ribonucléique
NPs	Aluminium
Al ₂ O ₃	Alumine
BBC	Microlitre Bleu brillant de coumassie
°C	Celsius
CDNB	1-chloro2, 4 di nitrobenzène
Ca ⁺⁺	Calcium ⁺⁺
CAT	Catalase
C	Concentration
Cd	cadmium.
Cm	Centimètre
Cu ²⁺	ion cuivrique
COX2	Cyclooxygenase
Cu	Le cuivre
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EGF	Epidermal growth factor
E 171- TiO ₂	Dioxyde de titane (colorant alimentaire blanc)
EOA	Espèces oxygénées actives
ERO	Espèces réactives oxydantes
EDTA	Acide ethylène diamine tétra acétique
FGF	Fibroblastgrowth factor
Fe	Le fer
Fd	Facteur de dilution
GPx	Glutathions peroxydases
GST	Glutathion-S-transférase
GSSG	Glutathion oxydé
GSH	Glutathion
G	Gramme

GR	La glutathion réductase
H	Heure
H₂	Dihydrogène
H₂O	Eau
HO	hydroxyle.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO₂[•]	Radicalhydroperoxyde
HCl	Acide chlorhydrique
HOCl	Acidehypochlorique
Inos	Inducible nitric oxide synthase
K	kelvin unité système international de température thermodynamique
K /j/mol	Kilo/joule /mole
KHz	Kilohertz
Kg	Kilogramme
LOX	protein-lysine 6-oxidase
L	Longueur
MDA	Malonyldialdéhyde
Mg	Milligramme
ml	Millilitre
Min	Minute
M	Mole
M⁻¹cm⁻¹	Mole⁻¹ centimètre⁻¹
mg/ml	Milligramme/millilitre
Mn	Manganèse
Nm	Nanomètre
NaOH	hydroxyde de sodium
NO[•]	Monoxyde d'azote
NO₃⁻	Peroxynitrite

Liste des abréviations

NP	Nanoparticules
O ₂	Oxygène
OH [•]	Radical hydroxyle
O ₂ ⁻	L'anion superoxyde
PbO ₂	le dioxyde de plomb
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PL	Phospholipides
P	risque d'erreur
Pb	Plomb
Ppm	partie par million
RL	Radical libre
ROS	Réactiveoxygènespécies
R [•]	Radical
ROO [•]	Radicaux pyroxydes
ROOH	Hydroperoxydelipidique
RO [•]	alkoxyradical.
RNS	Espèces réactives de l'azote
Se	Le sélénium
Si	Silice
SOD	Superoxyde dismutase
S	Seconde
TCA	Acide trichloro-acétique
TP	Tampon phosphate
Ti	Titane
TiCl ₄	Tétra chlorure de titane
TiO(OH) ₂	oxyde de titane-dihydroxyde
TRIS	Tris-hydroxyméthyl-aminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-
TiO ₂	dioxyde de titane

Liste des abréviations

TNF-α	facteur de nécrose tumorale alpha.
UV	ultraviolet.
V	Volume
T	Temps
TBA	Acide thiobarbiturique
t/min	Tour/minute
Vt	Volume total
Ve	Volume de l'extrait enzymatique
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Zn	Le zinc
4-HNE	4-hydroxynonéal
%	Pourcentage
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μmol	Micromole
Mm	Micromètre=10⁻⁶m
Fe₃O₄	Oxyde de fer



INTRODUCTION

Introduction

Depuis plusieurs années, l'intérêt dans la recherche en nanotechnologie s'accroît de façon qui se concentre sur les particules qualifiées de particules ultrafines dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres encore appelé nanoparticules (NPs). Leurs propriétés physiques, chimiques, voire biologiques découlent spécifiquement de cette taille nanométrique (**Baratli, 2015**).

Les champs d'applications des nanoparticules sont déjà très nombreux (produits cosmétiques, agroalimentaire, électronique) (**Vanessa, 2015**). En particulier, dans un cadre plus spécifique de la médecine constitue un des enjeux actuels majeurs. Notamment, ce domaine d'application des nanoparticules devrait permettre d'améliorer la détection précoce de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses) permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de leur traitement (**Anass, 2013**).

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

Le dioxyde de titane est appliqué dans plusieurs secteurs industriels. En plus du domaine traditionnel de la peinture, on assiste à un engouement pour l'utilisation dans d'autres domaines émergents notamment la photo catalyse, avec des approches innovantes et originales. TiO_2 est également utilisé comme revêtements pour la protection contre la corrosion (**Ngaotrakanwivat et al., 2003**) d'une nouvelle génération de piles solaires sensibilisées (**O'regan et al., 1991**). et en matériaux photochromiques (**Naoui et al., 2004; Ohko et al., 2003**).

Cependant, malgré des bénéfices potentiels importants dans de nombreux domaines mais l'utilisation croissante des NPs soulève des inquiétudes quant à leur

éventuelle nocivité. En effet, les données épidémiologiques ainsi que les caractéristiques des nanoparticules sont autant d'information ayant incité la communauté scientifique à s'interroger sur les risques potentiels de ces matériaux sur la santé (**Bousalem, 2017**).

La nanotoxicologie s'intéresse particulièrement aux risques associés aux NPs puisqu'elles sont retrouvées tant au niveau domestique dans les produits de consommations (écrans solaires, cosmétiques) (**Nohynek et al., 2007**) qu'au niveau industriel dans les usines de fabrication. Les NPs possèdent des propriétés qui résultent du fait de leur très petite dimension (**Shvedova et al., 2009**) qui se situe entre les atomes et les molécules (**Hoet et al., 2004**). La taille nanométrique de ces particules leur confère une grande aire de surface car la majorité des atomes les composants se retrouvent à leur surface. Ainsi, plus grande est l'aire de surface, plus grand sera le nombre d'atomes se trouvant au pourtour des NPs, leur allouant des propriétés réactives prééminentes par rapport à leurs homologues micrométriques (**Yang et al., 2008**). De plus, les voies d'exposition potentielles aux NPs sont nombreuses (inhalation, ingestion et cutanée) (**Pelley et al., 2009**). C'est pourquoi, des auteurs ont suggéré que les études de nanotoxicité soient basées sur l'induction du stress oxydatif (**Shvedova et al., 2010; Xia et al., 2006**). Les effets toxiques des nanoparticules métalliques sur le foie (hépatotoxicité) sont aujourd'hui une préoccupation majeure en nanomédecine, car le foie est souvent le premier organe qui entre en contact avec les NPs après leur ingestion. (**Yoosefi et al., 2016**)

Dans l'ensemble des tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès (**Pincemail et al., 1999**). Dans ce cas, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre (**Pincemail et al., 2000**). Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution et certaines pathologies comme le diabète, le cancer, le SIDA, l'inflammation, pathologies cardiovasculaires) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Pincemail et al., 1999 ; Pincemail et al., 2000**). Les antioxydants jouent un rôle majeur dans la protection contre les dommages oxydatifs moléculaire (**Evans, 2007**).

En effet, L'élicitations des espèces réactives oxygénées (ROS) et du stress oxydatif cellulaire, entraînant par la suite des dommages oxydatifs aux macromolécules

biologiques, la dysfonction cellulaire et les morts cellulaires sont généralement considérés comme les mécanismes impliqués dans la toxicité des nanomatériaux (Nel et al., 2006 ; Prabhakar et al., 2012; Oberdörster et al., 2005).

Le curcuma, aussi appelé « safran des Indes » est une plante herbacée vivace, de la famille des zingibéracées, originaire du sud de l'Asie. Dans la médecine ayurvédique le rhizome du curcuma, séché et réduit en poudre, est utilisé pour le traitement des voies respiratoires (asthme, hyperactivité bronchique, allergie), ainsi que pour certains troubles hépatiques, l'anorexie, les rhumatismes et les infections. Dans la médecine hindoue (Adams et al., 2004)

Le Dif-méth a démontré ses bénéfices cliniques dans de nombreux domaines thérapeutiques. Cependant, la biodisponibilité de la curcumine native est faible et sa métabolisation importante. Pour atteindre des doses efficaces de curcumine, qui dépassent de loin celles que peuvent fournir une consommation normale de curcuma, diverses stratégies ont été identifiées par l'industrie pharmaceutique (Anamika, 2012)

L'amélioration de ces paramètres pharmacocinétiques est rendue possible grâce à l'ajout de différents adjuvants comme la pipérine, les gingérols ou encore par l'utilisation de procédés biotechnologiques comme la γ -cyclodextrine et les micelles NovaSOL[®]. La sécurité d'utilisation de ces ingrédients, combinés à une meilleure biodisponibilité (Anamika, 2012)

L'intérêt de la recherche scientifique pour les propriétés cliniques de Dif-méth s'est fortement développé. En effet, le nombre de publications est passé de 10 entre 1991 et 2000 à 52 entre 2001 et juillet 2012. De nombreuses voies de signalisation sont modulées par la curcumine dont des cytokines pro-inflammatoires, des protéines apoptotiques, le facteur NF-kB, la protéine C-réactive, l'antigène prostatique spécifique, etc. (Subash et al., 2013). Cela se traduit par des effets pléiotropiques désormais bien décrits, elle a démontré son efficacité dans de nombreux domaines thérapeutiques dont certains types de cancers, de maladies cardiovasculaires, en rhumatologie, certaines maladies neurologiques ou encore des troubles gastro-intestinaux (Anand et al., 2007).

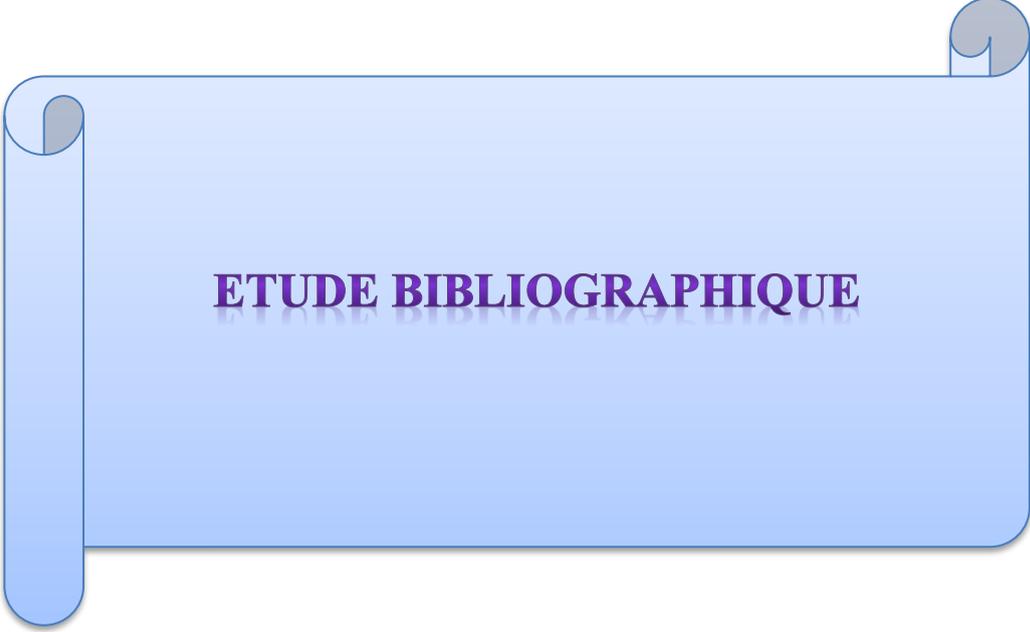
L'objectif principal de cette recherche est à étudier en premier lieu les effets toxiques de TiO₂, Fe₃O₄ sur un modèle biologique les rats wister au niveau cytosolique et mitochondrial suite à une exposition orale répétée pendant 28 jours, et en deuxième lieu à évaluer l'effet opposé du diferylol-méthan contre la toxicité de ces deux nanoparticules.

Ce travail comporte deux parties importantes :

Étude bibliographique qui présente quelques connaissances sur :

- ✚ Le dioxyde de titane et l'oxyde de fer: ses propriétés physicochimiques, sa toxicité et son mécanisme d'action.
- ✚ diferylol-méthan : ses propriétés physicochimiques, sa toxicité et son mécanisme d'action.

Une partie expérimentale regroupe l'ensemble des résultats obtenus sur l'évaluation de la toxicité (croissance générale), l'étude des paramètres biochimiques et enfin l'exploration du statut antioxydant des bio marqueurs du stress oxydant ainsi que par l'étude subcellulaire (gonflement et perméabilité mitochondriale et dosage de quelques enzymes de stress oxydatif du tissu hépatique).



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur les nanomatériaux

Les nanoparticules (NPs) sont des structures composées de quelques centaines de milliers d'atomes. Du fait de leur taille (1 à 100 nanomètres), les propriétés physiques et chimiques de ces nano-objets sont différentes de celles des matériaux classiques de taille supérieure, en particulier une réactivité de surface très élevée. Leur champ de développement est extrêmement vaste et inclut la recherche médicale (**Chuto et al., 2009**)

I-1- Le dioxyde de titane (TiO₂)

Le dioxyde de titane est une substance composée d'oxygène (O) et de titane (Ti). Son nom (lorsque que l'on le trouve à l'état naturel) est Titanium dioxyde (nom anglais). Il est présent dans la nature sous forme de sel minéral naturel. Il faut ensuite le purifier avec un procédé chimique (**Mohamed, 2011**) Il appartient à la famille des oxydes métalliques de transition. Il est utilisé comme pigment blanc dans les peintures, les plastiques et dans le papier, ainsi comme additif dans les aliments et aussi dans le domaine pharmaceutique (**Krug et al., 2012**)

I-1-1- Origine du TiO₂

Le titane est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium. Le titane y est majoritairement retrouvé sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite (FeTiO₃), la pérovskite (CaTiO₃) ou bien la titanite (CaTiSiO₅). Le titane peut être obtenu par un procédé d'extraction utilisant des chlorures. Cette technique optimisée par le chimiste français Henri Sainte-Claire Deville permet d'obtenir le tétrachlorure de titane (TiCl₄) qui peut ensuite être réduit via le « procédé Kroll » pour obtenir du titane solide pur. Le TiO₂ peut également être extrait des différents minerais par des traitements à l'acide sulfurique produisant le sulfate de titanyle (TiOSO₄). Ce composé peut ensuite être hydrolysé et déshydraté pour donner du TiO₂ (**Ferin et al., 1992; Combres, 1997**)

I-1-2- Principales applications

Du fait de ces propriétés, on peut trouver différents champs d'applications pour le TiO₂, micrométrique tout d'abord puis nanométrique à présent

I-1-2-1- Applications utilisant le principe de la photo-catalyse

Le principe de la photo-catalyse est utilisé pour diverses applications comme la dépollution de l'air, le traitement des eaux usées et la décontamination. Les NPs de TiO₂ peuvent en effet catalyser la dégradation des dérivés d'arsenic contenu dans les eaux usées (Carlson, 2008), désinfecté en détruisant des agents pathogènes (Chabas et al., 2010) ou encore dégrader des espèces organiques (Biswas et al., 2006; Changet al., 2013). Le TiO₂ peut également être utilisé pour la fabrication de revêtements autonettoyants. La dimension nanométrique permet en outre d'allier la transparence des fenêtres avec les propriétés de photo-dégradation des saletés déposées (Chen et al., 2007; Chen et al., 2014). Les propriétés photo-catalytiques peuvent enfin permettre de réaliser le craquage de l'eau en H₂ et O₂ pour des applications énergétiques (Cheng et al., 2014)

I-1-2-2-Comme pigment

Un peu moins de 4 millions de tonnes de TiO₂ sont consommés dans le monde chaque année. Son indice de réfraction et sa blancheur font qu'il est utilisé dans les peintures, revêtements, plastiques, encres comme pigment.

I-1-2-3- Utilisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique

Le TiO₂ micro- et nanométrique est également utilisé comme colorant alimentaire sous le nom de E171 (Ader et al., 2006; Biswas et al., 2006). On le retrouve enfin dans certains dentifrices et médicaments principalement en tant qu'excipient ou fluidifiant (Cherukuri et al., 2006; Combres, 1997)

I-1-2-4- Dans les écrans solaires

Le TiO₂ est beaucoup utilisé dans l'industrie cosmétique comme pigment mais aussi comme écran solaire, du fait de son indice de réfraction et de ses propriétés d'absorption d'UV, car les absorbeurs d'UV minéraux, entraînent moins de problèmes de photo allergie que les absorbeurs d'UV chimiques. De plus, le TiO₂ nanométrique est plus intéressant que le TiO₂ micrométrique pour les crèmes solaires car il laisse moins de traces sur la peau (Baillie et al., 2007)

I-1-2-5- Dans les implants biologiques

Le TiO₂ micrométrique a longtemps été considéré comme un matériau inerte, ce qui en faisait un bon composant des implants biologiques (Afyaa et al., 2016). De plus, la présence de TiO₂ nanométrique dans les implants biologiques permet d'augmenter la

prolifération et la différenciation cellulaire, ce qui augmente la biocompatibilité de l'implant comparé aux implants contenant du TiO₂ micrométrique (Afyaa et al., 2016).

I-1-3- Propriétés physiques

Le dioxyde de titane est un solide blanc réfringent, thermostable, Il est commercialisé sous forme de poudre ou de dispersion dans un liquide. Il est inodore, insoluble dans l'eau, dans l'éthanol et autres solvants organiques, il absorbe les rayons ultraviolets : le degré d'absorption de ces rayonnements UV dépend de la taille des particules. La forme rutil est plus dense et plus stable thermodynamiquement que la forme anatase (Argot et al., 2013).

I-1-4- Propriétés chimiques

Le dioxyde de titane non « ultrafin » est un produit très peu réactif. Il n'est pas attaqué par les acides chlorhydrique ou nitrique, mais attaqué par l'acide sulfurique concentré chaud ainsi que par l'acide fluorhydrique avec lequel il forme l'acide fluotitanique, Il peut également être attaqué par les bases concentrées. Le lithium, le magnésium et le zinc peuvent réduire le dioxyde de titane (Argot et al., 2013).

En raison de leur surface spécifique plus élevée, les nanoparticules de dioxyde de titane présentent des propriétés photocatalytiques améliorées par rapport aux particules de plus grande taille : elles sont susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singlet, radical superoxyde) après exposition aux rayons ultraviolets et réactions avec l'eau ou l'oxygène (Argot et al., 2013).

I-1-5- Toxicité des nanoparticules de TiO₂

La grande réactivité des NP de TiO₂ leur confère de nombreuses applications industrielles. Mais le corolaire est qu'elle leur confère également une toxicité potentiellement plus élevée que pour les particules de taille supérieure, plus inertes Par ailleurs du fait de leur petite taille, les NP ne partagent pas forcément les mêmes mécanismes d'entrée dans les systèmes biologiques que les particules plus grosses et pourraient être internalisées en plus grande proportion que celles-ci

Il en résulte une modification potentielle à la fois du danger et de l'exposition et donc du risque associé à la manipulation de ces nanomatériaux par rapport à leurs homologues nonnanométriques. Du fait de la large gamme d'applications des (nano) particules de TiO₂, l'homme peut entrer en contact avec elles par inhalation, ingestion ou contact cutané (l'exposition par injection intraveineuse reste pour l'instant

négligeable dans la mesure où les applications de ces (nano) particules en nanomédecine sont à ce jour limitées) . Les deux dernières voies d'exposition (ingestion et contact cutané) concernent plutôt les étapes d'utilisation du TiO₂ (en tant que pigment : alimentaire (composé d'environ 36% de NP cosmétique (taille moyenne inférieure à 50 nm L'exposition par inhalation est en revanche susceptible d'intervenir au cours de l'ensemble des étapes du cycle de vie de ces NP : lors de leur production, de leur utilisation (manipulation de poudres générant des aérosols, filtres solaires en spray, etc.) ou de leur fin de vie (aérosols générés par le vieillissement naturel ou le ponçage de peintures contenant des NP de TiO₂, etc.). Il s'agit de la première voie d'exposition de l'homme aux NP de TiO₂ en milieu professionnel (**Argot et al., 2013**).

I-2- Nanoparticules d'oxydes de fer

Les nano-objets d'oxyde de fer de formes géométriques (Fe₂O₃ et Fe₃O₄) font l'objet de nombreuses recherches sur leurs applications potentielles dans la médecine ainsi qu'ils sont utilisées dans des procédés industriels au cours desquels une exposition professionnelle peut se produire. Parmi les nanoparticules d'oxydes de fer, on distingue les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (appelées SPION) qui possèdent un corps d'oxyde de fer, et enveloppées par des matériaux inorganiques (tels que la silice, l'or) ou des matériaux synthétiques/naturels (tels que les phospholipides, acides gras, polysaccharides, les polymères naturels) (**Auffan , 2007**).

Ces SPIONs sont souvent classés en fonction de leur taille qui inclut le corps d'oxyde de fer et le revêtement/fonctionnalisation, appelé le diamètre hydrodynamique. Les SPIONs de taille comprise entre 60 et 150 nm (**Katia, 2001**) sont ceux utilisés en tant qu'agent d'IRM ou sont en phase de développement pour être employés en tant que système de délivrance de médicament (**Bechet et al., 2011**).

I-2-1- Caractéristique physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des oxydes de fer (hématite, magnétite et maghémite) à l'état massif sont rassemblées dans le **tableau 01**

Tableau 01. Propriétés physico-chimiques des oxydes de fer (Nadine et Mehrdji, 2016).

Oxyde de fer	Couleur	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Température de fusion (°C)	Masse volumique (kg.m ⁻³)
Hématite	Rouge à noir	160	1350	5260
Magnétite	Noir	232	1583-1597	5180
Maghémite	Marron	160	-	4870

I-2-2- Utilisation des nanoparticules du d'oxyde de fer

Les oxydes de fer ont un intérêt pour des applications dans de nombreux domaines scientifiques et industriels, y compris, les applications environnementales, la corrosion, la science du sol et de la biologie. La figure 01 résume l'ensemble de ces domaines (Cornell, Schwertmann *et al.*, 2000).

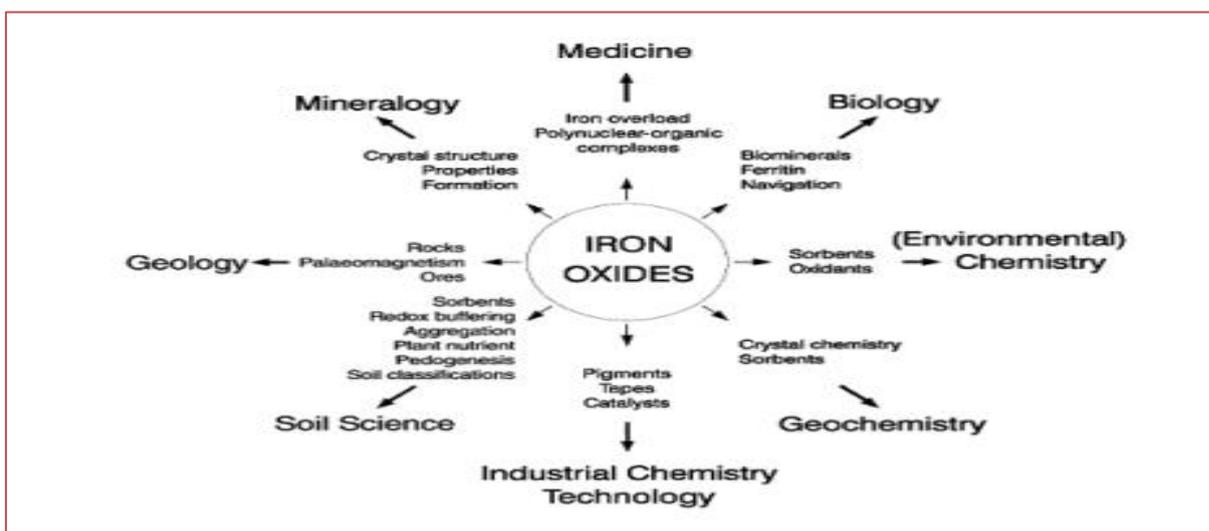


Figure 01 : les différents domaines d'application des oxydes de fer (Cornell et Schwertmann, 2003)

I-2-3- Toxicité de l'oxyde de fer

Les sels solubles de fer, comme ceux trouvés dans les comprimés usuels de fer consommés dans le traitement ou la prophylaxie de l'anémie ferriprive, sont potentiellement très toxiques (**Milosevici, 2009**). Lors de doses excédant 0.5 mg de fer, les effets toxiques avec vomissements, ulcérations de la muqueuse gastrointestinale, et saignements intestinaux peuvent se produire. Dans les cas graves, des dommages au foie et au rein peuvent également se produire (**Delmar , 2009**).

- ✚ Effets toxiques de l'oxyde de fer par inhalation
- ✚ Blocage mécanique des voies respiratoires supérieures.

Une augmentation de la prolifération cellulaire pulmonaire et à un accroissement du nombre de granulomes pulmonaires multifocaux (**Warheit et al., 2004**). Provoquer des changements radiologiques pulmonaires dus au dépôt des particules de fer inhalées (**Lei, 2013**). Pigmentation de fer du poumon, et poumon du soudeur, reflétant le fait qu'on l'a rencontrée dans beaucoup de groupes professionnels exposés aux fumées d'oxyde de fer, y compris les polisseurs d'argent. La plupart des spécialistes considèrent ces changements radiologiques du poumon comme bénins sans aucune

- ✚ influence sur la fonction pulmonaire et ne progressant pas vers la fibrose) (**Hagens et al., 2007**).

I-3- Mécanismes de toxicité des nanoparticules

La toxicité des NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) est un sujet de recherche en pleine expansion depuis le milieu des années 2000. Les principaux mécanismes de toxicité rapportés sont liés à l'inflammation, au stress oxydant et à la génotoxicité. Ces effets seront détaillés dans les paragraphes suivants.

I-3-1- Mort cellulaire

La mort cellulaire, même si elle peut être bénéfique dans la lutte contre les cancers, est un des premiers marqueurs de toxicité étudiés dans les tissus sains. Elle peut être déclenchée par la cellule elle-même en réponse par exemple à une accumulation trop importante de dommages à l'ADN. (**Ahamed et al., 2008**) On parle dans ce cas de mort programmée, qui est généralement assimilée à de l'apoptose. L'apoptose est également appelée « mort propre », dans la mesure où elle n'induit pas d'inflammation

dans les tissus environnants. A l'inverse la nécrose, longtemps considérée comme une mort subie, engendre une réaction inflammatoire. Les dernières avancées dans le domaine montrent qu'il existe de nombreux modes de mort cellulaire intermédiaires, comme par exemple la pyroptose et que ceux-ci peuvent être évités par d'autres processus comme l'autophagie, qui permet l'élimination et le recyclage de structures cellulaires ou d'organites entiers endommagés. De nombreuses études ont rapporté l'induction d'apoptose à la suite d'expositions aux NP de TiO₂ (**Manon, 2014 ;Franco et al., 2009;Robertson et Orrenius, 2000**).

D'une manière générale il semblerait que l'apoptose induite par les NPs TiO₂, Fe₃O₄ soit le résultat d'une chaîne d'événements débutant par la peroxydation des lipides membranaires, menant à la déstabilisation des membranes cellulaires et en particulier lysosomales, d'où une libération de cathepsine et l'activation des caspases. (**Li, 1997 ; Vaux et Korsmeyer, 1999**)

Ces phénomènes pourraient en outre être liés à un impact des NP sur les mitochondries, mais sans que l'on sache vraiment s'il s'agit d'un événement amont ou aval (résultant du stress oxydant ou de la libération d'hydrolases provenant des lysosomes déstabilisés).Les perturbations lysosomales induites par les NPs pourraient également être des signes d'autophagie (**Biswas et al., 2006; Manon, 2014**).

Enfin quelques études relèvent également des signes de nécrose, mais dans une moindre mesure par rapport à l'apoptose (**Manon, 2014**)

I-3-2- Inflammation

Les revues de la littérature portant sur la toxicité des NPs TiO₂, Fe₃O₄ mentionnent toutes le fait que l'inflammation fait partie des principaux effets rapportés (**Manon, 2014**)

Les NPs TiO₂, Fe₃O₄ paraissent induire une plus grande inflammation *in vivo* que les particules micrométriques et ce aussi bien en conditions aiguës que sub-chroniques (**Manon, 2014**). Cela peut être dû au fait que les NP possèdent une plus grande surface spécifique, sont bien moins efficacement phagocytées et éliminées par les macrophages alvéolaires que les particules micrométriques et pénètrent ainsi en plus grande proportion dans les cellules épithéliales, dans l'interstitium et la circulation lymphatique (**Manon, 2014**)

Enfin de nombreuses études *in vivo* ou *in vitro* indiquent des modulations de l'expression de gènes ou de protéines impliqués dans des phénomènes inflammatoires (Manon, 2014)

I-3-3- Stress oxydant

Le stress oxydant fait partie des principaux effets toxiques des NP de TiO₂ rapportés dans la littérature. Les revues portant sur le sujet le lient intimement avec les dommages oxydatifs à l'ADN.

Cependant nous traiterons ici la question de ces dommages dans le paragraphe suivant. De même des études mentionnent un lien entre le stress oxydant généré par les NP de TiO₂ et l'initiation de réponses inflammatoires via des cascades de signalisation cellulaires croisées. Les preuves du déclenchement d'un stress oxydant par les NP de TiO₂ se traduisent principalement par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species), une diminution des réserves cellulaires en antioxydants (glutathion, etc.), une oxydation des molécules biologiques (peroxydation des lipides en particulier) et le fait que le prétraitement avec des antioxydants diminue l'amplitude de ces effets. Il semblerait que le rutilite conduise principalement à la génération de •OH, tandis que l'anatase produirait plutôt des espèces O₂•-, H₂O₂ et radicaux peroxydes. (Ning *et al.*, 2008)

I-3-4- Génotoxicité

La génotoxicité, prélude d'une potentielle carcinogénèse, est sans doute l'effet toxique des nanomatériaux le plus étudié à l'heure actuelle, mais c'est également un des plus contro versés. Dans le cas des NP de TiO₂, tous modèles d'exposition confondus, le nombre d'études rapportant des effets positifs dépasse celui des études rapportant des effets négatifs (absence de génotoxicité), qui reste cependant non-négligeable. (Soohee et Doug-Young, 2013) En outre d'une manière générale les études *in vitro* génèrent plus de résultats de génotoxicité positifs que les études *in vivo*, ce qui révèle peut-être un biais dans les méthodes d'étude (Manon, 2014)

I-3-5- Carcinogénicité

La carcinogénicité fait partie des effets potentiels des NPs TiO₂, Fe₃O₄ même si de nombreuses étapes séparent l'apparition des premiers dommages à l'ADN et le développement d'une tumeur, la génotoxicité n'en demeure pas moins la première étape de la carcinogénèse. Comme évoqué précédemment, les études épidémiologiques chez l'homme suggèrent plutôt une absence de risque des particules de TiO₂ à augmenter la

fréquence des cancers chez les personnes exposées. (**Manon, 2014 ; Soohee et Doug-Young, 2013**)

Cependant le faible nombre d'études et le fait que les niveaux d'exposition et la taille des particules soient rarement précisément caractérisés rendent leur interprétation difficile. Cette décision se base sur quelques études *in vivo* ayant en effet relevé l'apparition de tumeurs pulmonaires chez des animaux exposés par inhalation à des doses élevées de (nano) particules de TiO₂. (**Manon, 2014**)

II- Généralité sur le diféruoyl-méthane

II-1- Définition du curcuma

Le curcuma est une plante vivace appartenant à la famille Zingiberaceae. Le rhizome est la partie utilisée de la plante en tant qu'épice alimentaire, conservateur, et comme colorant des aliments et des textiles. Cependant, on l'utilise aussi depuis des siècles en médecine traditionnelle indienne et chinoise (Sikha et al., 2016)



Figure 02: Illustrations de *Curcuma Longa*, (Perry, 2008)

II-2- Etymologie

Le nom scientifique *Curcuma longa* fait allusion à sa forme allongée. Il se nommait jadis en sanscrit *Haridra* ou *Gauri* et en hindi *Haldi*. Il est connu par les arabes sous le terme de *Kourkoum*, d'où le terme européen *Curcumin*. Curcuma est connu depuis des millénaires surtout en Asie comme source d'épices et est apprécié par la médecine traditionnelle. Observé par Marco Paulo en Chine, il est parfois qualifié de safran indien, safran des Indes, safran du Sud ou safran des pauvres, bien qu'il soit très éloigné tant sur le plan botanique que sur le plan organoleptique du « vrai » safran issu de *Crocus sativus*. La ressemblance de sa poudre avec l'ocre minéral précieux a donné le terme turmérique (*turmeric* en anglais) souvent utilisé aux Indes et par les Anglais et qui dérive du latin *terra-merita* et du français médiéval *terre-mérite* (Lecerf, 2012)

II-3- Répartition géographique

Le curcuma est cultivé en Inde, au Sri Lanka, en Indonésie, en Chine, à la Jamaïque. L'essentiel de la production mondiale provient de l'Inde (80 %) (Bruneton, 2009)

II-4- Classification

D'après la classification phylogénétique, il existe de nombreuses espèces de *Curcuma* dont les propriétés sont exploitées en santé. Parmi ces espèces peuvent être citées le *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma amada*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma brog*, *Curcuma malabarica* ou encore *Curcuma sylvaticas* (**Pierre, 2014**)

Classe : Liliopsida

Sub-classe : Commelinids

Ordre : Zingiberales

Famille : Zingiberaceae

Genre : *Curcuma*

Espèce : *Curcuma longa* .

II-5- Description de la plante

Curcuma longa (famille des Zingibéracées) est une grande plante herbacée, vivace, robuste, qui pousse sous tous les climats tropicaux, pouvant atteindre 1,50 m de haut. Rhizome épais, charnu, ramifié (**Loap, 2008**)

- Ses feuilles sont très longues, oblongues à elliptiques, engainantes (**Boullard, 2001**) Feuilles vertes lancéolées, longues d'une cinquantaine de centimètres, à l'extrémité en pointe et engainées à leur base (**Loap, 2008**)
- Fleurs jaune pâle regroupées en un épiapical cylindrique.
- Le rhizome (La partie active) peut être globuleux, ou cylindrique et ramifié. Leur surface externe est gris-jaune, marquée par la cicatrice des racines. La section est franche et finement granuleuse, variant du jaune à l'orange sombre. Sur le plan microscopique, on distingue des cellules parenchymateuses entre lesquelles circule un réseau vasculaire. Les cellules des tissus profonds sont remplies de nombreux grains amylicés. On repique des tronçons de rhizome puis on récolte neuf mois après. On le fait bouillir, on ôte la peau, on le sèche au soleil, puis on le réduit en poudre. La poudre est jaune orangé, des cellules parenchymateuse est de nombreux grains d'amidon (**Loap, 2008**)

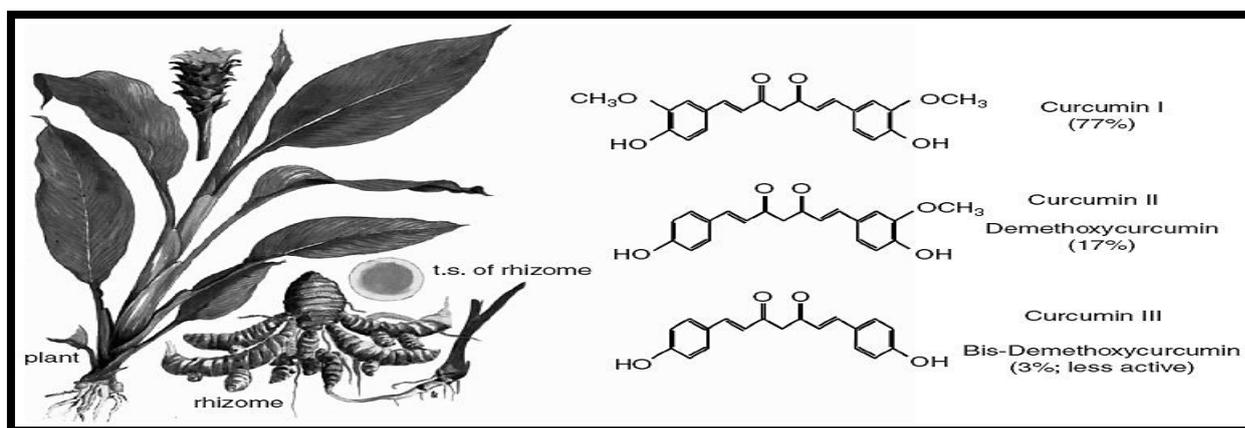


Figure 03: La plante *C. longa* dont dérive la diferuloyl-méthane et ses structures chimiques (Aggarwal et al., 2004)

II-6- Composition chimique

Les constituants de curcuma (*C. longa*) sont résumés dans le Figure 04.

Famille de constituants	Molécules
De 4 à 14 % d'une huile jaune orangé volatile (huile essentielle)	Cycles aromatiques
- monoterpènes	alpha-phellandrènes (1 %)
- sesquiterpènes	zingibérène, atlantone (25 %)
- cétones sesquiterpènes	50-60 % ar-turmérone (environ 60 %), turmérone
Pigments phénoliques appelés curcuminoïdes	- diferuloylméthane ou curcumine : de 0,3 à 5,4 %
	- bis-(4-hydroxy-cinnamoyl)-méthane (bisdesméthoxycurcumine)
	- 4-hydroxycinnamoylféruoylméthane (desméthoxycurcumine)
	- dihydrocurcumine, dérivé asymétrique, a aussi été isolée
Polysaccharides	Dont un arabino-galactane dénommé « uconane A »
Glucides	Amidon : 28 % glucose, 12 % fructose, 1 % arabinose
Divers	Résines, protéine, vitamines, minéraux

Figure 04 : Constituants de *Curcuma longa* (Loap, 2008)

II-7- Usages courants

Curcuma longa est cultivé pour ses rhizomes, d'abord comme colorant, ensuite comme épice pour la cuisine. En Afrique de l'Ouest, il est surtout utilisé pour teindre en jaune d'or des produits tels que le cuir tanné, les tissus en coton, le fil et les fibres de palme. Ses rhizomes servent aussi de produits de beauté pour le corps et le visage en Afrique et en Asie (Jansen et al., 2005; Jansen et al., 2005)

II-8- Usages en médecine traditionnelle

Le curcuma est décrit comme possédant un très large spectre d'actions dans plusieurs domaines : utilisations traditionnelles ou études scientifiques actuelles. En médecine traditionnelle, le curcuma peut être utilisé pour traiter les affections hépatiques, les helminthiases, éléphantiasis et autres parasitoses, les ulcères gastriques ou cutanés, l'eczéma, les maladies inflammatoires, les hémopathies, les vertiges et les gonorrhées (**Duke et al., 2002**)

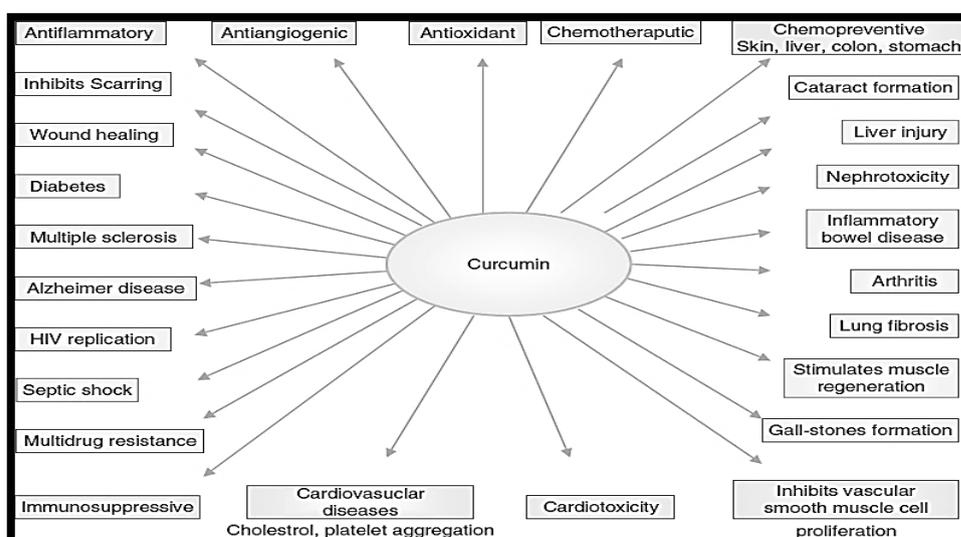


Figure 05: Effets potentiels de la curcumine (Dif-méth) sur de nombreuses affections (**Pulla et Lokesh, 1994**)

II-9- Définition de diferylol-méthan

Le Dif-méth, un polyphénol de couleur jaune. Il a été isolé la première fois en 1815, a obtenu sous forme cristalline, en 1870, et identifié comme étant le 1, 6-heptadiène-3,5-dione-1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -(1E, 6 E) ou diferuloyl-méthane (**Huet et Fleurentin, 2013**)

Le dif-méth est dérivé du safran des indes : le rhizome de l'herbe Curcuma. Chimiquement, c'est une tautomère cétonique-enol insaturé (généralement appelé diferuloyl-méthane). Traditionnellement, safran des indes a été employé dans des préparations thérapeutiques pour différents maux dans différents régions du monde (**Aounallah et Aouachia, 2015**)

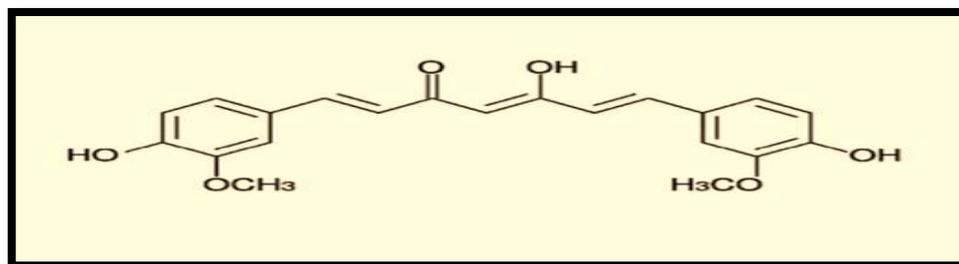


Figure 06 : Structure chimique de la curcumine : 1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxy-phényl) hepta-1,6-diène-3,5-dione (Kowluru et Kanwar, 2007)

II-9-1- Propriétés chimiques

- Dif-meth a été isolée pour la première fois en 1815 et obtenue dans la forme cristalline en 1870 (Aggarwal et al., 2004). En 1910, le squelette féruloyl-méthane de la curcumine a été confirmé et synthétisé par Lampe (Lamoureux et al., 2010)
- Dif-meth est une poudre jaune-orange qui est insoluble dans l'eau et l'éther mais soluble dans l'éthanol, le diméthyl-sulfoxyde et l'acétone (Aggarwal et al., 2003), il possède un point de fusion de 183°C, une formule moléculaire $C_{21}H_{20}O_6$, et un poids moléculaire de 368,37 g/mol (Aggarwal et al., 2003). l'onde maximale d'absorption dans le méthanol en spectrophotométrie se situe à 430 nm et dans l'acétone à 415-420 nm (Aggarwal et al., 2003). Une solution de dif-meth à 1% contient 1650 unités d'absorbance.
- La couleur de Dif-meth est jaune brillante à pH acide et rouge à pH alcalin le dif-méth existe sous forme énolique et β -dicétonique. Le fait que la forme énolique prédomine en solution a un important rapport avec la capacité de dif-méth à capter les radicaux libres (Shen, 2007)

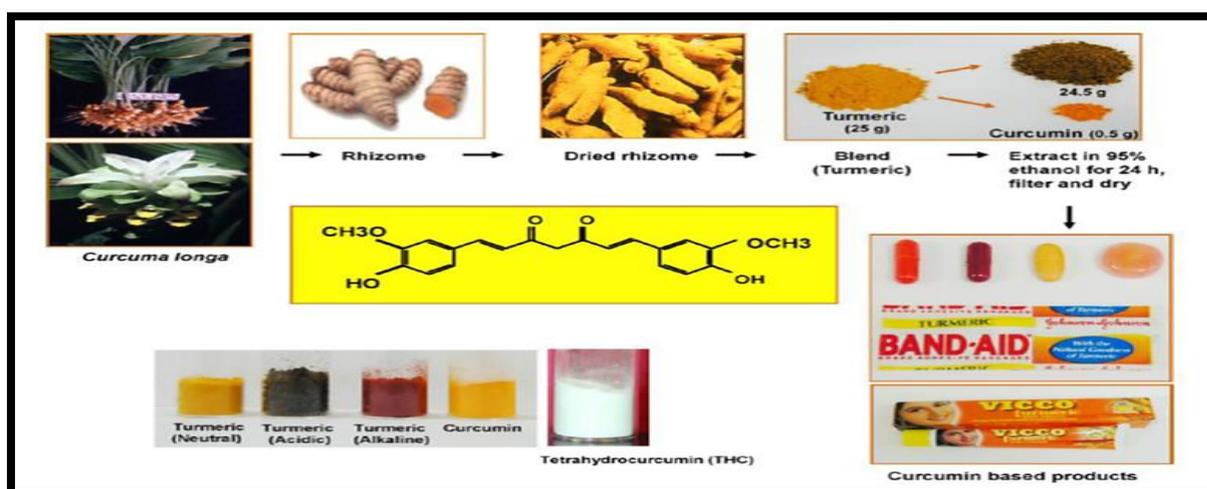


Figure 07 : Isolement, extraction, structure, usages et changement de couleur en fonction du pH (Lecerf, 2012)

II-9-2- Pharmacocinétique et métabolisme

II-9-2-1- Etude de l'absorption.

Des études chez l'homme ont montré que la biodisponibilité de dif-méth suite à une administration par voie orale était très faible.

Par exemple, lors d'une consommation journalière de 3,6 g de dif-méth, les concentrations de dif-méth détectées dans le sang sont proches des limites de détection (5 pmol/mL). Lors de l'administration à des doses inférieures, aucune trace de dif-méth ni de ses conjugués n'est détectée dans le sang (Sharma *et al.*, 2004). Il est à noter que l'absorption de dif-méth serait augmentée par l'administration concomitante de poivre (la biodisponibilité est multipliée par 20 dans cette étude) (Shoba *et al.*, 1998)

II-9-2-2- Etude de la distribution

En accord avec la très faible absorption, la distribution de dif-méth est négligeable. Mais la consommation journalière de 3,6 g/jour conduit à des concentrations de dif-méth détectables de la molécule dans la muqueuse du côlon que ce soit dans les tissus sains (12,7+/- 5,7 nmol/g) ou dans les tissus néoplasiques (7,7 +/- 1,8 nmol/g de tissu) (Sharma *et al.*, 2005)

II-9-2-3- Métabolisme

Le dif-méth serait partiellement métabolisée dans l'intestin avec particulièrement des phénomènes de sulfatation et de glucuronidation qui pourraient expliquer sa faible biodisponibilité (Sharma *et al.*, 2005)

La partie absorbée est quant à elle métabolisée par le foie (Figure 08).

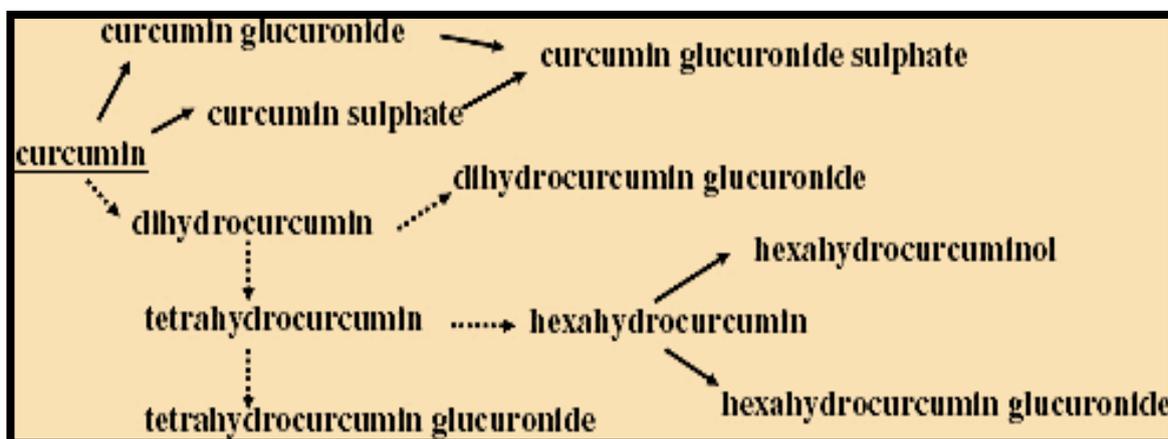


Figure 08 : Métabolisme de la curcumine (dif-méth) dans le foie (Sandur *et al.*, 2007)

Flèches pleines : voies métaboliques démontrées dans des cultures d'hépatocytes de rats ou humains, ou dans du plasma de rat *in vivo*.

Flèches en pointillés : voies métaboliques démontrées chez la souris *in vivo*.

II-9-2-4- Elimination

La curcumine est sujette à une excrétion urinaire et biliaire (Sharma *et al.*, 2005)

II-9-3- Toxicité

Aucun effet toxique majeur n'a été répertorié avec des doses orales allant jusqu'à 8 g/jour, à part quelques troubles gastro-intestinaux du type diarrhées et nausées, s'amendant spontanément sans interruption du traitement. Enfin quelques rares cas de dermatite allergique de contact ont été répertoriés (Bernard *et al.*, 2005)

II-9-4- Pharmacologie

Le dif-méth a fait l'objet de centaines de publications étudiant ses propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-cancéreuse et antinéoplasique, antidiabétique, antivirale, dans la prévention du cancer et de la maladie d'Alzheimer, le traitement des maladies cardio-vasculaires et de l'athérosclérose (Bernard *et al.*, 2005)

Type d'étude	Effets
Inflammation (Homme) Post-opératoire Polyarthrite rhumatoïde Uvéite antérieure chronique Pseudotumeur orbitale idiopathique chronique	↓ des marqueurs de l'inflammation ↓ de la symptomatologie Amélioration et ↓ des récurrences Réponse totale au traitement dans 50 % des cas
Cancer (Homme) Voies aérodigestives (localement) Lésions précancéreuses (vessie, peau, col de l'utérus, estomac, muqueuses digestives, Colorectaux avancés réfractaires)	↓ taille des lésions (10 % des patients) Amélioration histologique des lésions (15 à 50 % des patients selon le type de lésion) Stabilisation radiologique (13,3 % des patients)
Athérosclérose (Homme) Volontaires sains	↓ cholestérol total (11,6 %), ↓ des lipides peroxydés (33 %), ↑ HDL-Chol (29 %)
Diabète (rongeur) Rat diabétique albinos Souris diabétique (KK-Ay) Rat diabétique (streptozotocine)	Effet hypoglycémiant, ↓ Hb glyquée ↓ pic d'hyperglycémie ↓ lésions rénales, ↓ cataracte
Immunité Souris Rat, modèle d'allergies de type I et IV Homme, VIH+	↑ phagocytose macrophages péritonéaux Régulation prolifération des lymphocytes spléniques ↓ de la réaction allergique, ↓ libération d'histamine Pas d'effets
Chol = cholestérol. Hb = hémoglobine.	

Figure 09: effets pharmacologiques de la curcumine (Bernard *et al.*, 2005)

II-9-5- Un puissant antioxydant

Une des propriétés majeures de dif-méth est sa capacité à neutraliser les radicaux libres, notamment hydroxyle et anion superoxyde, induisant un effet protecteur contre les dommages radicalaires des lipides et de L'ADN. Il a été également montré que le dif-méth pouvait inhiber l'activité de la NOS inductible (iNOS), enzyme produisant le monoxyde d'azote (NO). (Edeas M, 2006)

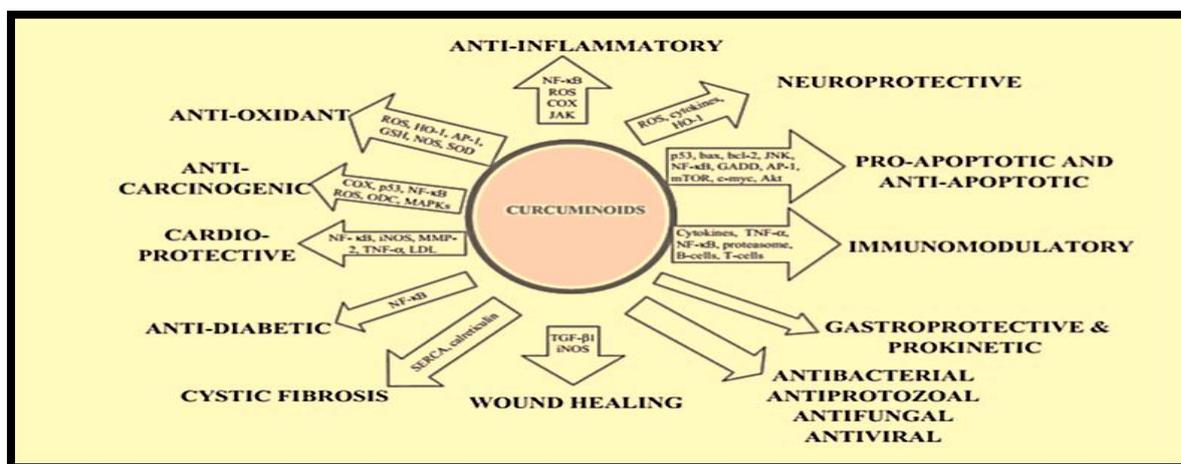


Figure 10 : Mode d'Action des Curcuminoïdes (Badmaev, 2009)

II-9-6- Dif-mét et inflammation

L'action anti-inflammatoire de Dif-méth, connue depuis des millénaires, est basée au niveau moléculaire sur ses effets inhibiteurs vis-à-vis de la COX-2, des LOX, de l'iNOS et de la production de cytokines. Du point de vue clinique, le Dif-méth a montré ses effets anti-inflammatoires chez l'homme par voie orale (doses de 375 à 1200 mg/jour) en situation post-opératoire, dans la prise en charge de la poly arthrite rhumatoïde (Edeas, 2006)

II-9-7- Problèmes digestifs

C'est un remède ancestral contre l'acidité gastrique et autres troubles digestifs, car il stimule la sécrétion de mucus et protège ainsi l'estomac. Il atténue aussi les nausées (Lahouel et al., 2016). Il est tout à fait indiqué dans les troubles digestifs liés à la paresse du foie.

II-9-8- Arthrite et allergies

Si le curcuma ne soulage pas les douleurs, son action anti-inflammatoire le rend néanmoins efficace en cas d'arthrite et autres affections inflammatoires comme l'asthme et l'eczéma (Lahouel et al., 2016)

II-9-9- Problèmes circulatoires

Le curcuma possède un effet hypocholestérolémiant, d'où son intérêt en prévention des risques cardiovasculaires (Lahouel et al., 2016)

II-9-10- Dermatologie

Appliqué sur la peau, le curcuma soigne plusieurs types d'affections dont le psoriasis et les mycoses (Lahouel et al., 2016)

II-9-11-Activité cytotoxique

L'activité cytotoxique ou anti tumorale de dif-méth est la plus étudiée. En **2002 Shim et al.** ont synthétisé des dérivés de dif-méth, de type hydrazino-curcumine (hydrazino-curcumine⁸⁴ et hydrazino-benzoyl curcumine⁸⁵). Le composé hydrazino-curcumine⁸⁴ inhibe fortement la prolifération des cellules endothéliales aortiques bovines (CEAB) à une concentration nanomolaire (CI50 = 520 nM), pour le dif-méth (CI50 = 15000 n M), sans cytotoxicité. Des tests *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'hydrazino-curcumine⁸⁴ peut aussi être considérée comme un nouveau candidat pour son activité anti-angiogénique.

II-9-12- Inhibition de l'angiogenèse

L'angiogenèse tumorale est un phénomène indispensable au développement de la tumeur qui génère la création d'un réseau vasculaire permettant de nourrir cette dernière en nutriments et en oxygène lorsque la diffusion passive ne suffit plus. L'angiogenèse est régulée par un équilibre entre les facteurs anti-angiogéniques (tels que l'angiostatine, l'endostatine et la thrombospondine, et les facteurs pro-angiogéniques) VEGF, FGF, PDGF, TNF α) ces derniers étant nettement surexprimés au niveau des cellules tumorales. L'inhibition de ce mécanisme réduirait considérablement les apports nécessaires à la tumeur et donc ses chances de résister (**Edeas, 2006; Yoosungnoen et al., 2006**)

II-9-13- Potentialisation des anticancéreux

Le dif-méth potentialise l'effet du cisplatine et de la doxorubicine sur le cancer du foie en diminution de l'expression des protéines anti-apoptose. Il potentialise aussi l'action de la vincristine et du méphalan sur des cellules de myélome multiple et du paclitaxel, de la doxorubicine et du 5-FU sur des cellules du cancer de la prostate (**Huet et Fleurentin. 2013**)



MATERIELS ET METHODES

I- Matériel et méthodes

I-1- Matériel

I-1-1-Matériel biologique

Pour notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur les rats mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar

Le rat est l'espèce la plus utilisée en nombre après la Souris. En pharmaco et toxicologie, le rat est devenu une espèce de choix en raison des similarités métaboliques avec l'espèce humaine, sa petite taille, sa nature relativement docile, sa faible longévité (2 – 3 ans), et sa courte période de gestation.

On distingue quatre grandes variétés de souches : les souches consanguines (in bred), les souches non consanguines (out bred), les hybrides de première génération et les souches mutantes. Il existe au total plus de 1400 souches et sous-couches répertoriées et utilisées en recherche biomédicale (**Descat, 2002**).

❖ Utilité en recherche

Après la souris d'expérimentation, le rat est le mammifère d'expérimentation le plus utilisé comptant pour à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés en recherche (**Festing, 1979**).

Depuis les quatre-vingts dernières années, le rat a été utilisé dans presque tous les aspects de la recherche biomédicale et comportementale et de la toxicologie. Une publication récente sur les applications en recherche biomédicale donne une liste de domaines de recherche dans lesquels le rat est largement utilisé et particulièrement utile: toxicologie, tératologie, oncologie expérimentale, gérontologie expérimentale, recherche cardiovasculaire, immunologie, recherche dentaire, immuno-génétique et parasitologie expérimentale (**Baker et al., 1980**).

De plus, le rat a été traditionnellement l'animal de choix dans beaucoup de projets de recherche sur la nutrition mais il ne faut pas oublier que son penchant naturel à la coprophagie peut être un facteur limitant sur son utilisation dans certaines de ces études

❖ **condition d'élevage**

Les expérimentations ont été effectuées au niveau de laboratoire de l'université L'Arbi Tébessi de Tébessa. Nous avons utilisé 30 rats blancs mâles *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut pasteur d'Alger (Centre d'élevages El Kouba, Alger), âgés de neuf semaines, d'un poids corporel vif moyen de 200 à 250 g. Après la souris d'expérimentation, le rat est le mammifère d'expérimentation de l'ordre des rongeurs le plus utilisé en recherche scientifique.



Figure 11: Rat male *Rattus rattus* de la race wistar

Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours, aux conditions de l'animalerie ; à une température de $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée quotidiennement

I-1-2- Matériels chimiques

Dans ce travail, nous avons utilisé d'une part les NPs à base d'oxyde de titane (TiO_2) et l'oxyde de fer (Fe_3O_4) pour le traitement des rats sous forme solution à une dose de 10 mg/kg/jours et d'autres parts la Curcuma (Diféruoyl-méthane) à une dose 20 ml/Kg/jours.

I-2- Méthode

I-2-1- Lotissement et traitement

❖ Lotissement

Les rats mâles ont été répartis en 06 groupes de 05 rats chacun, il s'agit de :

Lots n°1 : contient 05 rats comme témoin ne subit aucun traitement.

Lots n° 2 : contient 05 rats traités par TiO_2 en raison de 10 mg/Kg/ jour par voie orale

Lots n° 3 : contient 05 rats traités par Fe_3O_4 en raison de 10 mg/kg/ jour par voie orale

Lots n°4 : contient 05 rats traités par le diferylol-méthane en raison 20 ml/Kg/jour par voie orale

Lots n°5 : contient 05 rats traités par la mixture de TiO_2 /diferylol-méthane en raison de 10 mg/Kg et 20 ml/Kg par voie orale (chaque jour pendant 28 jours).

Lots n°6 : contient 05 rats traités par mixture de Fe_3O_4 / diferylol-méthane en raison de 10 mg/Kg et 20 ml/Kg par voie orale (chaque jour pendant 28 jours).

❖ Mesure du poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats tous les jours d'une façon régulière pendant la durée d'élevage, soit au cours d'adaptation ou traitement à l'aide d'une balance électronique.

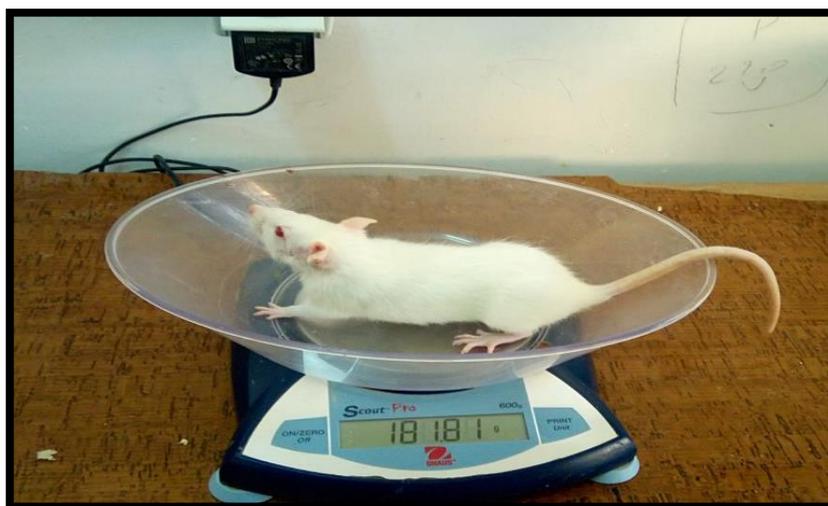


Figure 12 : La mesure de poids des rats à l'aide d'une balance électronique (photo personnel).

I-2-2- Sacrifice et prélèvement d'organes

Après 28 jours de traitement les rats de 06 lots ont été sacrifiés, les foies ont été rapidement prélevés après la dissection et rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0,9% puis pesées et conservées a température (-20°C), pour les dosages des différents paramètres. Le sang a été immédiatement recueilli dans les tubes héparines :

- Le sang contenu dans des tubes héparines a subi une centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques.



Figure 13 : Prélèvement des foies (photo personnel)

I-2-3- Méthodes dosage des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés sont : aspartate aminotransférase (TGO), alanine aminotransférase (TGP). Phosphatase alcalin (PAL), urée sanguin et la créatinine

I-2-3-1- L'aspartate aminotransférase (TGO)

❖ **Principe** : selon kit de Biomaghreb

Determination cinétique de l'activité Aspartate aminotransférase. La réaction est initiée par addition de l'échantillon au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :



Le taut de la diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité Aspartate amino transférase dans l'échantillon. (**Murray, 1984**)

❖ **Matériel et Réactif**

- Spectrophotomètre, micropipette, tube sec, étuve et centrifugeuse.
- Réactif 1(L- Aspartate) et Réactif 2 (Oxoglutarate).

❖ **Mode opératoire**

Le prélèvement du sang pour le dosage du TGO s'effectue dans des tubes héparines

- On prépare solution de travail 1000µl de réactive 1 avec 3000µl réactive 2

- On met 1000µl de solution de travail dans un tube sec
- On met 100µl de sérum du rat traité agité bien puis lire dans le spectrophotomètre à une longueur d'onde 340 nm

I-2-3-2- L'aspartate aminotransférase (TGP)

❖ **Principe** : selon kit de SPINREACT

❖ **Principe de la méthode**

L'alanine amino transférase (ALT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amonique d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et NADH: (**Murray, 1984**)



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon

❖ **Matériel et Réactifs**

- Spectrophotomètre, micropipette, tube sec, centrifugeuse et cuve.
- Réactif 1 (Lactate déshydrogénase LDH L-Alanine) et Réactif 2 (NADH α -Cétoglutarate)

❖ **Procédure**

- Préparation de la solution de travail: Mélanger 1 volume de (R2) Substrats + 4 volume (R1) Tampon. Stabilité: 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à température ambiante (15-25°C).
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée ou air.
- Pipetter dans une cuvette 1000µl de solution de travail avec 100µl de l'échantillon
- Mélanger et lire dans une longueur d'onde 340 nm.

I-2-3-3- Phosphatase alcalin (PALc)

La phosphatase alcaline (PALc) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et le phosphate (**Wenger et al, 1984**), selon la réaction



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact

Dans un tube sec 20µl d'échantillon (sérum) sont additionnés à 1.2 ml de réactif de travail [R2 (α Nitrophénylphosphate : 10 mmol/l), dissout dans le tampon ;

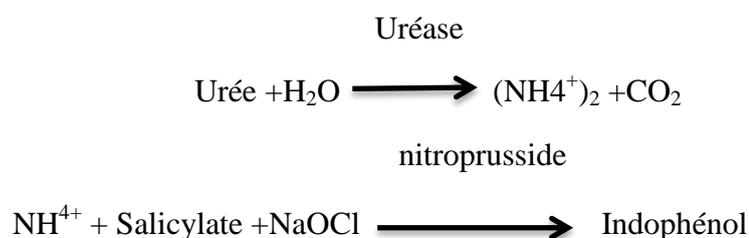
R1 (Diethanolamine pH10.4 : 1 mmol/l, Chloride se magnésium :0.5 mmol/l)], agitation, incubation pendant 01 minutes. Lecture de l'absorbance (A) à λ=405 nm chaque minute pendant 03 minutes.

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$$

I-2-3-4-Urée

Le dosage est réalisé sur le sérum par la méthode colorimétrique utilisant l'uréase selon la fiche technique Spinréact.

L'uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH⁴⁺) et le dioxyde de carbone (CO₂). Les ions NH⁴⁺ réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO), en présence de nitroprusside pour former l'indophénol de couleur verte (**Kaplan, 1984**), selon les réactions



Dans un tube sec 10µl d'échantillon sont additionnés à 1ml de réactif 1 [uréase 30000 U/L dissoute dans un tampon phosphate pH=6.7 : 50mmol/l contenant (EDTA : 2mmol/l, salicylate de sodium : 400mmol/l, nitroprusside de sodium : 10mmol/l) , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes , ensuite 1ml de réactif 2 (hypochlorite de sodium : 140mmol/l,hydroxyde de sodium : 150 mmol/l) est ajouté au mélange, , agitation, incubation à 37°C pendant 5 minutes, lecture contre un blanc réactif à 580 nm avec utilisation d'un étalon.

$$[\text{Urée}](\text{mg/dl}) = \frac{(A)\text{Echantillon}}{(A)\text{Étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

I-2-3-5- Créatinine

Ce dosage est basé sur la réaction de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin (NaOH) pour donner un composé coloré en jaune selon la réaction de Jaffé (**Murray, 1984**) et la fiche technique Spinreact

100 µl d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 1ml de réactif de travail [V/V : R1 : 17.5 mmol/l d'acide picrique + R2 : 0.29 mmol/l d'hydroxyde de sodium], agitation, lecture de l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2), à une longueur d'onde 492 nm. $\Delta A = A2 - A1$

$$[\text{Créatinine}] (\text{mg/dl}) = \frac{\Delta A \text{ Echantillon}}{\Delta A \text{ étalon}} \times 2 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

I-2-4- Dosages biochimiques :

I-2-4-1- Extraction des métabolites:

L'extraction des glucides, lipides et protéines des hépatocytes a été réalisée selon le procédé de (**Shibko et al., 1966**) selon la figure suivante :

➤ **Dosage des protéines totales :**

La concentration des protéines est estimée par colorimétrie selon la méthode de **Bradford (1976)** en utilisant le bleu brillant de Coomassie comme réactif. Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de Coomassie) sur les protéines au niveau des résidus basiques et aromatiques ce qui provoque une coloration bleue qui est mesurée à 595nm en utilisant une solution d'Albumine Bovine (1 g/l) comme standard.

➤ **Dosage des glucides :**

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de **Duchateau et Florkin, 1959**. La coloration obtenue par le réactif à l'anthrone est quantifiée à 620 nm en utilisant une solution de glucose (10 mg/ml) comme standard.

➤ **Dosage des lipides :**

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de **Goldsworthy et al., (1972)** qui utilise la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides à 2.5 mg/ml comme standard. Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100µl d'extraits lipidiques de levures témoins et traitées ou de la gamme étalon auxquels on ajoute 1ml d'acide sulfurique. Après agitation et chauffage à sec à 100°C pendant 10 min, les tubes sont refroidis et 200µl sont repris dans 2.5ml du réactif à la vanilline. Les tubes sont agités et mis à l'obscurité pendant 30 min pendant lesquels une coloration rose se développe. L'intensité de la coloration est ensuite lue à une longueur d'onde de 530

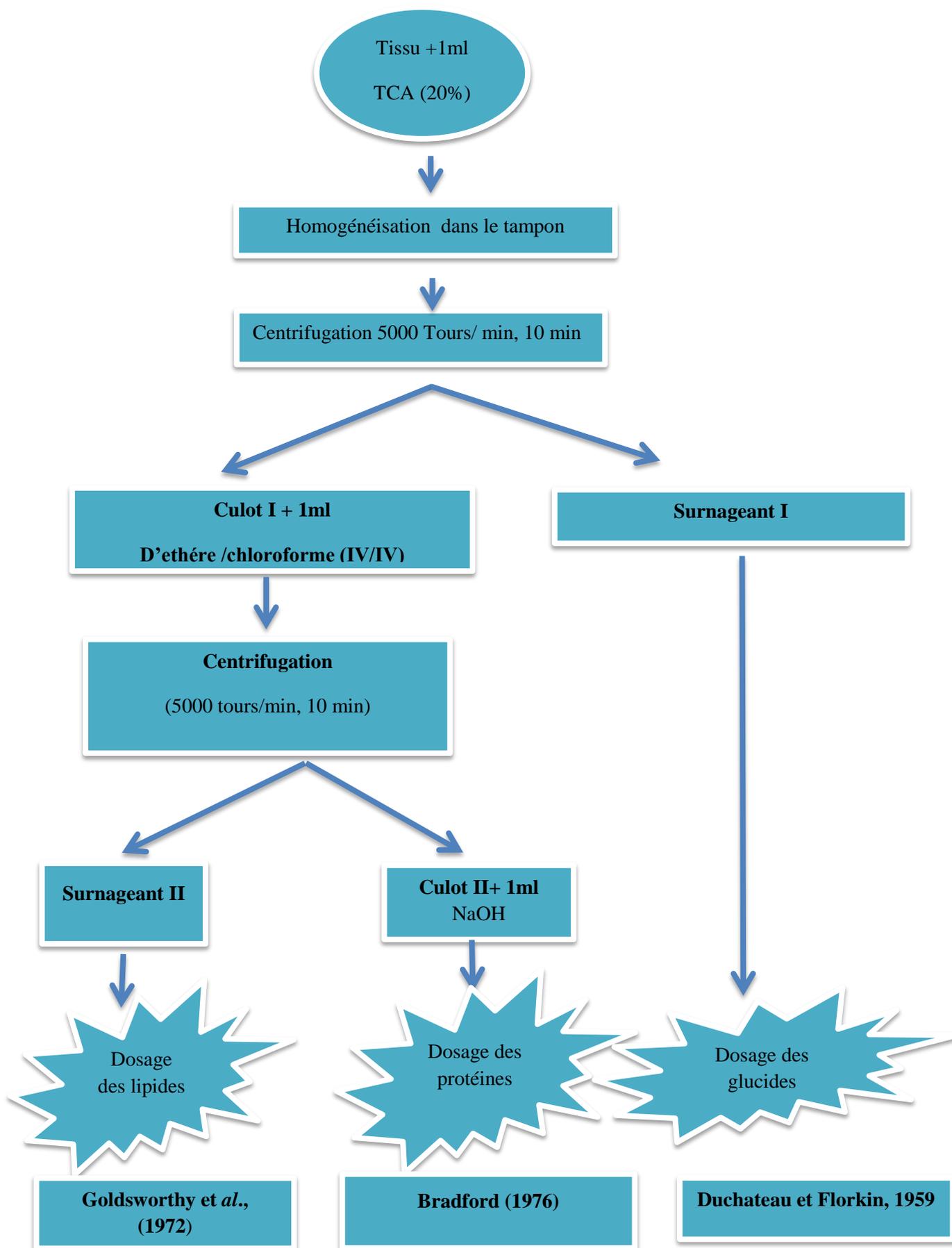


Figure 14 : Extraction des glucides. Lipides et protéines selon **Shibko et al. (1976)**

I-2-5- Etude biochimique et enzymatique :

I-2-5-1- Activité catalase :

Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), toxique pour la cellule, en eau et en oxygène moléculaire.

La technique utilisée est décrite par (**Cakmak et Horst, 2003**) qui consiste à suivre la disparition du peroxyde d'hydrogène par action de la catalase selon la réaction suivante :



Le protocole de dosage s'effectue de la manière suivante :

- Préparer les homogénats à partir de 1ml de culture avec tampon d'homogénéation TP (pH 7.4);
- Centrifuger à 3000 tours/min pendant 10 min;
- On prélève 100µl de l'extrait enzymatique brute (surnageant) + 500µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0.3 ml;
- On ajoute 2850µl de TP (50mM, pH 7.2);
- La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

La réaction est contrôlée par une lecture continue pendant 15 minutes durant 1 minute à une longueur d'onde à 240 nm.

$$\text{L'activité de CAT (MH}_2\text{O}_2\text{/min/m protéines)} = \frac{\Delta DO.VT}{\epsilon.L.X.Ve}$$

- **ΔDO** : Variation de la densité optique par minutes en fonction du temps.
- **ε** : Coefficient d'extinction du H₂O₂ (3900 µM⁻¹ .cm⁻¹. L).
- **L** : largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1cm).
- **X** : quantité des protéines en mg/ml.
- **Vt** : volume totale du mélange réactionnel en ml.
- **Ve** : volume de l'extrait enzymatique en ml

I-2-5-2- Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST)

❖ Principe de la méthode

La mesure de l'activité de GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec des glutathion sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340nm de longueur d'onde.

La méthode utilisée dans cette étude pour doser le GST est celle de (**Habig et al., 1974**) celle-ci consiste à faire agir le GST contenue 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 15 minutes durant 1 minute à une longueur d'onde de 340 nm. Selon les étapes suivantes:

- Les échantillons sont homogénéisés dans un 1ml de TP (0.1 M, pH 6);
- Centrifuger à 1400 tours/min pendant 30min;
- Récupérer le surnageant comme source d'enzyme;
- Prélever 200µl de surnageant et ajoute 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM);
- Le blanc contenant 200µl d'eau distillé remplaçant la quantité de surnageant.

$$\text{L'activité de GST} = \frac{DO \text{ échantillon} - DO_{\text{blanc}}}{9,6 \text{ mg de protéines}}$$

- DO: échantillon/min : densité optique de l'échantillon par minute.
- DO blanc/min: densité optique du blanc par minute.
- 9,6: coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM-1.cm-1.

I-2-5-3-Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

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



❖ Protocole expérimental

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

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante:

$$\text{GPx } (\mu\text{mol. mg de protéine}) = \frac{(\text{DOe} - \text{DOb}) \cdot 0,04}{\text{DOb}}$$

- **DO**: échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- **DO** étalon: Densité optique de l'étalon.
- **0.04**: Concentration de substrat (GSH).

I-2-6- Dosage des biomarqueurs non enzymatiques

I-2-6-1-Malonaldéhyde (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosé selon la méthode de **(Buege and Aust, 1984)**. Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) dans un milieu acide et chaud

(100°C) en donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

❖ Protocole expérimental

- Préparer les homogénats à partir de 1ml de culture avec tampon d'homogénéation TP (pH 7.4);
- Centrifuger à 3000 tours/min pendant 10 min;
- Prélever 375 µl de surnageant;
- Ajouter 150 µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4);
- Ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%);
- Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min;
- Prélever 400 µl de surnageant;
- Ajouter 80 µl d'HCl 0.6 M;
- Ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM);
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min;
- Lire La densité optique à $\lambda = 530$ nm.

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

$$[C] \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{ de protéine} \right) = \frac{DO \times 10}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

- **C** : la concentration en nmole/mg de protéines.
- **DO** : densité optique lue à 530 nm.
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56.10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- **L** : Longueur de la cuve utilisée (1cm).
- **X** : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)
- **Fd** : Facteur de dilution ($Fd = 0.2083$).

I-2-6-2-Dosage du glutathion (GSH)

❖ **Principe de la méthode**

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la densité optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman ou DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique à 0,25% afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion (Weeckbeker et Cory, 1988).

❖ **Protocole expérimental**

- Préparer les homogénats à partir de 1ml de culture avec tampon phosphate EDTA (0.02M)
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours/min pendant 5min
- Prélever 0,5 de surnageant
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0.02M d'EDTA, pH 9.6), 0.025ml de DTNB et 0.5ml du surnageant
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément
- Mesurer les absorbances à 412 nm contre le blanc.

La concentration du glutathion est obtenue après application de la formule suivante :

$$\text{GSH [M } \frac{\text{GSH}}{\text{Mg}} \text{ GSH/mg desprotéines]} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5}$$

- **DO** : la densité optique.
- **1**: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml de l'homogénat + 0.2ml de l'acide salicylique).
- **1,525** : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).
- **13100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à 412 nm).
- **0,8** : Le volume de l'homogénat.
- **0,5** : Le volume du surnageant trouvé dans un 1,25ml.

I-2-7- Étude subcellulaire

I-2-7-1- Isolement et gonflement mitochondrial

L'isolement des mitochondries a été effectué selon la méthode de (**Kristal et al., 1996**).

❖ Protocole expérimentale

- Préparer l'homogénat à partir de 2ml de culture de chaque érlenmeyer dans 4ml de tampon d'isolement (210 mM Mannitol, 70 mM saccharose, 1mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 7.5).
- Transférer l'homogénat dans des eppendorfs pour faire des centrifugations différentielles à 4°C (centrifugation réfrigérée):
 - ✓ La 1^{ère} centrifugation 1300 tours/min pendant 3 min.
 - ✓ La 2^{ème} centrifugation (pour le surnageant récupéré de la 1^{ère} centrifugation) 10000 tours/min pendant 10 min.
 - ✓ Jeter le surnageant et récupérer les culots qui contiennent essentiellement les mitochondries pures;
 - ✓ Laver les mitochondries 2 fois par le tampon d'isolement
 - ✓ Remettre le culot dans 1 ml de tampon de respiration
 - ✓ Les absorbances a été lues à un logeur d'onde $\lambda = 540\text{nm}$
 - ✓ On suivre le volume mitochondriale lors de l'injection des ions de calcium à partir d'une solution préparé (100mg Ca/100ml d'eau distillée);

- ✓ Ajouter 20µl de solution calcique ; ensuite la lecture se fait à un logeur d'onde $\lambda = 540\text{nm}$

I-2-8- Mesure des paramètres mitochondriales

I-2-8-1-Détermination de GSH

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Weekbeker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5mercapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2 nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion

I-2-8-2- Détermination de GPx

L'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx

I-2-8-3- Détermination de GST

La mesure de l'activité de la glutathion-S- transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro-2,4 di nitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyl 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST

I-2-8-4- Détermination de CAT

L'activité de CAT est déterminée selon la méthode pectrophotométrique de **Cakmak et Horst (1991)**. L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique

I-2-8-5- Détermination de MDA

Le MDA détectée par une réaction colorimétrique avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le MDA est analysé selon la méthode d'**Esterbauer et al. (1992)**.

I-2-8-6- Dosage du cytochrome c oxydase

L'activité du cytochrome c oxydase est mesurée selon la méthode de (**Wharton et Tzagoloff, 1967**). Le cytochrome c oxydase, enzyme de la membrane interne

mitochondriale assure le transfert d'électrons du ferrocyclochrome c aux molécules d'O₂.

On peut suivre :

- ✚ L'activité enzymatique peut être suivie par la mesure de l'oxydation du cytochrome C réduit à une longueur d'onde $\lambda = 550$ nm car seule la forme réduite absorbe à cette longueur d'onde.
- ✚ Le cytochrome c réduit est préparé dans du tampon phosphate (K₂HPO₄ 7.5mM/KH₂PO₄ 7.5 mM pH 7.4) à une concentration finale de 3 mM ;
- ✚ Une pointe de spatule de sodium dithionite est ajoutée de manière à réduire le cytochrome C.
- ✚ Pour chaque échantillon on ajoute, 950 μ l de tampon phosphate et 20 μ l de la fraction à doser sont bien agités et pré-incubés 2 min à 25°C (les mitochondries éclatent ainsi dans ce milieu très hypotonique).
- ✚ L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde $\lambda = 550$ nm.

I-3- Analyses statistiques :

L'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés est utilisée pour estimer les différences signalées entre les paramètres étudiés.

Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins la déviation standard ($m \pm s$). Les différences sont considérées comme significatives ($P \leq 0,05$); très significatives ($P \leq 0,01$) et hautement significatives ($P \leq 0,001$), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes à barres en utilisant l'office Excel 2010. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du l'Office Excel version 2010, et le minitab® 18.

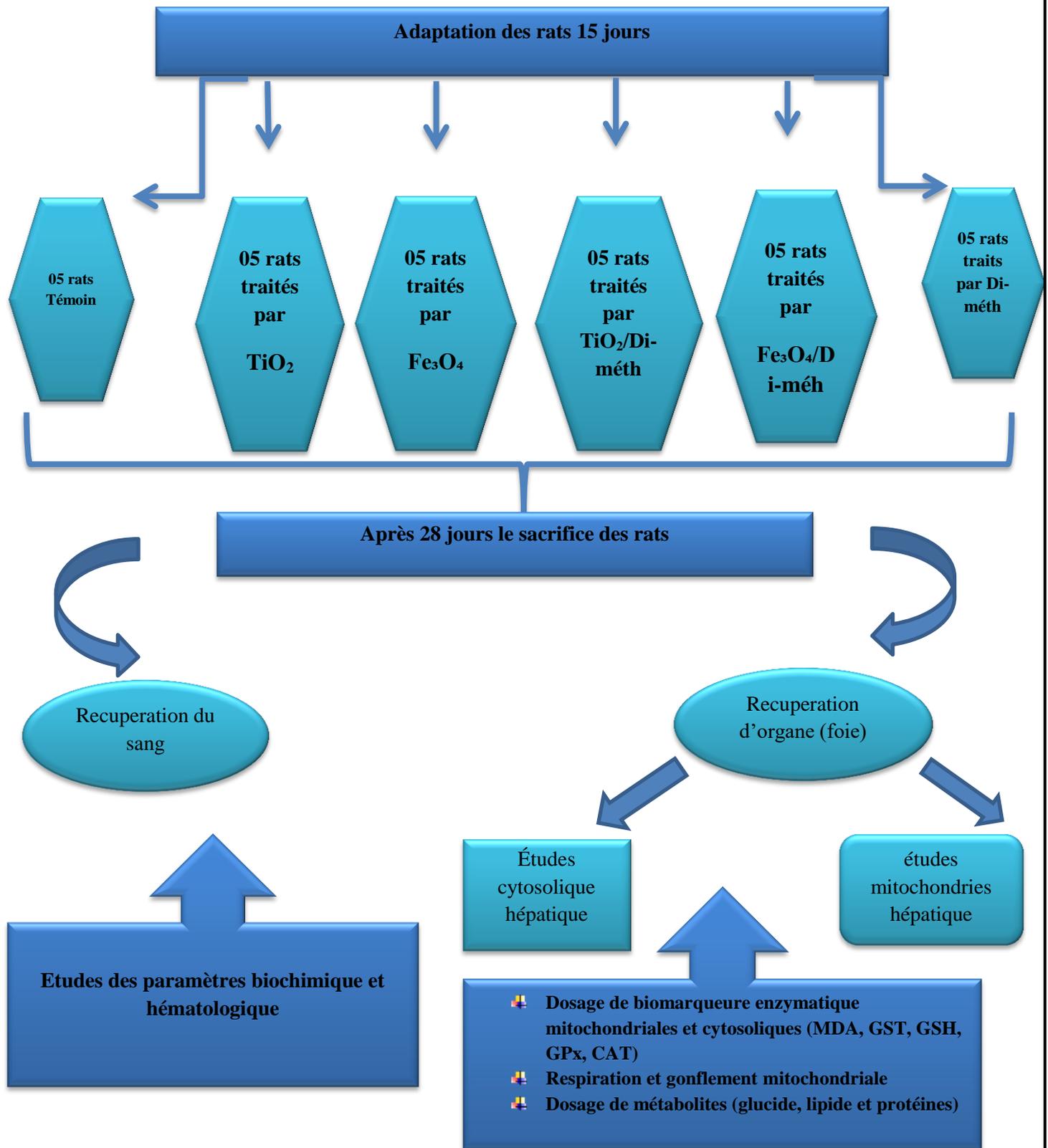


Figure 15: Schéma récapitulatif du protocole expérimental



RESULTATS

II- Résultats

II-1-Etude physiologique

II-1-1-Effet sur gain du poids corporel

La figure 16 illustre l'évolution du gain du poids corporel chez les rats témoins et traités par le NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) et le Di-méth.

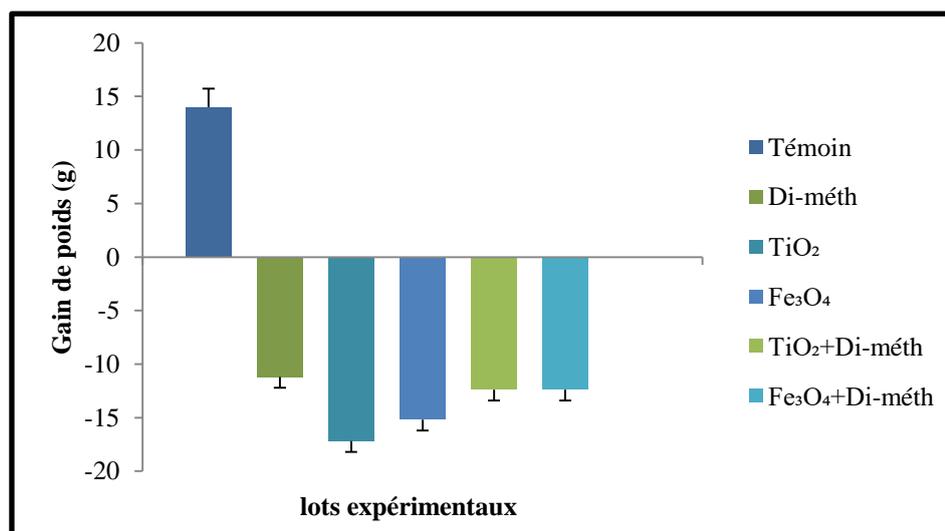


Figure 16 : Variations du gain du poids corporel chez le lot témoin et les lots traité après 28 jours de traitement

Nous remarquons une diminution d'une variation non significative du gain du poids corporel chez tous les lots expérimentaux par rapport au témoin.

II-1-2-Effet sur le poids relatif du foie

La figure 17 illustre les variations du poids relatif de foie en présence de NPs (TiO_2 , Fe_3O_4) et le Di-méth

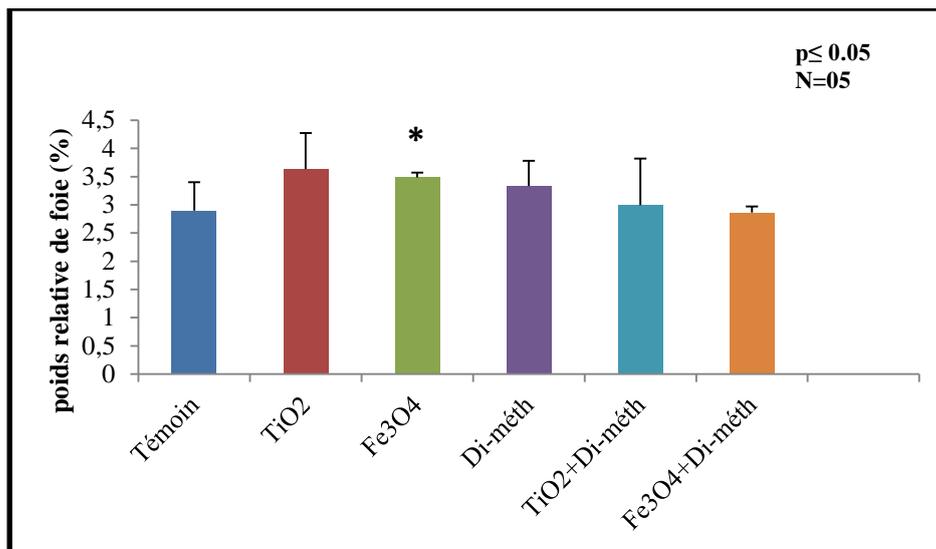


Figure 17 : Variations de poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités

Après 28 jours de traitement

Le poids relatif de foie augmente d'une façon significative ($p \leq 0.05$) chez les rats traités par le Fe_3O_4 et non significative par TiO_2 par rapport aux témoins. Par contre, les résultats ont montré que l'addition de Dif-méth à des rats exposés aux NPs a un effet correcteur, qui a été exprimé par une diminution des poids relatif de foie et chez les rats traités par rapport aux rats non traités. Aucune différence significative n'est mise en évidence quand les compare avec témoin. Une diminution de poids non significative à la mixture des NPs avec Dif-méth.

II-2- Étude des paramètres biochimiques sanguins

II-2-1-Urée et créatinine

Les figures 18, 19 mettent en évidence les variations de la concentration sérique en urée et en créatinine chez le lot témoin et les lots traités

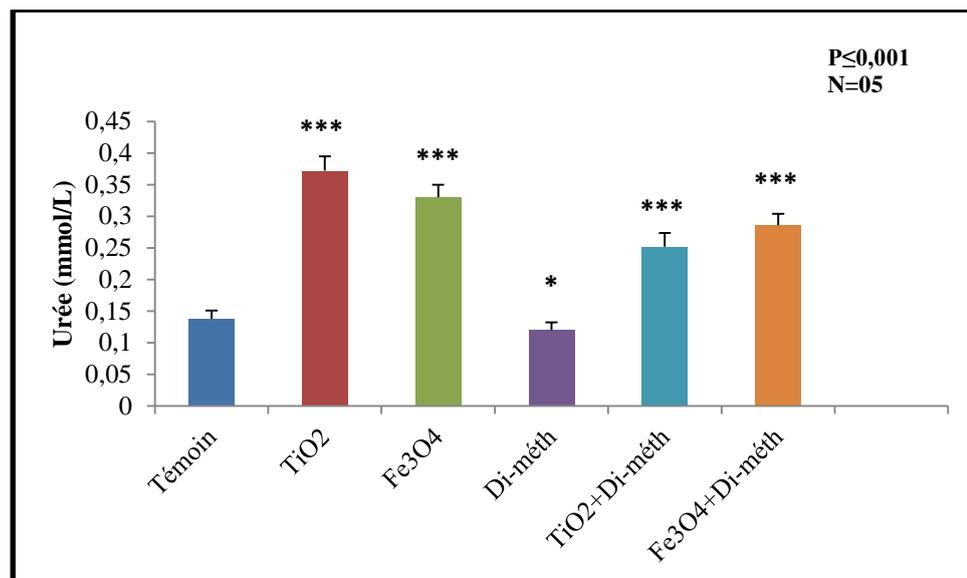


Figure 18 : Variations de la concentration sérique en urée chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

L'urée sanguine augmente d'une façon très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les lots traités par Fe₃O₄ et TiO₂. Par contre, on note une augmentation très hautement significative de l'urée chez les lots associés au Dif-méth+ Fe₃O₄ et significative chez le lot traité par Dif-méth+ TiO₂

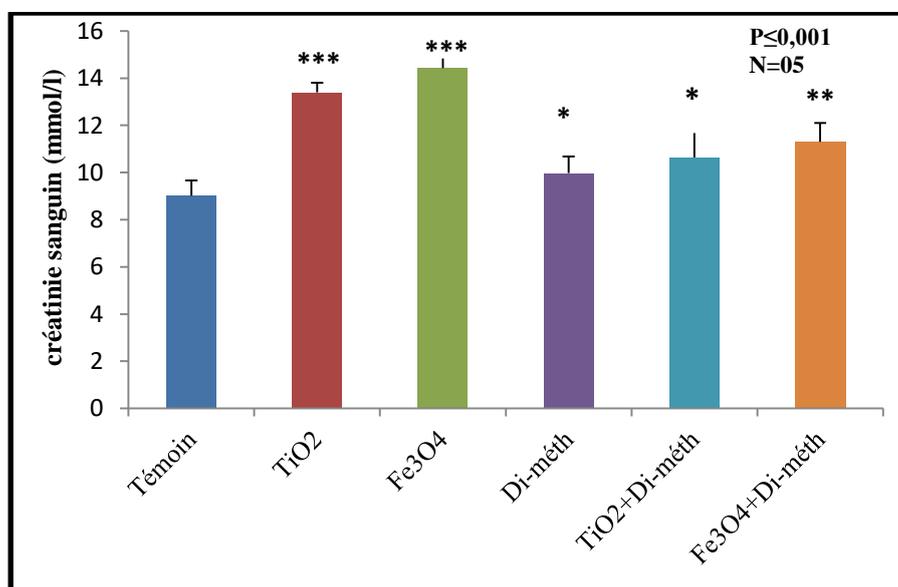


Figure 19 : Variations de la concentration sérique en créatinine chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) en créatinine chez les lots traités par les NPs Par contre, on note un rétablissement par

une diminution très hautement significative de la créatinine chez les lots associés au Dif-méth

II-2-2-Transaminases

La figure 20 met en évidence les variations de l'activité sérique en TGO et en TGP chez le lot témoin et les lots traités

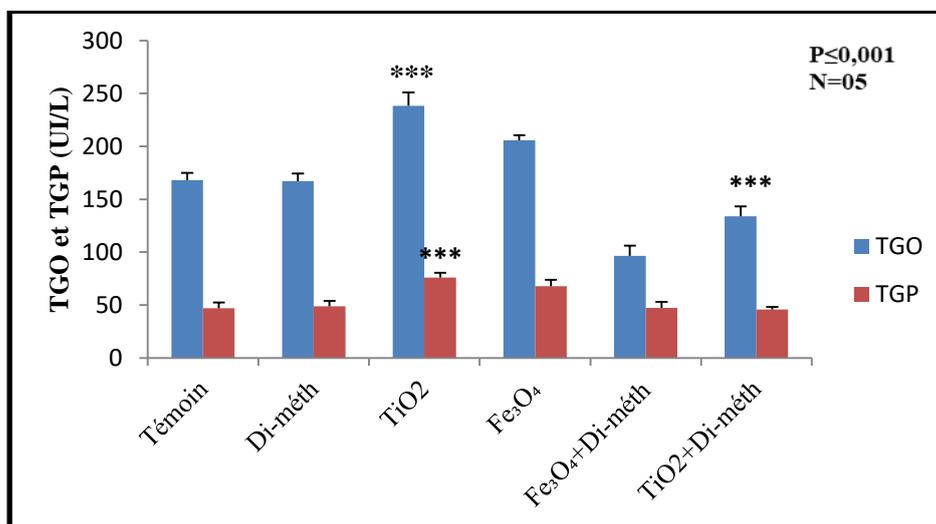


Figure 20 : Variation de l'activité enzymatique de TGO et TGP chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

Les résultats obtenus révèlent une augmentation des transaminases (TGO, TGP) avec une différence très hautement significative chez le lot traité par TiO₂ ($p \leq 0.001$) et différence non significative chez les lots traités par Fe₃O₄ comparés aux témoins. Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution de l'activité de TGO et TGP chez les lots traités par la combinaison des NPs et Dif-méth par rapport au témoin.

II-2-3- Phosphatase alcaline

La figure 21 représente l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline chez les différents lots.

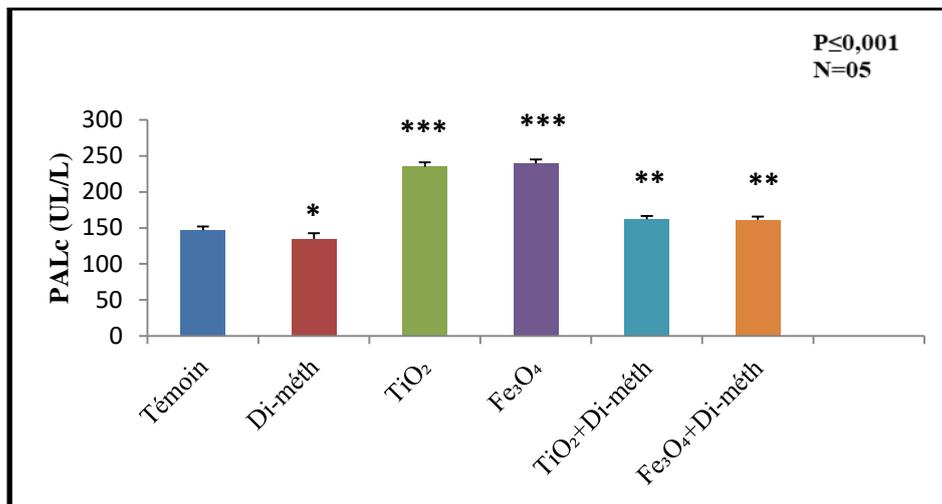


Figure 21 : Variation de l'activité enzymatique de la PALc chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) en PALc chez les lots traités par les NPs. Par contre, on note un rétablissement par une diminution hautement significative de la PALc chez les lots associés au Dif-méth par rapport au témoin.

II-3- Étude des paramètres biochimiques tissulaire

II-3-1- Effet sur le taux des protéines hépatiques

Variation de la teneur hépatique en protéines chez les rats témoins, traités par TiO₂ et Fe₃O₄, traités par Dif-méth / TiO₂ et Dif-méth/Fe₃O₄ sont représentés dans la figure 22.

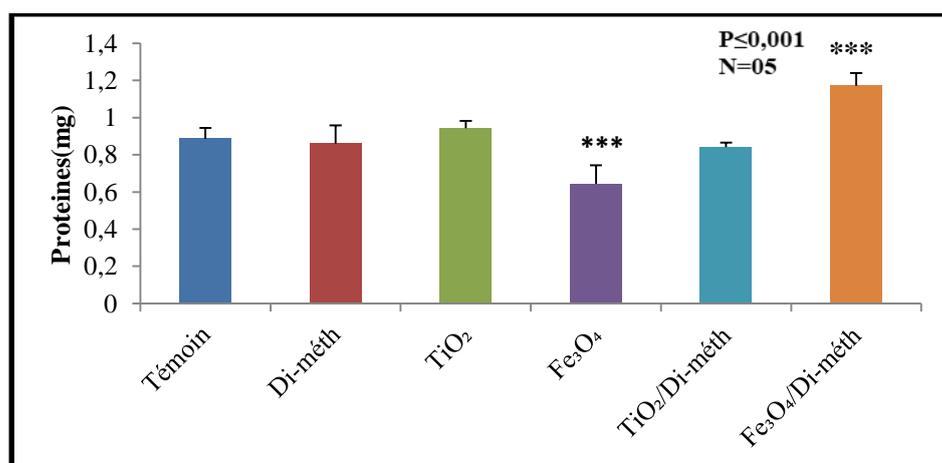


Figure 22: taux des protéines totales chez les lots traités et témoins après 28 jours de traitement

Les résultats présentés dans la figure 20 montrent une perturbation du taux des protéines hépatique chez les lots traités par Fe_3O_4 et TiO_2 . D'une part le taux de protéine a augmenté d'une façon non significative chez les lots traités par TiO_2 par rapport au témoin et d'autres parts une diminution très hautement significative chez les lots traités par Fe_3O_4 par rapport aux témoins. Cette perturbation est neutralisée après l'addition de la diféruoyl-méthane aux nanoparticules.

II-3-2- Effet sur le taux des glucides hépatiques:

La figure 23 représente les variations du taux des glucides hépatique chez les rats traités et témoins

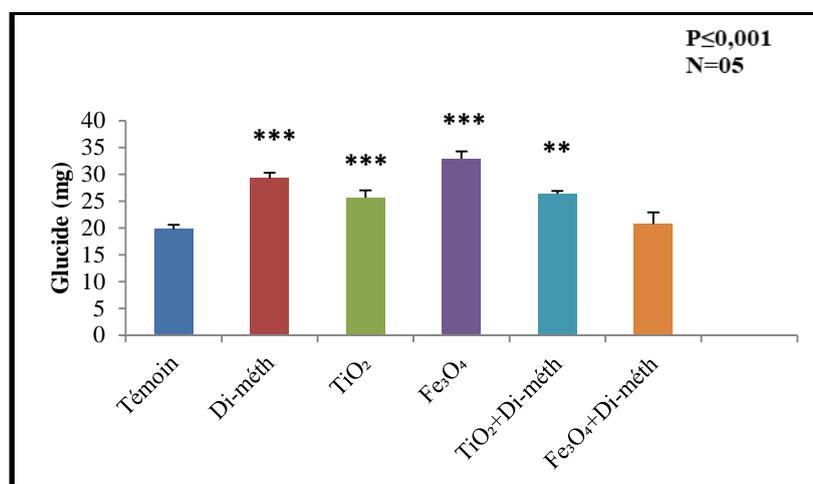


Figure 23: Variation du taux des Glucide (mg) chez les rats témoins et traités après 28 jours de traitement.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la teneur hépatique en glucide avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les rats traités par TiO_2 Fe_3O_4 . Par contre, on enregistre un rétablissement par une diminution des glucides chez les lots traités par la combinaison des NPs et Dif-méth avec une variation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot traité par TiO_2 / Dif-méth par rapport au témoin et une variation non significative de Fe_3O_4 /Dif-méth par rapport au témoin.

II-3-3- Teneur en lipides :

Variation de la teneur hépatique en lipide chez les rats témoins, traités par TiO_2 , Fe_3O_4 et traités par Dif-méth / TiO_2 , Dif-méth/ Fe_3O_4 sont représenté dans la figure 22.

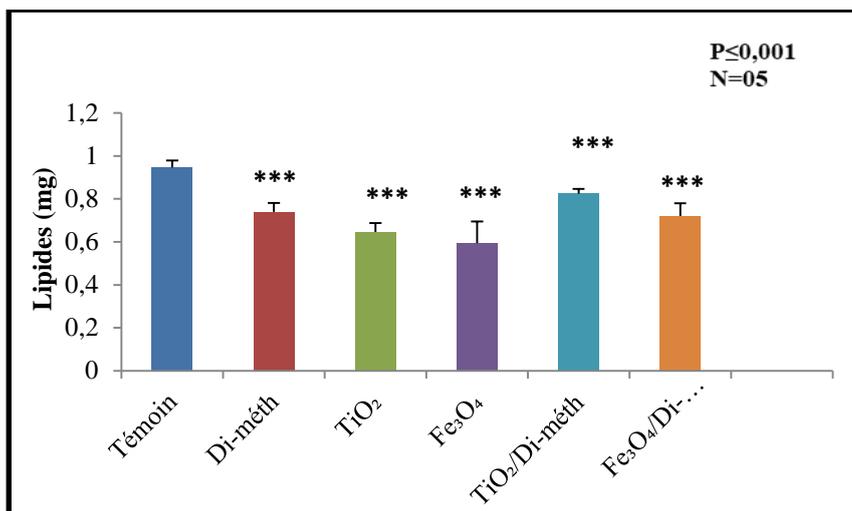


Figure 24: Taux des lipides totaux chez les lots traités et témoins après 28 jours de traitement

Nous remarquons que le taux des lipides dans les lots traités par TiO₂ et Fe₃O₄ a diminué d’une façon très hautement significative ($p \leq 0,001$) par rapport au témoin. Par contre, les résultats ont montré que l’addition de Dif-méth à des rats exposés aux NPs a un effet correcteur, qui a été exprimé par une diminution des lipides de foie et chez les rats traités par rapport aux rats non traités.

II-3-4- Effet sur le taux de GSH cytosolique

La figure 25 montre les variations de taux de GSH chez les rats témoins et traités.

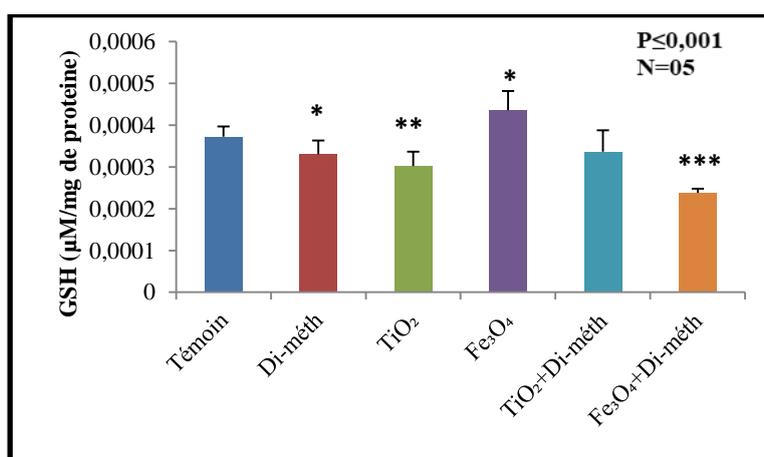


Figure 25: Variation de la teneur en glutathion (GSH) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement.

Nos résultats indiquent une perturbation de taux de GSH cytosolique comparativement aux taux enregistrés chez les témoins, une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) au lot traité par TiO_2 ainsi une augmentation significative ($p \leq 0.05$) au lot traité par Fe_3O_4 par rapport au lot témoin, par contre cette perturbation neutralisée par l'addition de Dif-méth.

II-3-5- Effet sur l'activité de GST cytosolique

L'activité de GST cytosolique chez les rats traités par TiO_2 , Fe_3O_4 et leurs combinaisons est illustrée dans la figure 26.

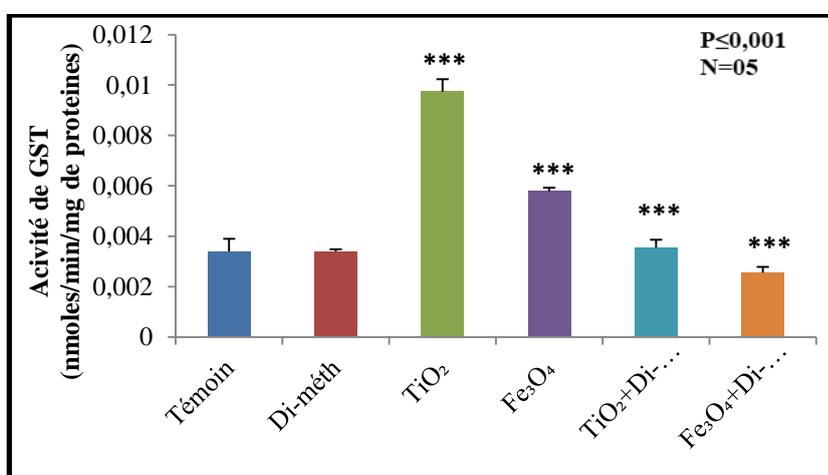


Figure 26 : Variation l'activité enzymatique de (GST) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

Le tissu hépatique montre une augmentation de l'activité enzymatique de la GST chez les lots traités par TiO_2 , Fe_3O_4 avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport aux témoins. En présence Dif-méth le taux de GST diminuer d'une façon très hautement significative ($p \leq 0.001$) à la mixture avec NPs par rapport au témoin

II-3-6- Effet sur le taux de MDA cytosolique

La figure 27 représente le taux de GPx chez les rats témoins et traités.

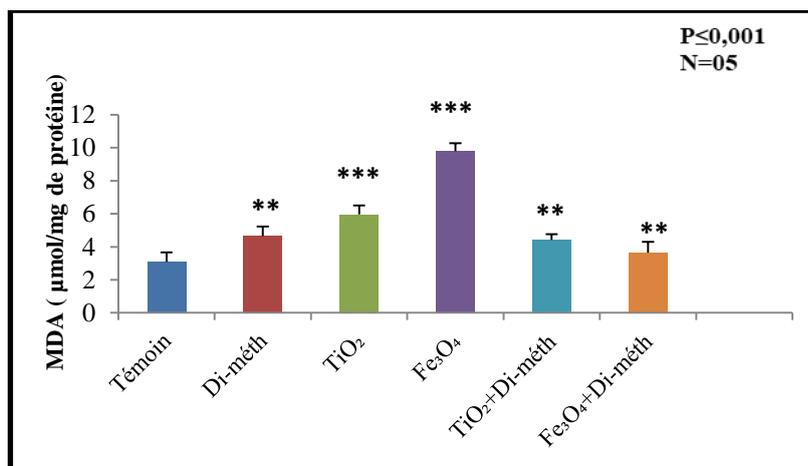


Figure 27 : Variation de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de MDA hépatique chez les rats traité par les deux NPs, cette augmentation est normalisée après l'addition du diféruoyl-méthane d'une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) par rapport aux témoins.

II-3-7- Effet sur l'activité de CAT cytosolique

Nos résultats révèlent une augmentation chez les lots traités par TiO₂ et Fe₃O₄ d'une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport au lot témoin, En revanche, le traitement protecteur des animaux avec Dif-méth normalise clairement l'activité de cette enzyme, et on constate une variation très hautement significative ($p \leq 0.001$) de leur activité par rapport au témoin.

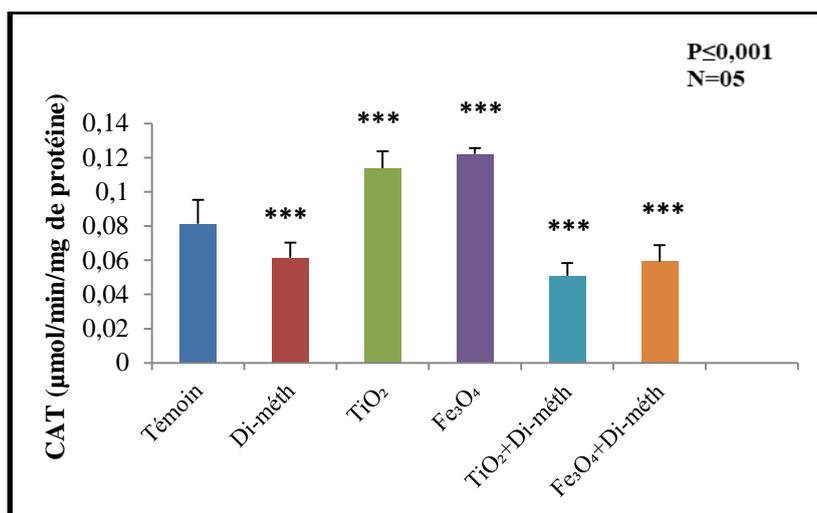


Figure 28 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-3-8- Effet sur l'activité de GPx cytosolique

Nos résultats montrent une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le lot traité par TiO_2 et une diminution non significative par Fe_3O_4 par rapport au lot témoin. Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une augmentation significative de l'activité de la GPx chez les rats recevant les combinaisons NPs plus Dif-méth, avec aucune variation dans les valeurs de l'activité de cette enzyme chez ces groupes par rapport au groupe témoin (Figure 29).

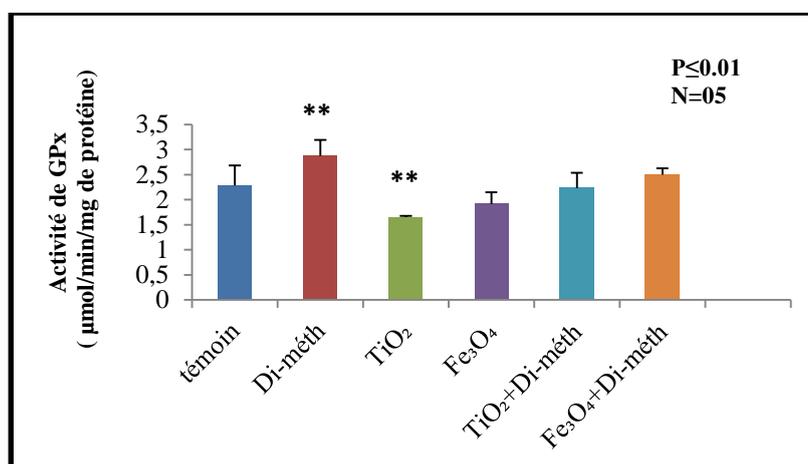


Figure 29 : Variation de l'activité enzymatique de GPx cytosolique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-Étude des paramètres mitochondriaux

II-4-1-Variation du volume des mitochondries traitées par TiO_2 et Fe_3O_4 et leurs combinaisons avec le Dif-méth

La figure 30 illustre les changements de volumes des mitochondries en présence de deux nanoparticules (TiO_2 et Fe_3O_4) et leurs combinaisons avec Dif-méth en fonction du temps. Ces valeurs de l'absorbance traduisant ainsi une augmentation du volume des mitochondries traitées par rapport aux témoins. Cette augmentation est très hautement significative ($P \leq 0,001$) au lot traité par TiO_2 et significative ($P \leq 0,05$) par Fe_3O_4 par rapport au lot témoin, ainsi une augmentation hautement significative ($P \leq 0,01$) au lot traité par ($\text{TiO}_2 + \text{Dif-méth}$) et diminution non significative au lot traité par ($\text{Fe}_3\text{O}_4 + \text{Dif-méth}$) par rapport au lot témoin

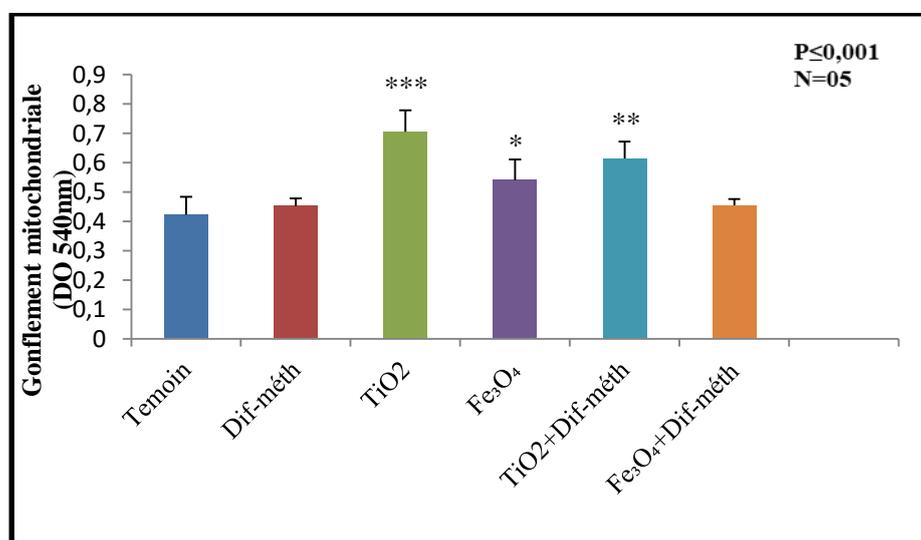


Figure 30 : Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées par TiO_2 et Fe_3O_4 et leurs combinaisons au Dif-méth en fonction du temps après 28 jours de traitement

II-4-2-Variation de la perméabilité mitochondriale lors de l'injection du Ca^{2+}

La figure 31 illustre l'effet de TiO_2 et Fe_3O_4 et leurs combinaisons au Dif-méth sur l'évolution de la perméabilité des mitochondries chez rats.

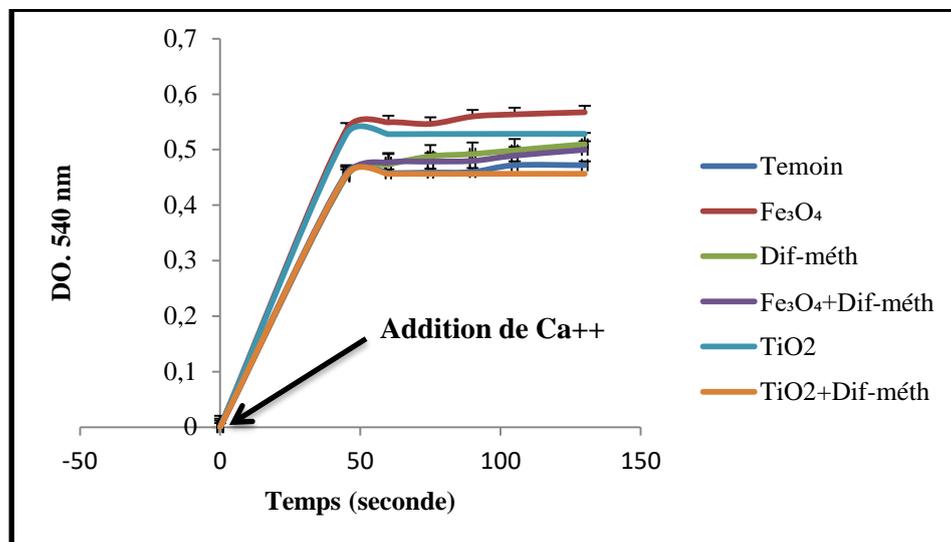


Figure 31 : Effets de TiO_2 , Fe_3O_4 et le Dif-méth sur la perméabilité mitochondriale après l'addition du Ca^{2+}

Nous constatons une augmentation de la taille des mitochondries traitées ce qui signifie une grande perméabilité. Après 15 secondes on remarque une perturbation de volume de mitochondrie chez les différents lots

II-4-3- Activité de Catalase mitochondrial

Les activités de la catalase présentent une augmentation chez les lots traités par TiO_2 et Fe_3O_4 . L'analyse de la variance met en évidence une variation significative entre les animaux des lots témoin et ceux des lots traités par TiO_2 ($P \leq 0,001$), Fe_3O_4 ($P \leq 0,01$). En revanche, le traitement protecteur des animaux avec Dif-méth normalise clairement l'activité de cette enzyme, et on ne constate aucune variation significative de leur activité chez le lot Fe_3O_4 / Dif-méth par rapport au témoin et variation significative ($P \leq 0,05$) de TiO_2 /Dif-méth (Figure 32).

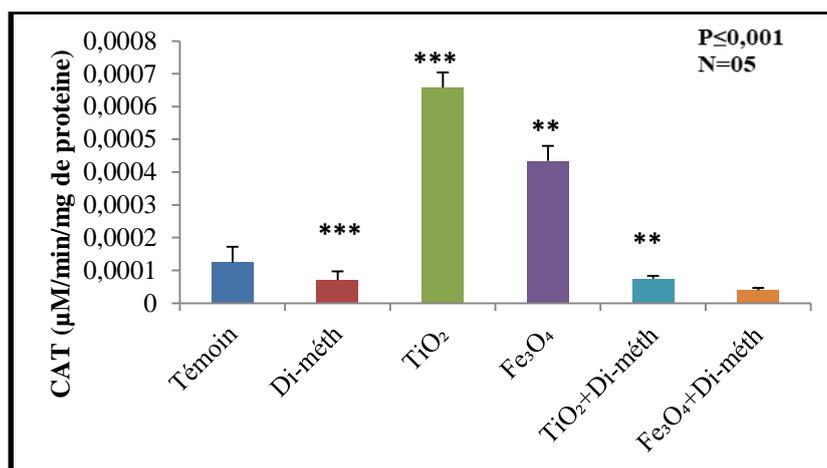


Figure 32: Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique chez le témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-4- Activité de GST mitochondrial

La figure 33 montre l'activité de GST hépatique mitochondrial chez les différents lots. Le traitement des rats par TiO₂ et Fe₃O₄ pendant 28 jours conduit à une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) de l'activité de GST. Tandis que un rétablissement par une diminution de l'activité de GST par la combinaison des nanoparticules avec Dif-méth par rapport aux lots témoins.

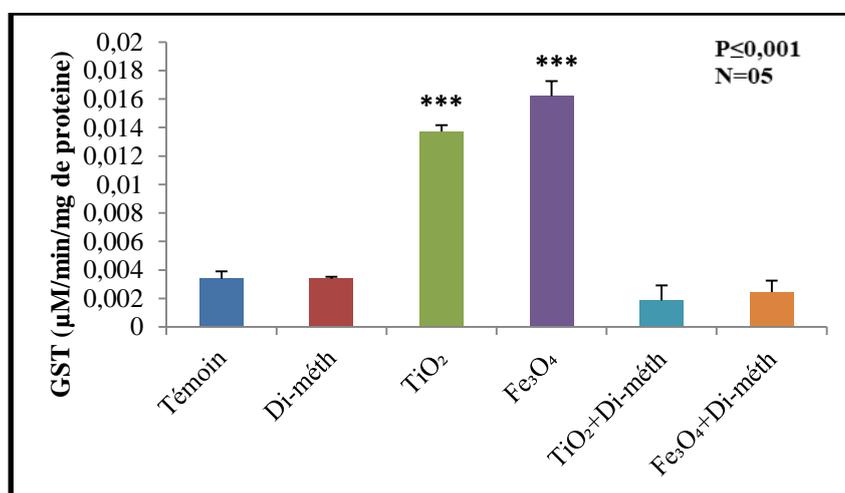


Figure 33 : Variations de l'activité enzymatique de la GST mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-5- Activité de GPx mitochondriale

La figure 34 montre l'activité de GPx mitochondrial du tissu hépatique chez les différents lots. Nous constatons une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les rats traités par TiO_2 et Fe_3O_4 par rapport aux témoins. Tandis qu'une diminution très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez lots traités par la combinaison des nanoparticules et le Dif-méth par rapport aux témoins

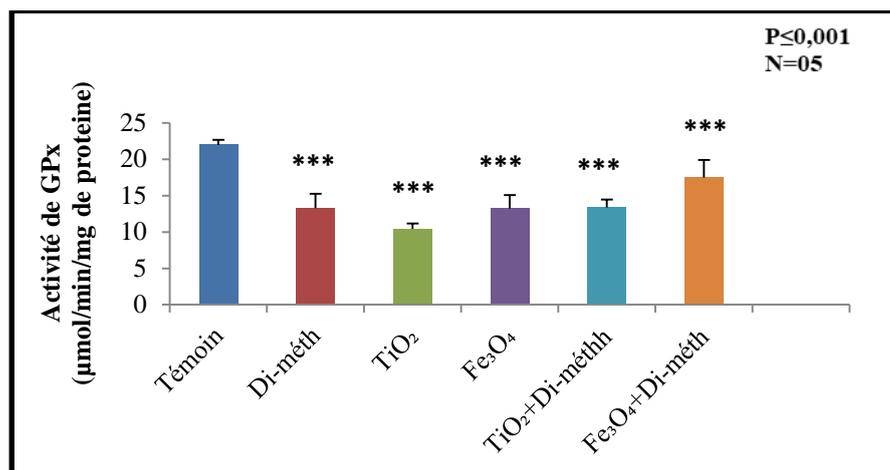


Figure 34 : Variations de l'activité enzymatique de la GPx mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-6-Taux du MDA mitochondrial

La figure 35 représente les variations du taux de MDA observées chez les rats traités et témoins. Nous remarquons que ce taux tend à augmenter d'une manière très hautement significative ($p \leq 0,001$) pour les lots traités par TiO_2 et Fe_3O_4 . Cependant, l'administration du Dif-méth a diminué le taux du MDA de façon significative ($p \leq 0,05$), par rapport au groupe non traité.

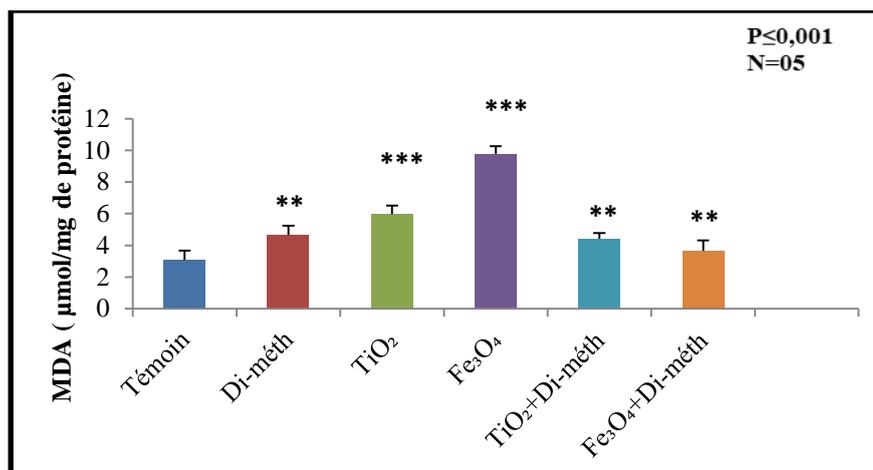


Figure 35 : Variations des taux du MDA mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-7-Taux de GSH mitochondrial

La figure 36 représente les variations de taux de GSH chez les rats témoins et traités Nos résultats mettent en évidence une augmentation très hautement significative du taux de GSH chez les rats traités par TiO₂ et Fe₃O₄, Cependant la combinaison du Dif-méth avec les nanoparticules provoque une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le groupe traité par (Fe₃O₄-Dif-méth) et une diminution non significative chez les groupes traités par (TiO₂-Dif-méth).

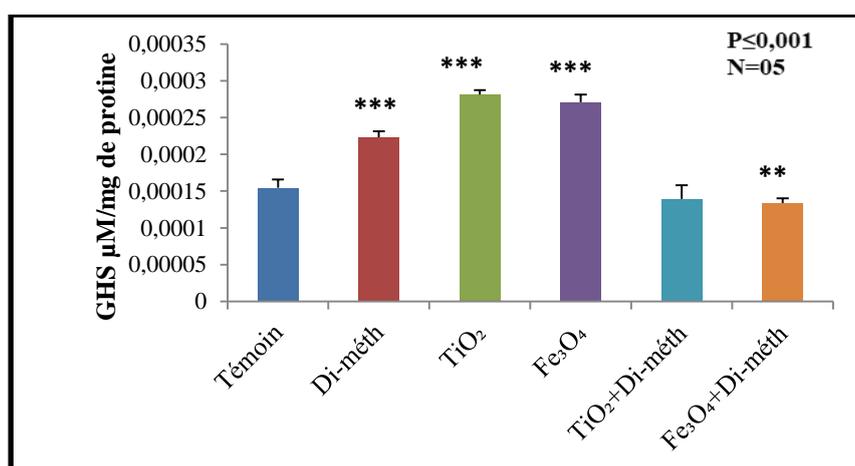


Figure 36: Variations des taux de GSH mitochondriale hépatique chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement

II-4-8-Taux de cytochrome C mitochondrial

La figure 37 représente l'évolution de l'activité de cytochrome C sous l'effet de deux nanoparticules (TiO_2 , Fe_3O_4) et la combinaison avec le Dif-méth. Nous remarquons une augmentation de l'activité de cytochrome C très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les lots traités par les nanoparticules, tandis que une diminution hautement significative ($P \leq 0,01$) chez les lots de $\text{TiO}_2/\text{Dif-méth}$ et $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Dif-méth}$

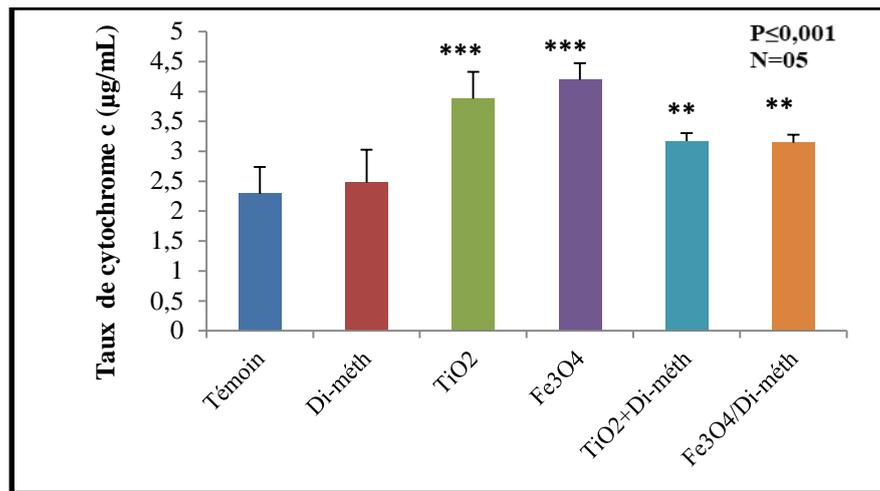


Figure 37 : Taux de cytochrome C chez le lot témoin et les lots traités après 28 jours de traitement



Discussion

Discussion

Notre travail a pour but l'évaluation l'intoxication induit par les nanoparticules d'oxyde de fer et de titane (Fe_3O_4 , TiO_2) sur les rats et le rôle du diferylol-méthane dans la diminution de leurs effets.

III-1- Poids corporels et poids relatif de foie

Concernant les paramètres physiologiques étudiés, les nanoparticules (Fe_3O_4 , TiO_2) induit une diminution critique de poids corporelle des rats avec une augmentation du poids du foie. De même, l'étude **Lucio et al** en rapporté l'effet toxique du chrome attribué à des modifications de la formation osseuse et a des troubles métaboliques, cela peut expliquer par l'hypertrophie du tissu hépatique et par l'accumulation des NPs dans l'organisme.

De plus, les polluant peuvent conduire à la mort cellulaire par l'apoptose de certaine lignées cellulaires due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**wang et al., 2000, Rudolf et cervinka, 2010**). Ces dérivés lipidiques toxiques induisent une hypertrophie cellulaire de l'organe cible. Quant à la perte de poids est également due à la moindre de consommation des aliments et de l'eau lors d'une souffrance. Ainsi peut être expliqué par l'augmentation de catabolisme des lipides et des protéines de l'organisme. **Bozella et al., 1989** ont signalé que la baisse de gain de poids peut être due à l'effet de NPs sur le tractus-gastro-intestinal entraînant une mal absorption des aliments. De plus, nous avons constaté grâce à notre enquête que l'addition de Dif-méth aux groupes des NPs avait un impact protecteur contre l'intoxication des NPs.

Plusieurs études ont montrés que l'administration de curcumine pour inhiber la sécrétion d'acide gastrique ou pour stimuler les mécanismes de défense muqueuse en augmentant la production de mucus ou en stabilisant les cellules épithéliales des surface gastrique (**Pal. 1991, Piper 1986, Meister, 1984**) a été démontré que le traitement par la curcumine bloque l'hypertrophie cardiaque induite par la phényléphrine *in vitro*.

III-2-Paramètres biochimiques sanguins

Dans notre travail nous avons mis en évidence une augmentation très hautement significative des teneurs sériques en créatinine et en urée par les nanoparticules (TiO_2 ,

Fe_3O_4) comparés à leurs témoins respectifs et une diminution lors d'administration du **Dif-méth** aux NPs. La régulation de taux d'urée par les reins est la partie vitale du métabolisme du corps des rats. En plus de son rôle de transporter les déchets de nitrogène l'urée joue une certaine interaction dans le système des néphrons. (**Zang et al., 2012**) En effet, l'insuffisance rénale due à cause de l'accumulation d'urée, dans les maladies rénales, l'urée accumuler à cause de le taux de production d'urée sérique dépasse le taux de clairance. Tandis que l'élévation de la créatinine plasmatique est observée aux dommages marqués sur les fonctions des néphrons. (**Mayne, 1994**).

De plus, l'augmentation de l'urée plasmatique est reliés à l'augmentation des catabolismes protéiques, sache bien que la produit finale de dégradation des protéines est de l'urée, alors on peut dire que l'augmentation d'urée et de créatinine chez les rats traites est due à l'effet nephrotoxique des nanoparticules. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études **Najafzadeh, 2013** qui ont montré que l'administration de nano zinc augmenté significative le taux de créatinine, cette étude suggéré que le dysfonctionnement rénal causé par nano zinc. D'autres études ont montrés que les TiO_2 peuvent augmenter le taux d'urée et de la créatinine ainsi l'acide urique (**Tang et al., 2010; Guo et al., 2009; Zheo et al., 2010**). De plus **Wang et al** croyez que le TiO_2 ont été stocké dans les cellules des reins et causer des pathologies de néphron et des inflammations aux glomérules des reins.

D'autre part, le traitement de Dif-méth restaurer la fonction rénale par la baisse des taux plasmatique de créatinine, ces effets peut être relié aux propriétés antioxydants du Dif-méth puisqu'il a été constaté que les ROS peuvent être impliqué dans le taux de filtration glomérulaire (**Hughes et al., 1996**). Selon **Cohly et al., 1998** ont également démontré que la Dif-méth présente une activité antioxydant dans les lignés cellulaires rénales.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation des enzymes hépatiques (TGO et TGP) chez les rats traités par les nanoparticules (TiO_2 et Fe_3O_4) et une diminution à l'addition de Dif-méthan

Les enzymes hépatiques ALT, AST et ALP sont souvent utilisées comme marqueurs de lésions hépatiques, car leur augmentation indique des lésions hépatiques. On sait que après l'exposition aux nanoparticules sont facilement absorbés par les hépatocytes et les cellules de kapffer (macrophage spécialisés situés dans le foie (**Kazem et al., 2016**). Une étude menée par **Babadi et al** ont indiqué que l'exposition à

150 µg / kg de poids corporel de Fe₃O₄-NP pendant 15 jours entraînait une augmentation significative des niveaux d'AST, d'ALT et d'ALP.

De plus, plusieurs études ont confirmé que les NPs augmentent le taux d'ASAT et ALAT. **Chen et al., 2003** montré une augmentation significative des transaminases, ainsi **liu et al** ont démontré des niveaux significativement plus élevés de taux sériques d'ALAT chez des souris traitées avec des nanoparticules de TiO₂. Une augmentation significative des taux sériques d'ALAT a également été observée chez les souris traitées aux nanoparticules de zinc (Zn), ce qui indique une nécrose hépatique (**Wilhelmi et al., 2013**). Une augmentation significative des taux de ces enzymes dans le foie peut indiquer une hépatotoxicité chez les rats traités. De même, il a été signalé que les nanoparticules de TiO₂ présentaient une toxicité hépatique et rénale chez les rats Wistar. La présente étude a montré une élévation significative de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) suite à l'administration des nanoparticules, probablement due à l'altération de la perméabilité de la membrane hépatocytaire ou à la nécrose. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par (**Navarro et al., 2005**)

Le diferylol-méthan est une molécule hydrophobe qui passe facilement à travers la membrane plasmique vers le cytosol des cellules humaine. (**Octaris et al., 1996**) Cette molécule phénolique inhibe l'initiation de la tumeur induit par divers cancérigène et il a également été démontré qu'elle inhibe la croissance de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses humaines *in vitro* (**aggarwal et al., 2003**) et qu'elle possède des propriétés analgésique, anti-bactérienne et anti-inflammatoire et utiliser contre les troubles hépatiques et les rhumatismes. Le dif-méth rétablit les changements d'ASAT et ALAT en raison de son effet antioxydant et de sa capacité à agir comme un piègeur des radicaux libres (**Hutchison, 1993**). De plus, le prétraitement au curcuma a maintenu l'activité ALP à l'état normal. En fait, de nombreuses études ont noté que le Dif-méth était un inhibiteur de l'activité d'ALP dans le plasma (**Navarro et al. 2005**). Apparemment, le curcuma a un impact protecteur potentiel sur la réduction des enzymes libérées par les hépatocytes endommagés (AST, ALT et ALP) (**Reys-gordillo et al., 2007 ; Salahshoor et al., 2016**)

De plus, l'effet préventive du Dif-méth peut impliquer par deux mécanismes : l'une agissant comme antioxydant et l'autre mécanisme en inhibant l'activation de cytokine pro-inflammatoire (**Reys-gordillo et al., 2007 ; Salahshoor et al., 2016**). **Naik et al., 2010** ont montré que le traitement par le Dif-méth à baisser les taux élevés d'enzymes (ASAT, ALAT, ALP). Ainsi **Fu et al., 2008** démontré que le Dif-méth

significativement protéger le foie en réduisant ASAT ALAT et ALP et en améliorant l'architecture histologique.

Les glucides sont présents dans l'organisme sous différentes formes, la forme la plus courante est le glucose, obtenu à partir des sucres simples ou complexes apportés par l'alimentation, ils servent de carburant rapidement utilisable par les organes (**Esterbauer et al., 1992**) De plus, les glucides sont une source primaire et immédiate d'énergie (**Albert et al., 1986**)

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la teneur hépatique en glucide avec une différence très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les rats traités par NPs (TiO_2 , Fe_3O_4), expliqué par plusieurs hypothèses comme l'augmentation des réserves énergétiques, ou par des changements structuraux ou de perméabilité des membranes cellulaires (**Carpy et al., 2000**) cette augmentation est neutralisée de façon hautement significative après l'addition du diféruloyl –méthane par rapport au témoin, la Dif-méth agit en activant la glycolyse et en inhibant la néoglucogenèse hépatique, qui est en concorde avec les travaux de (**Amit et al., 2006**) qui ont trouvé une augmentation très hautement significative de taux des glucides hépatiques chez les lapins traités expliqué par l'effet inhibiteur de cadmium sur l'activité enzymatique.

On peut expliquer cette augmentation par l'inhibition enzymatique provoquée par le NPs se fait par l'inactivation de la glycolyse qui se traduit par la préservation de l'énergie. Dans les conditions de stress, les réserves de glucides sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques. Ces résultats rejoignent ceux (**El-Wakil et Radwan, 1991**) Cette augmentation est neutralisée par l'addition de Dif-méth, les polyphénols alimentaires peuvent influencer le métabolisme des glucides à de nombreux niveaux. Les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal ou encore son assimilation dans les tissus périphériques

Dans notre travail nous avons mis en évidence une diminution du taux des lipides hépatiques chez les rats traités par le TiO_2 et Fe_3O_4 par rapport aux témoins, cette diminution peut s'expliquer par la dégradation des lipides hépatiques par l'activation de la peroxydation lipidique, cette voie stimulée par des radicaux libres en cas de stress oxydative générée par le TiO_2 et Fe_3O_4 (**Aurousseau, 2002**) De plus les métaux comme le Cuivre et le Fer ont été largement utilisés comme agents initiateurs de l'oxydation des lipides (**Nzengue, 2008**) Ces résultats vont dans le même sens que

ceux de (Aounallah et Aouachia, 2015) qui ont trouvé une diminution significative chez les lapins traités par le cadmium par rapport aux traités par Sélénium et témoins.

L'addition de diféruloyl-méthane a provoqué une neutralisation très hautement significative du taux des lipides qui peut être expliqué par une régénérescence cellulaire pour lutter contre le TiO₂. Et ce qui concorde a ceux (Afyaa et al., 2016) qui ont montré que l'administration orale de l'extrait de curcuma chez les rats avec un état oxydatif par Li₂CO₃ (carbonate de lithium) diminue les paramètres du profil lipidique et augmente les enzymes antioxydants car il agit comme un piègeur de radicaux libres d'oxygène (Suramania et al., 1994) De plus, le Dif-méth active l' 5'AMP-activated protéine kinase qui diminue la synthèse des lipides de glycérol et augmente l'oxydation des acides gras, et régulant positivement l'expression de CPT-1, respectivement, qui entraînent une diminution de longue chaîne gras d'acyl CoA cytosolique. (Asma et al., 2009)

Les protéines sont principalement impliquées dans l'architecture des cellules, pendant une période de stress chronique les protéines considèrent comme une source d'énergie. Les résultats obtenus montrent une perturbation de la teneur hépatique en protéines :

Une augmentation avec une différence très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les rats traités par NPs-TiO₂ expliqué par l'induction de processus de détoxification mis en jeu par ce système de régulation qui se compose d'enzyme, des protéines et de molécules anti oxydantes (Nzengue, 2008), et une diminution très hautement significative ($P \leq 0.001$) chez les rats traité par NPs- Fe₃O₄ expliqué biochimiquement par plusieurs mécanismes, dont la formation de lipoprotéines, utilisés pour réparer les tissus et les tissus endommagés, ou directement utilisés par les cellules pour répondre à leurs besoins énergétiques dans ces conditions de stress

Mais cette perturbation est neutralisée après l'addition de la diféruloyl-méthane (la combinaison Di-méth/ TiO₂, Di-méth/ Fe₃O₄) d'une façon hautement significative par rapport aux témoins.

III-3- Stress oxydatives

Le stress oxydant est un type d'agression des constituants de la cellule, dû aux espèces réactives oxygénées. Les ROS sont des espèces chimiques extrêmement réactives regroupant les radicaux libres possédant un électron célibataire non apparié

(les radicaux hydroxyl HO• ou alkoxy RO• par exemple) et également des dérivés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Manon, 2014**).

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La réaction en chaîne prolonge les effets intra membranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe (**Milane, 2004**). La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques les hydroperoxydes et leurs dérivés (**Halliwell et Gutteridge, 2007**). Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxy (RO•). Parmi leurs dérivés, le MDA (malondialdéhyde) a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement et peut donc être considéré un marqueur de la peroxydation lipidique et peut également former des liaisons avec les bases de l'ADN et devenir un mutagène (**Milane, 2004 ; Favier, 2003**). L'aldéhyde le mieux étudié est le dialdéhyde malonique (MDA) (**Esterbauer et al., 1991**).

Dans notre étude le taux de l'MDA hépatique présente une augmentation très hautement significative chez les rats traités par TiO₂ et Fe₃O₄ cette augmentation observée clé du stress oxydant et de la peroxydation lipidique est en accord avec plusieurs études sur des modèles animaux qui ont constaté une augmentation de MDA dans le sang (**Baynes, 1991**). L'augmentation de la concentration du MDA suggère une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Kakkar et al., 1997**) qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique (**Battacharya et al., 1997**).

Cette augmentation est régulée après l'addition du diféruoyl-méthane d'une façon hautement significative par rapport aux témoins ce que confirmé par les travaux de (**Pulla et Lokesh, 1992; Sreejayan, 1994; Pulla et Lokesh, 1994**) montre que le Dif-méth agit comme inhibiteur puissant de la peroxydation lipidique, ce que confirmé aussi par les travaux de (**Reddy et Lokesh, 1992; Reddy et Lokesh, 1994**) qui montre que le Dif-méth a également réduit la peroxydation des lipides dans les microsomes hépatiques des rats, les membranes érythrocytaires et les homogénats cérébraux.

Pour une protection cellulaire, la GSH porteur d'une fonction thiol qui constitue un système antioxydant et puissant capteur de radicaux libres est responsable du maintien de l'état d'oxydo-réduction cellulaire et de la protection des cellules contre

les dommages oxydatifs. Le GSH est la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques, il joue son rôle antioxydant

également en synergie avec les enzymes antioxydants telles la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde desmutase (**Morin et al., 2004**).

Nos résultats révèlent une diminution hautement significative des GSH hépatiques chez les rats traités par le TiO₂ et une augmentation significative par le Fe₃O₄ par rapport aux témoins, la diminution des taux de GSH semble être la conséquence d'une attaque provoquée par une augmentation de la quantité de ROS, tandis que l'augmentation des taux de GSH hépatique semble être le résultat d'une légère élévation des niveaux de radicaux libres (**Wylly et José, 2014**) la diminution du GSH peut être attribuée à la conjugaison du GSH avec le métabolite électrophile du nanoparticules, une réaction catalysée par la GST. Des études similaires ont révélé que les TiO₂ peuvent produire des ROS réduire les antioxydants cellulaires tels que le glutathion et la vitamine E. (**Doudi et al., 2015**)

Au contraire l'utilisation de Dif-méth restaurer l'effet des nanoparticules. Des études récentes signalées que la Dif-méth avait augmenté le niveau de GSH cellulaire et induit une synthèse de novo du GSH dans Les **cellules** stellaires **hépatiques** en stimulant l'activité et l'expression génique de la glutamate-cystéine ligase (GCL), une enzyme clé limitant la vitesse de synthèse du GSH, ainsi (**Yumei et al., 2008**) indiquent que l'administration orale de Dif-méth non seulement augmente le taux de GSH total hépatique, mais améliore également le ratio GSH / GSSG dans le foie de manière significative.

Concernant la Glutathion-S-transférase (GST), enzymes de la famille de la phase II (biotransformation), **Wu et al., 2006** qui catalysant la conjugaison du Glutathion (possède un groupement nucléophile -SH) à une grande variété de composés (porteurs de groupements électrophiles) et également impliquée dans le transport et l'élimination de composés réactifs qui effectuent d'autres fonctions antioxydants, L'activité de la GST a également été largement utilisé comme un biomarqueur de stress (**Fitzpatrick et al., 1997; Zheng et al., 2013**)

Dans notre étude, l'analyse des résultats obtenus montre une augmentation très hautement significative du taux de GST, cette augmentation de l'activité de la GST est hautement corrélée avec le taux de GSH, et une forme de défense qui traduit la détoxification des xénobiotiques dans l'organisme pour permettre son élimination, et une

réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dues aux radicaux libres et qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GST pour réduire son effet toxique, ces résultats sont confirmés par les études de (**Ognjanović et al., 2008**).

On outre, L'induction de cette enzyme a été aussi rapportée chez Mollusques Bivalves tels que *Perna viridis* exposé à différentes doses du cadmium (**Kamel et al., 2012**). La réponse de l'activité de la GST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (**Oruç et Üner, 2000**)

Par contre, cette augmentation est régulée après l'addition du diféruoyl-méthane d'une façon hautement significative par rapport aux témoins, **Somparn et al., 2007** montre que la difé-méth a été agir comme antioxydant, ainsi que piègeur électrophile, cette propriété qui est largement considérée comme étant responsable de ses effets protecteurs sur les tissus. (**Somparn et al., 2007**)

Parmi les systèmes de défense enzymatiques le glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx) joue un rôle principal dans la protection de l'organisme contre les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, mais aussi des peroxydes organiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. (**Zhu et al., 2010**).

La GPx est une enzyme antioxydant clé qui régule le niveau des ROS (la GPx et capable de non seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroxyle peroxydes résultant de l'oxydation de acides gras insaturées) et donc protégé les cellules contre les dégâts générés par l'oxyde de Fer (**Weber et al., 2002**) et d'après nos résultats on observe une diminution hautement significative de l'activité GPx dans les cellules hépatiques chez les rats traités par le dioxyde de titane et l'oxydes de fer. Cette diminution s'accorde avec (**Olsson, 1986; Valko et al., 2006**) qui montrent une diminution claire de l'activité de cette enzyme dans le foie, le cerveau et les reins des rats exposés au cadmium en comparaison avec le lot témoin, ces résultats sont confirmés aussi par les études de (**Sankar et al., 2012**). La diminution de GPx reflète les perturbations du mécanisme oxydatif normal lors de la toxicité des nanoparticules

Par contre l'addition du Dif-méth neutralise cette diminution par l'élimination des radicaux libres et l'inhibition de peroxydation lipidique, notre résultat s'accorde avec (**Majid et al., 2014**) qui montrent que le Dif-méth peut prévenir des dommages causés par la morphine aux cellules de l'hippocampe en augmentant les taux de GPx. il en est

de même pour les travaux de **Sankar et al., 2012** qui a aussi démontré une diminution de l'activité GPx chez la même modèle biologique de notre expérience suite à un traitement avec des cyperméthrine. Dif-méth a été montré pour restaurer l'activité GPx au cours de la toxicité induite par l'arsenic et la gentamicine. (**Fatma et al., 2009 ; farombi et ekor, 2006**). Le mécanisme antioxydant de dif-méth peut inclure un ou plusieurs des interactions soit piégeant ou neutralisant des radicaux libres. (**Soudamini et al., 1992**)

La catalase est une enzyme antioxydant impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène, c'est un biomarqueur de stress oxydatif et il est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les métaux toxiques (**Almeida et al., 2007**). Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (**Mates et al., 1999 ; Powers et Lennon, 1999**). D'après nos résultats on observe une augmentation très hautement significative de l'activité de catalase chez les rats traités par TiO₂ et Fe₃O₄ cette augmentation s'accorde avec (**Kie tea kim, 2010**) qui a démontré une induction de l'activité Catalase chez *Daphnia Magnia*. Cette augmentation est régulée après l'addition du diféruoyl-méthane d'une façon hautement significative par rapport aux témoins, Cette diminution s'accorde avec **yousef et al., 2008** qui a démontré que le traitement par sodium arsenic toxique aux hépatocytes des rats par contre l'addition du curcumine prévenir l'oxydation lipidique et diminuer la catalase.

III-4- Étude subcellulaire

La mitochondrie est l'un des organites les plus sensibles à de nombreux composés exogènes. Il est bien connu qu'il existe une relation étroite entre la production de mitochondries et de ROS. Les mitochondries peuvent échapper une certaine quantité d'électrons de haute énergie dans la chaîne respiratoire à partir d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les mitochondries étaient considérées comme des compartiments cellulaires majeurs pertinents pour la toxicité possible des nanoparticules, ils pourraient se localiser dans les mitochondries et induire des dommages à leur structure par le biais du stress oxydatif. Des études récentes montre que nanoparticules de silice provoque des effets cytotoxique ainsi elle joue également un rôle clé dans le processus d'apoptose. (**Joao et al., 2011**)

Dans notre étude l'analyse des résultats obtenus par (TiO_2 et Fe_3O_4) montre une augmentation de gonflement due certainement à la grande perméabilité de la membrane mitochondriale confirmée dans notre travail, (Skulachev, 1996) ont montré que le gonflement mitochondriaux est un mécanisme s'accompagnant de profonds remaniements, on commence par l'augmentation de la production de ROS par les xénobiotiques entraîne l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTPM), l'ouverture de ces pores provoque un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace inter membranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe, alors la mitochondrie est dégradée ensuite les protéines pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, AIF (Apoptose Inducing factor) et les caspases qui séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réaction qui aboutit à l'apoptose (la mort cellulaire), traduit par une nécrose hépatique (Asser, 2009)

Ainsi l'addition du Dif-méth aux nanoparticules (TiO_2 et Fe_3O_4) provoque une diminution du gonflement et de la perméabilité par rapport au témoin, on peut expliquer ce résultat par l'effet pro-apoptotique du Dif-méth, Ligeret.H et *al.* Des études récentes montrées que le Dif-méth a pu ouvrir les pores de transition de perméabilité dans le foie mitochondriale. Le dif-méth induit le gonflement mitochondrial, la libération du calcium, trouble de la respiration et effondre le potentiel de la membrane mitochondriale qui est liés à l'ouverture des pores. Le PTP pourrait être une cible pertinente par laquelle la curcumine induit l'apoptose des cellules tumorales.

Le cytochrome P450 est une superfamille d'hémoprotéines d'isoenzymes qui sont responsables du métabolisme d'une grande variété de produits chimiques étrangers, y compris les médicaments anticancéreux. Le système P450 localisé principalement au niveau de foie plus que d'autres organes comme les reins, cœur et les intestins.

Nos résultats ont confirmé que le traitement par (TiO_2 et Fe_3O_4) induit des taux élevés de Cyt-c suivis d'une apoptose, ce qui est confirmé par une quantité élevée de perméabilité et de gonflement mitochondrial. (Toualbia et *al.*, 2017) Lors de l'exposition à une nanoparticule, le chemin d'induction de l'apoptose prédominant qui dépend des mitochondries. Ce schéma nécessite la libération dans le cytosol de protéines apoptogènes contenues dans l'espace inter-membranaire des mitochondries telles que l'AIF ou Cyt-c. Ce dernier, une fois ré-expansé dans le cytoplasme, résultant dans le recrutement Apaf-1 et pro-Cas-9. Ce trimère, nommé apoptosome, conduit à l'activation de Cas-9, initiateur de la voie mitochondriale. Ce dernier conduit à

l'activation de Caspase. Différents mécanismes controversés réalisent encore la libération de protéines apoptogènes de la mitochondrie au cytosol (**Jevtić et al., 2016**). Le port de transition de perméabilité (PT du pore) serait associé à la réduction de la membrane mitochondriale potentielle ($\Delta\psi_m$). La chute du potentiel conduit à une entrée massive d'eau et d'ions provoquant un gonflement et finalement une perturbation physique de la membrane externe mitochondriale responsable de la libération des protéines apoptogènes (**Fromenty, 2010 ; Ming-Yuan et al., 2015**). L'inhibition de cytochrome par le Dif-méth ou d'autres antioxydants ont été trouvés être efficace pour protéger le foie contre la toxicité de plusieurs agents toxiques, **ahmed et al** ont montré que l'inhibition de Cyt P450 ou d'autres isoformes par le curcumine apaisant l'hépatotoxicité induit par le cisplatine, puisque l'augmentation de Cyp 2E1 avait été indiqué *in vitro* et *in vivo* comme médiateur ou amplificateur critique pour l'hépatotoxicité par le cisplatine. Dans le même sens, **Yan et al et Zhang et al** ont rapporté que le dif-meth atténue l'activité des enzymes CYP2A dans le microsome du foie et que l'administration de dif-méth était adéquate pour modifier l'expression de la glycoprotéine P et de la CYP3A chez le rat. Ainsi, nos travaux confirment ceux cités ci-dessus puisque nous avons également mis en évidence une diminution de l'activité de CYP-c chez les rats traités par le dif-méth.

La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives à partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV. Ces électrons s'associent à l'oxygène pour constituer des superoxydes puis secondairement du Peroxyde d'hydrogène. Le GSH, la GPX et la CAT se chargent de piéger ces d'espèces oxygénées réactives au sein de la mitochondrie. En effet l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale engendre une hyperproduction d'espèces oxygénées réactives, (**Chagra et al., 2009 ; Toualbia et al., 2017**)

Le Malonyldialdéhyde (MDA) est le produit final de la peroxydation lipidique; par conséquent, la formation de MDA est considérée comme un indicateur général de la peroxydation lipidique (**Downs et al., 2002**).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence de (TiO_2 et Fe_3O_4) expliquer par les radicaux libres générés par les NPs déclenchent la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés liés à la membrane, conduisant à une altération de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane (**Wang et al., 2008**) nos résultats confirment ceux de (**Nalika et Parvez, 2015** qui a démontré l'induction des niveaux de MDA des mitochondries cérébrales lors de

l'exposition aux TiO₂ à différentes concentrations. la peroxydation lipidique améliorée dans les mitochondries cérébrales traitées au TiO₂ peut entraîner la perte des principaux composants des acides gras des membranes mitochondriales, entraînant la perte de cardiolipine critique de type phospholipide qui est essentielle aux enzymes / fonctions mitochondriales.

De plus, le Dif-méth neutralise l'effet toxique des nanoparticules en raison d'hydrogène phénolique ou l'hydrogène méthylénique centrale dans la moitié de l'heptadienone (**Quing-yi Wei et al., 2006**) Ces résultats sont concordant avec (**Nazam et al., 2007**) qui ont mis en évidence une protection significative contre le stress oxydatif induit par l'isoproterenol en termes de conservation des antioxydants endogènes du myocarde.

Nos résultats ont montré une forte activité enzymatique antioxydante reflétée par une augmentation des activités de catalase et de GST connues pour leur rôle dans la détoxification des radicaux libres et une diminution de l'activité GPx

Cependant, un stress oxydatif sévère peut provoquer des lésions cellulaires et la mort. Dans notre modèle modéré, un traitement par Dif-méth était prévu pour le foie des rats contre les dommages oxydatifs révélé comme une normalisation des systèmes enzymatiques activés mentionnés ci-dessus. En effet, le Dif-méth s'est avéré bénéfique pour restaurer une CAT et une GPx élevées en raison de l'administration des nanoparticules. Ces résultats sont conformés à plusieurs publication (**Asser et al., 2002**)



CONCLUSION

Conclusion

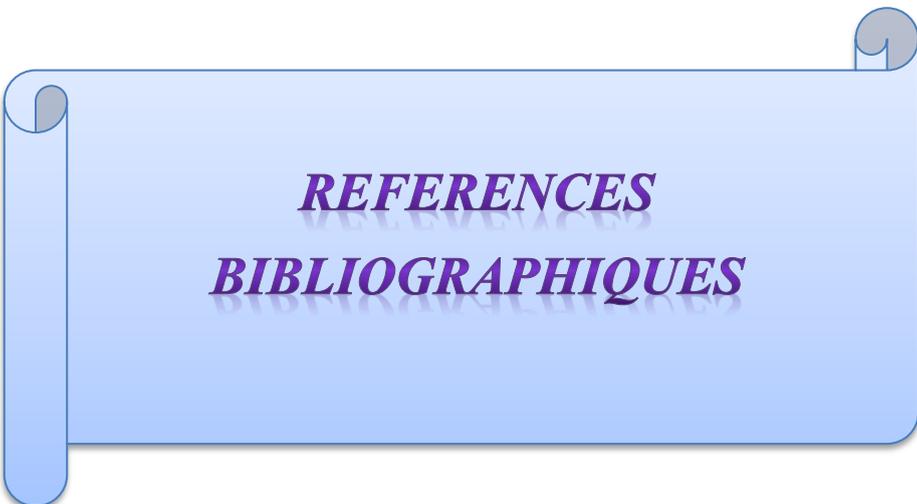
L'objectif de cette étude consistait à étudier la toxicité induite par TiO_2 , Fe_3O_4 au niveau cytosolique hépatique et mitochondrial chez les rats Wistar et à évaluer l'effet protecteur du diférylol-méthane du curcuma contre cette toxicité. Les résultats indiquent que dif-méth n'a pas affecté la plupart des biomarqueurs étudiés. Ceci peut être dû à une activité oxydante. En revanche, ces nanoparticules influencent tous les paramètres étudiés reflétant son habilité à créer un stress oxydatif. En effet, ils causent une réduction de poids corporel, et une augmentation des poids relatifs de foie, augmentation au niveau des biomarqueurs de la lésion hépatique (ALT et AST), et rénale (créatinine ; urée), une perturbation du taux des protéines, une augmentation des lipides et des glucides, une modification de l'équilibre pro et anti-oxydant se manifestant notamment par une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) et de l'activité du GPx avec une diminution de la quantité de GSH, GST, CAT.

Le traitement des mitochondries isolées de foie par ces nanoparticules a démontré une augmentation de la perméabilité avec un gonflement mitochondrial. Parallèlement, le traitement des rats par le Dif-méth en présence des deux nanoparticules a ramené tous les marqueurs biochimiques et oxydatifs à des niveaux proches de ceux obtenus chez les rats témoins. Ceci souligne l'effet protecteur de Dif-méth contre l'intoxication par ces nanoparticules en raison de leurs propriétés antioxydantes prouvées dans la littérature. Les résultats de la présente étude permettent de conclure que le Dif-méth pourrait s'avérer très bénéfique lors d'une intoxication par TiO_2 , Fe_3O_4 . Ils peuvent être proposés alors dans le schéma thérapeutique des personnes intoxiqués par les nanoparticules sans risque d'effets secondaires, et peut être utilisée comme un antidote contre cette toxicité

Perspectives

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- Dosage des caspases et autres protéines de l'apoptose
- Étude histopathologique
- Dosage de SOD.LDH
- Étude au niveau lysosomique
- Étude neurotoxique



***REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

A

- Adams. B.K., Ferstl. E.M., Davis. M.C., Herold. M., Kurtkaya. S., Camalier. R.F., Hollingshead, M.G., Kaur, G., Sausville, E.A., Rickles, F.R., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Shoji, M. 2004. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 3871-3883.
- Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233: 404–410
- Anamika Bagchi. 2012. Extraction of Curcumin. *IOSR-JESTFT.*, Volume 1, Issue 3, 1-16
- Anass D. 2013. Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'oxydes métalliques par voie organométallique : vers des applications biomédicales. *Thèse de doctorat préparée en cotutelle avec l'université paul sabatier toulouse* – France. 3.
- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R. J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W. S., Wagenpfeil, A. S. 2000. locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, *cancer res.* 60 (23), 6641-6648
- Anand P., 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* Nov-Dec; 4(6):807-18 .
- Ader J.L., Carré F., Dinh-Xuan A. T., Duclos M., Kubis N., Mercier J. Mion F., Prefaut C., Roman S. 2006. Physiologie. *Masson.*
- Afyaa S., Nasir, Haider S., Jaffat. 2016. Protective role of turmeric extract (*Curcuma longa*) in the lipid profile and activity of antioxidant in the male rats treated by lithium carbonate. *International Journal of Pharm Tech Research.* (9). 98-105.
- Argot J., J argot F., s. robert S. 2013. base de données fiches toxicologiques, sur le site web l'inrs : www.inrs.fr/fichetox. inrs . 2-5.
- Asma E., Dayong W., Paul K., Mohsen M. 2009. Curcumin Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Angiogenesis and Obesity in C57/BL Mice¹⁻³. *The Journal of Nutrition Nutrition and Disease.* P : 919.

- Auffan M. 2007.** Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. Thèse doctorat géosciences de l'Environnement. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. P : 205.
- Aggarwal B.B., Kumar A., Aggarwal M.S., Shishodia S. 2004.** Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*). A spice for all seasons. Phyto-pharmaceuticals in Cancer Chemoprevention. *Informa Health care*. P: 349-87.
- **Amit K., Atanu B., Ruchi P., Indira P. 2006.** Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: an absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1513-1520
- Aggarwal B.B, Kumar A., Bharti A.C. 2003.** Anticancer potential of curcumin . preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* (23). P: 363-98.
- Albert B., Bray D., Lewis D., Raff M., Roberts K., Watson J. 1986.** Biologie moléculaire de la cellule. Edition Flammarion. p: 256.
- Aurousseau B. 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux: Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits Badji Mokhtar, Annaba. INRA Prod.Anim. 15(1): 67-82
- Afyaa S., Nasir, Haider S., Jaffat. 2016.** Protective role of turmeric extract (*Curcuma longa*) in the lipid profile and activity of antioxidant in the male rats treated by lithium carbonate. *International Journal of Pharm Tech Research.* (9).Pp: 98-105.
- Almeida E.A., DiasBainy A.C., MeloLoureiro A.P., MartinezRegina R., Miyamoto S., Onuki J., FujitaBarbosa L., Machado Garcia C.C., Manso Prado F., Ronsein G.E., Sigolo C.A., Brochini C.B., Gracioso Martins A.M., Gennari de Medeiros M.H., Di Mascio P. 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., A.* 146: 588–600.
- **Asser I. Ghoneim. 2009.** Effects of curcumin on ethanol-induced hepatocyte necrosis and apoptosis: implication of lipid peroxidation and cytochrome c. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 379:47–60

B

- **Baratli Y. 2015.** Etude de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer, Fe₃O₄ Chez le rat, analyse mitochondriales et stress oxydants. *HAL Id.* 1-102
- Bulte, J. W., Hoekstra, Y., Kamman, R. L., Magin, R. L., Webb, A. G., Briggs, R. W., Go, K. G., Hulstaert, C. E., & Miltenyi, S. T. H., 1992.** The, Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles. *Magn. Reson. Med*, 25 (1), 148-157
- Bousalem N. 2017.** Synthèse verte, caractérisation et activité antibactérienne de films composites alginate nanoparticules d'argent-chitosane. Thèse présentée à : faculté des sciences département de chimie pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences. Université abou-bekr belkaid – Tlemcen. P: 2.
- Biswas S., Chida A.S., Rahman I. 2006.** Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.* 71(5) 551-64.
- Badmaev V. 2009.** Curcuminoids from Curcuma longa in Disease Prevention and Treatment In Botanical Medicine. *Mary Ann Liebert. Inc.* 109-138.
- Baillie J.K., Bates M.G.D., Thompson A.A.R., Waring W.S. Partridge R.W., Schnopp M.F., Simpson A., Gulliver-Sloan F., Maxwell S.R.J., Webb D.J. 2007.** Lowland Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous. *Urate Production Augments. Chest.* (131) 47-38.
- Bechet D., Seve A., Pernot M. 2011.** Application des nanoparticules à la thérapie photodynamique. *Annale de nano-biotechnologies.* 16(1-5) : 1-2.
- Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris; Cachan : Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales.
- Boullard B. 2001.** Dictionnaire des plantes médicinales du monde. *Chem Res toxicol.* (16) : 1642-51.
- Bernard M., Couderc R., Cynober L. 2005.** Les aliments traditionnels: Remèdes de bonne femme Ou pharmacopée du xxie siècle l'exemple de la curcumine. *Cah. Nutr. Diét.* (40) (6). 325- 333.

-Battacharya, SK., Satyan, KS., Ghosal, S.1997. Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35 : 236 – 239

-Baynes, J.W. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40. 405-412

-Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72. 248-254

C

-Combres Y. 1997. Métallurgie et recyclage du titane et de ses alliages. *Techniques de l'ingénieur Métallurgie extractive et recyclage des métaux de transition*, 3: 2355-2355.

-Cherukuri P., Gannon C.J., Leeuw T.K., Schmidt H.K., Smalley R.E. 2006. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (103): 18882-18886

-Cornell, R M., schwertmann.U. 2003. The iron oxides, properties, reactions, occurrences and uses. *Willey-VCH VerlagGmbH & Co.KGaA, Weinheim*, P 1-10

-Chagra, A., Djebbar, M. R., Rouabhi R. and Berrebbah H. 2009. Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5 (1). 35-39

-Chuto G., Chaumet-Riffaud P. 2009. Le groupe oncologie de la société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire. *Les nanoparticules*. 371-375.

-Carlson C., Hussain, S. M., Schrand, a M., Bray dich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones R. L., Schlager, J. J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry*, 112: 13608–13619.

-Chabas A., Gentaza L., Lombardo T., Sinegrea R., Falcone R., Verità M., Cachier H. 2010. Wet and dry atmospheric deposition on TiO₂ coated glass. *Environmental Pollution*. (158) 3507-3512

-Chang X., Zhang Y., Tang M., Wang B. 2013. Health effects of exposure to nano-TiO₂: a metaanalysis of experimental studies. *Nanoscale Res Lett* .(8): 51.

-Chen X., Mao S.S. 2007. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chemical Reviews*, (107): 2891–2959.

-Chen T., Yan J., and Li, Y. 2014. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, (22) 95-104

-Cheng Y., Morshed R.A., Auffinger B. Tobias A.L., Lesniak M.S. 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* (66): 42–57.

D

-Duke J. A., Bogenschutz-Godwin M. J., Du -Cellier J., Duke P. 2002. A. K. CRC Handbook of Medicinal Spices. CRC Press, P360

-Downs CA, Shigenaka G, Fauth JE, Robinson CE, Huang A 2002. Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil using a novel molecular diagnostic biotechnology. *Environ Sci Technol* 36:2987– 2993

-Duchateau, G., Florkin. 1959. For trehalosemie of insects and its signification. *Arch. Insect. Physiol. Biochem*, 67. 306-314

Descat. 2002. Hémogramme et Myélogramme. Thèse d'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse P20

E

-Edeas M. 2006. La curcumine. *Phytothérapie*. 4 (5). P: 230–233.

-Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 341-349.

-**El-Wakil H.B., Radwan M.A. 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Muller) treated with some pesticides. *J.Environ.sci.Health*. P 26.

-**Esterbauer H., Schaur R. J., et Zdlner H. 1991.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical. Biol Med*, (11) 81–128

F

Festing. 1979. Suitability of the Rat for Different Investigations. In: *Inbred and Genetically Defined Strains of Laboratory Animals, Part I, Mouse and Rat* (P.L Altman, D.D. Katz, eds.). *Fed. Am. Soc. Exper. Biol. Bethesda, MD*, 237-238.

-**Ferin J., Oberdorster G. ,Penney D.P. 1992 .** Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Molec Biol*, 6 (5) : 535-542.

-**Favier A .2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, 108-15.

-**Fitzpatrick P.J., O'Halloran J., Sheehan D. & Walsh A.R., 1997.** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2: 51–56.

-**Fatma MED, Mokhtar IY, Fatma MER, 2009.** Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food chem Toxicol*, (47) : 249-54

-**Fromenty, B. 2010.**Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments. *Réanimation ,Toxicologie*. 552-567

-**Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI, 2009.** Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutat. Res.* 674: 3–22.

-Flohe L., Gunzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105 ; 114-121

G

-Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J. 1972. Studies on insect adipokine like hormones. *Gen. Comp. Endocrinol*, 18 (3), 545

H

-Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249: 7130-7139

-Hagens W.I, Oomen A.G, Jong W.H. 2007. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body *Regul. Toxicology Pharmacol*. 49:217–28

-Huet M., Fleurentin J. 2013. Curcuma, thé vert et chardon-marie: quelle stratégie adopter en prévention du cancer ou en complément des traitements. *Hegel.3* (4) : 268-281.

-Hoet, P. H., I. Bruske-Hohlfeld., Salata O.V. 2004. Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology* 2(1): 12

-Huet M., Fleurentin J. 2013. Curcuma, thé vert et chardon-marie: quelle stratégie adopter en prévention du cancer ou en complément des traitements. *Hegel.3* (4) : 268-281.

J

-Jevtić, G. Nikolić T., Mirčić A., Stojković T., Velimirović M., Trajković V., Marković A.M., Trbovich A.M., Radonjić N.V., Petronijević N. 2016. Mitochondrial impairment, apoptosis Antioxidant Response to Phenol Exposure and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment in fluence of restraint stress. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 66, 87-96

-Joao S. Teodoro, Anabela M simoes, Filipe V Duarte, Anabela P.Rola. Richard C. Murdoch, Saber M Hussain, Carlos M Palmeira. 2011. Assesement of toxicity of silver nanoparticules in vitro : A mitochondrial perpective. *Toxicology in vitro*. 25 : 664-670

-Jansen P.C.M., Grubben G.J.H., Cardon D. 2005. Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Colorants et tanins. *Wageningen .Pays-Bas : PROTA*. P :238.

K

-Kaplan, A. 1984. Urea. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*; 1257-1260 et 437 -418

-Krug H.F., Wick P.2012. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angew. Chem. Int.Ed. American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved*. P :1260-1278.

-K. Naoi , Y. Ohko, T. Tatsuma, J. Am .2004. *Chem. Soc.*, 126, 3664

-Katia A. 2001. Etude de la cytotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer. Mémoire Université Paris Descartes .P :5

-kowluru R.A., kanwar M. 2007. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab (Lond)*.(4).P : 8.

-Kakkar, R., Mantha, S.V., Radhi, J., Prasad, K., Kalra, J. 1997. Antioxidant defense system in diabetic kidney: A time course study. *Life Science*, 60, 667-679

-Kamel N., Jebali J., Banni M., Ben Khedher S., Chouba L. & Boussetta H., 2012. Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82: 40-46

L

- Li PF., Dietz R et von Harsdorf R., 1997. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 96: 3602-9

Lahouel A., Kebieche M., Lakroun Z., Rouabhi R. Fetoui H., Chtourou Y., Djamila Z., Soulimani R. 2016. Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*. 11356-016-6913-9.

-Lecerf J.M. 2012. Effets métaboliques du Curcumin (obésité, lipides circulants, insulino-résistance, diabète et athérosclérose). *Phytothérapie* (10) : 100–104.

-Loap S. 2008. Curcuma (partie I). *Phytothérapie* . (6) :22–28

-Lei L. 2013. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Research strategies and implications for nanomedicine. *Chinese Physical Society*.22(12) : 1-10.

-Lamoureux D.P., Kobzik L., Fedulov A.V. 2010. Customized PCR-Array Analysis Informed by Gene-Chip Microarray and Biological Hypothesis Reveals Pathways Involved in Lung Inflammatory Response to Titanium Dioxide in Pregnancy. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*.(73): 596–606.

M

-Murray R.L. 1984. Alanine aminotransferase. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1088-1090.

-Murray R.L. 1984. Aspartate aminotransferase. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1112-1116.

-Murray R.L. 1984. Creatinine. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1261-1266.

-Morin D., Zini R., Tillemont S. P. and Burdeau A. 2004. Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs and Discovery*. 1: 279-284.

-Manon R. 2014. Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétiques Impact sur la santé humaine et l'environnement .université du havre thèse .Pp 78-80

--Milane H .2004 . La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur*. pp : 13-36.

-**Meister A 1984.** A new aspect of glutathion biochemistry and transport selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* ;42 :397-400

-**Mayne, P.D, 1994.** The kidney and renal . calculi. *clinical chemistery in diagnosis and treatement. Sixthed london.*(6)2-24.

-**Monir Doudi & Mahbubeh Setorki. 2015.** Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Oxidative Stress and Pulmonary Dysfunction. *Zahedan J Res Med Sci.* 17(9):e1062

-**M Nazam Ansari, U Bhandari and KK Pillai. 2007.** Protective role of curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats. *Hum Exp Toxicol.* 26: 933

-**Ming-Yuan, X., Wang P., Sun Y.J., Wang Y.J.L., Zhu L., Wu. 2015.** Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and Deltamethrin. *Pest. Biochem. Physiol.* 124, 60-65.

-**Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 32, 595-603.

-**Majid Motaghinejad., Morteza Karimian., Ozra Motaghinejad., Behnaz Shabab.2014.** Protective effect of various dosages of curcumin against morphine induced apoptosis and oxidative stress in rat isoleted hippocampus. *Pharmacol Rep.* 204 1-6

Mohamed C. B. 2011. Elaboration et caractérisation des couches minces de TiO₂ dopées à l'erbium, à différentes températures et épaisseurs, mémoire magister, *Université Mentouri- Constantine.*

N

-**Navarro,M., Cubero,I., Chen,A.S., Chen, H.Y., Knapp, D.J., Breese, G.R., Marsh, D.J., Thiele, T.E. 2005.** Effects of Melanocortin Receptor Activation and Blockade on

Ethanol Intake: A Possible Role for the Melanocortin-4 Receptor. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 29:949–957

-**Nzengue Y. 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallo thionines. Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France. P : 299.

-**Ning Li, Tian Xia , Andre E. Nel. 2008.** The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radical Biology & Medicine*. 44 ; 1689–169

-**Nohynek, G. J., Lademann J., Ribaud L C., Roberts M.S. 2007.** "Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety." *Crit Rev Toxicol* 37(3): 251-277.

-**Ngaotrakanwivat . P., Tatsuma, S. Saitoh, Y. Ohko . 2003.** Charge–discharge behavior of TiO₂–WO₃ photocatalysis systems with energy storage ability *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 3234.

-**Nel A; Xia T; L Madler; N Li, 2006.** Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science.*, 311: 622–627.

O

-**Olsson U.1986.** Carence en sélénium et les fonctions de détoxification chez le rat. Les effets à court terme de cadmium médicaments. *Nutr Instruct* 4: 309-319.

-**Oberdörster G; A Maynard; K Donaldson; V Castranova; J Fitzpatrick, K Ausman; J Carter; B Karn; W Kreyling; D Lai; S Olin; N Monteiro-Riviere; D Warheit, H Yang**

2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particulate and Fibre Toxicol*, 6: 2–8.

- Ognjanović B.I., Marković S.D., Pavlović S.Z., Zikic R.V., Stajn A.S., Saicić Z.S .
2008. Effet de l'exposition chronique de cadmium sur le système de défense antioxydant dans certains tissus de rats: effet protecteur du sélénium. *Physiol Res.* 57 (3): 403-11.
- Oruç E.Ö. & Üner N. 2000. Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127: 291–296
- O'regan B.. M. Grätzel. 1991. A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, 353, 737

Q

- Quing-yi Wei, Wei-feng chen, Bo zhou , Li yang, Zhong-Li Liu.2006. inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochimia and biophysica Acta*1760 : 70-77

P

- Pulla R., Ach, Lokesh B.R. 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* , (111) : 117-124.
- Piper DW, Stiel DD. 1986. Pathogenesis of chronic peptic ulcer: current thinking and clinical applications. *Med Prog.* 2;7-10.
- Pelley, J. L., Daar A. S., Saner M. A. 2009. State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots. *Toxicol Sci* 112(2): 276-296
- Perry M C. 2008. Evaluation de la curcumine comme agent anti-cancéreux dans le traitement des tumeurs cérébrales. Thèse doctorat université Montréal. P 122
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. Defraigne J. O. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Coeur, Poumons. *The New England journal of medicine* .4 (5).
- Pincemail ., Heusele C., Bonté F., Limet R., Defraigne J.O. 2001. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* V, 4.158-160

- Pal S, Nagchaudhury AK. 1991. Studies on the antiulcer activity of Bryophyllum pinnatum leaf extract in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 33;97-102.
- Powers SK and Lennon SL. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.
- Pulla R. A., Lokesh B.R. 1994. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Fd Chem Toxic* (32): 279-283.
- Palanisamy sankar, Avinash G. Telang, AyyasamyManimaran. 2012. Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in wister rats. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 487-493
- Pankhurst, Q., Connolly, A.J., Jones, S. K., & Dobson, J., 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys*, 36, 167-181
- Prabhakar PV; UA Reddy; SP Singh; A Balasubramanyam; MF Rahman; S Indu Kumari; SB Agawane; US Murty; P Grover; M Mahboob, 2012. Oxidative stress induced by aluminum oxide nanomaterials after acute oral treatment in Wistar rats. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 436-445
- Pierre S. 2014. Le Curcuma, un agent naturel de lutte contre le vieillissement cutané. Synthèse Bibliographique en Biologie et Biotechnologie Master Biologie- Gestion. Université de Rennes. P : 6.

R

- Reddy A., Lokesh B. 1992. Studies on spice principles as antioxidant in the the inhibition lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Mol. Cell Biochem.* 111-117.
- Reddy A., Lokesh B. 1994. Effect of dietary turmeric(*curcuma longa*) on iron induced lipid peroxidation in the rats liver, *Food Chem. Toxicol.* 32-279.
- Robertson JD, Orrenius S, 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 30: 609-627.
- Rudolf,E., Cervinka,M., 2010. Zinc pyrithione induces cellular stress signalling and apoptosis in Hep-2 cervical tumor cells: the role of mitochondria and lysosomes. *Biometals.* 23, 339-354

S

- Suramanian M., Sreejayan N., Rao N., Devasagayam T., Singh B. 1994. Diminution of singlet oxygen DNA damage by curcumin and related antioxidants, *Mutat Res.* 249-311.
- Sreejayan R. M.N. 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* .(46) 1013-1016.
- Somparn., P, Phisalaphong., C, Nakornchai., S, Unchern., S, Morales., NP 2007 Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull.* 30(1), 74–78
- Sharma R.A., Euden S.A., Platton S.L. Cooke D.N., Shafayat A., Hewitt H.R., Marczylo H.R., Morgan B., Hemingway D., Plummer S.M., Gescher A.J., Steward W.P., Pirmohamed S. M. 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin : biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* (10) 47-54.
- Shoba G., Joy D., Joseph T. Majeed M., Rajendran R., Srinivas P.S. 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* (64) 353–56
- Sharma R.A., Gescher A.J., Steward W.P.2005. Curcumin : the story so far. *Eur J.*(13) 1955-68
- Sandur S.K., Pandey M.K., Sung B., Ahn K.S., Murakami A., Sethi G., Limtrakul P., Badmaev P., Aggarwal B.B. 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis.* (28) 1765–1773.
- SHEN L., JI H.F.2007. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* .(67) 619–23.
- Sikha A., Harini A., HegdePrakash L. 2015. Pharmacological activities of wild turmeric (*Curcuma aromatica*Salisb): a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* . 3(5) 01- 04.
- Shvedova, A. A., Kisin E. R., Porter D., Schulte P., Kagan V.E., Fadeel B., Castranova V. 2009. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus. *Pharmacol Ther.* 121(2): 192-204

-**Sanker Palanisamy, Avinash G. Telang, Ayyasamy Manimaran. 2012.** Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in wister rats. *Experimental and toxicologic Pathology*. 64 ; 487-493

-**Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C. A., Newhall, A.R., Freidman, L. 1966.** A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, Lipid and Glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytic Biochemistry*. 19: 415-429

-**Skulachev, V.P. 1996.** Why are mitochondria involved in apoptotic? Permeability transition pores and apoptotic as selective mechanisms to eliminate superoxide producing mitochondria and cell. *FEBS lett*. 397: 7-10

-**Soohee Kim et Doug-Young Ryu. 2013.** Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J. Appl. Toxicol*. 33: 78–89

-**Soudamini KK, Unnikrishan MC, Soni KB, Kuttan R. 1992.** Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian J Physiol Pharmacol*. 36 :239-43

-**Subash C. Gupta, Sridevi Patchva, and Bharat B. 2013.** Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J. Jan*. 15(1): 195–218

-**Shim, J. S., Kim, D. H., Jung, H. J., Kim, J. H., Lim, D., Lee, S. K., Ahn, J. W., Yoo, J. S., Rho, J. R., Shin, J. and Kwon, H. J., 2002.** Hydrazinocurcumin, a novel synthetic curcumin derivative, is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation. *Bioorgans Medicine and Chemistry*, 10, 2987– 2992.

T

-**Toualbia Nadjiba, Rachid Rouabhi1 et Aya Salmi,. 2017.** Evaluation of Cytochrome c Level and Mitochondrial Dysfunction Biomarkers of *Oryctolagus cuniculus* Liver Exposed to Chlorpyrifos. *Toxicol. Environ. Health. Sci*. Vol. 9(5), 325-331

-**Vaux DL, Korsmeyer SJ,. 1999.** Cell death in development. *Cell*. **96: 245-54**

-Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160: 1-40.

-Vanessa C. 2015. Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées : effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie. Pneumologie et système respiratoire. Université Paris-Est. Français. P: 09

W

-Wharton, D.C., Tzagoloff, A. 1967. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.*10:245–250

- Wilhelmi, V., Fischer, U., Weighardt, H., Schulze-Osthoff, K., Nickel, C., Stahlmecke, B., Albrecht, C. (2013). Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox-and Nrf2-independent manner. *PloS one*, 8(6), e65704.

-Wong, C.K., Cheung, R.Y., Wong, M.H. 2000. Heavy metal concentrations in green-lipped mussels collected from Tool Harbor and markets in Hong Kong and Shenzhen. *Environ. Pollut.* 109, 165–171

-Wylly Ramsés Garcia-nino, José Pedraza-chaverri. 2014. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. *Food. Chem. Toxicol.* 1-12.

-Wu JF, Yu ZM, Song XX, Wang Y 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol Environ Saf* 65:230–236

-Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P., & Lewis, J., 1989. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *AJR*, 152 (1), 167-173

-Warheit D., Laurence B., Reed K., Roach D., Reynolds G., Webb T. 2004. Pulmonary bioassay Toxicity Study in rats with single wall carbon nanotubes. *Compte-rendu du First International Symposium on Occupational Health Implications of Nanomaterials*. P : 59–64

-Weber S., Dorman D.C., Lash L.H., Erikson K., Vrana K.E., and Aschner M. 2002. Effects of Manganese on the Developing Rat Brain: oxidative-stress related endpoints, *Neurotoxicology*. 23(2): 169-175.

-Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zho Y., Chai Z., Chen C., 2008. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicol* 254:82–90.

-Wenger, C. 1984. Alkaline phosphatase. *Clin chem. The C.V. Mosby Co. Si louis. Tronto. Princeton*; 1094-1098

Y

-Yoosefi M, Shariat S, Golabi M, Bahrami A, Dareshour H, Ansaripour M et Modaresi M. 2016. The effects of titanium dioxide nanoparticles on liver histology in mice. *J. Chem. Pharm. Res* 8(4):1313-1316

-Yumei Fu, Shizhong Zheng, Jianguo Lin, Jan Ryerse, and Anping Chen. 2008. Curcumin Protects the Rat Liver from CCl₄-Caused Injury and Fibrogenesis by Attenuating Oxidative Stress and Suppressing Inflammation. *Mol Pharmacol* 73:399–409

-Yang, W., J. I. Peters., Williams 3rd R.O. 2008. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm* 356(1-2): 239-247.

-Yang H. G., C. H. Sun, S. Z. Qiao, J. Zou, G. Liu, S. C. Smith, H. M. Cheng, et G. Q. Lu. 2008. Anatase TiO₂ single crystals with a large percentage of reactive facets, *Nature*, vol. 453, no 7195, p. 638-641

-Yoysungnoen P., Wirachwong P., Bhattarakosol P., Niimi H., Patumraj S. 2006. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers. COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc.* (34) 109–115.

-Yousef MI, El-demerdach FM, Radwan FME. 2008. Sodium arsenite-induced biochemical perturbations in rats : Ameliorating effect of curcumin. *Food Chem. Toxicol.* 46 : 3506-3511

-Salahshoor M, Mohamadian S, Kakabaraei S, Roshankhah S, Jalili C. 2006. Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *J Tradit Complement Med.* 6(2): 176–183.

Z

-Zhu, M. T. Wang Y., Feng W. Y., Wang B., Wang M., Ouyang H., Chai Z.F. 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 8584-8590 .

-Zheng S. Wang Y. Zhou Q. Chen C. 2013. Responses of Oxidative Stress Biomarkers and DNA Damage on a Freshwater Snail (*Bellamya aeruginosa*) stressed by Ethylbenzene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65:251–259

-Zhang F, Altorki N K, Mestre J R, Subbaramaiah K and Dannenberg A J 1999. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells; *Carcinogenesis* 20 : 445–451

X

-Xia, T., M. Kovichich, et al. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 6(8): 1794-1807

-Salahshoor M, Mohamadian S, Kakabaraei S, Roshankhah S, Jalili C. 2006. Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *J Tradit Complement Med.* 6(2): 176–183.



ANNEXE

Annexe 1 : Tableaux de la réalisation de la gamme d'étalonnage

Annexe 1a : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité d'albumine (μg)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

Annexe 1b : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des glucides

Tubes	1	2	3	4	5	6
glucose (μl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

Annexe 1c : Tableau de réalisation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des lipides

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (μl)	100	80	60	40	20	0
Solvant chloroforme/méthanol (μl)	4	4	4	4	4	4

Annexe 2 : productions scientifiques

Communications internationales

BOUTERAA Z ,. Rouabhi R,. HENIN S,. LEMITA L,. BOUSSEKINE S,. TOUALBIA N,. YOUSFI A,. SALMI A. Biochemical study of hepatotoxicity by titanium dioxide and the protective effect of aqueous extract of tumeric (curcuma longa) in wister albino rats. Journée internationale des sciences biologiques et biotechnologie (ATSB 2018), Tounisie Sousse 26-29 Mars 2018

BOUTERAA Z ,. Rouabhi R,. HENIN S,. LEMITA L,.DJABRI B,. YOUSFI A,. TOUALBIA N,. SALMI A. Hépatotoxicité de TiO₂ sur lrs paramètres du stress oxydatif chez les rats wister. 7^{ème} journées scientifiques de l'ATT. Tunisie Monastire 27-29 Avril 2018

BOUTERAA Z ,. Rouabhi R,. HENIN S,. DJABRI B,. YOUSFI A,. TOUALBIA N. effet protecteur du diferyol-méthane contre le stress oxydatif induit par l'oxyde de fer chez les mitochondries isolées des hépatocytes des rats wister. Third international symposium medicinal plants and materials MPM 2020 Algérie Tebessa 25-27 février 2020

Communications nationales

BOUTERAA Z ,. Rouabhi R,. HENIN S,. YOUSFI A,. LEMITA L,.DJABRI B,. TOUALBIA N. Biochemical study of hepatotoxicity by titanium dioxyde and the protective effect curcumin (Curcuma longa) in wister albino rats. Algérie Tebessa 28-29 Octobre 2019

Annexe 3 : Taux de métabolites hépatiques chez les rats témoins et traités après 28 jours

Taux de métabolites	Témoin	Dif-méth	TiO₂	Fe₃O₄	TiO₂+Dif-méth	Fe₃O₄+Dif-méth
Protéine	0,88634± 0,058260733	0,85972± 0,098071234	0,94258± 0,03968157	0,643904± 0,098915065	0,84078± 0,025120251	1,17132± 0,069246618
Glucide	21,7806 ± 0,351744652	31,9124± 3,095371681	25,62592± 1,412542257	32,90808± 1,364201778	26,37742± 0,518691702	20,6845± 2,20072075
Lipide	0,94626± 0,032789678	0,7391± 0,042472815	0,82424± 0,022781198	0,5936± 0,101882702	0,6463± 0,041139701	0,71976± 0,046235084

**Annexes 4 : les paramètres de stress oxydant chez les rats témoins et
traités après 28 jours**

Taux de paramètr es de stress oxydant	Témoin	Dif-méth	TiO₂	Fe₃O₄	TiO₂+Dif- méth	Fe₃O₄+Dif- méth
GSH	0,000372258± 2,50657E-05	0,000330546± 3,27285E-05	0,000302458± 3,44803E-05	0,000436207± 4,53811E-05	0,00033619± 5,14178E-05	0,00023831± 9,48778E-06
MDA	3,07482± 0,591061877	4,65082± 0,58240138	5,96612± 0,538680306	9,7868± 0,485392486	4,414896± 0,36104749	3,647825± 0,658873394
GST	0,0033882± 0,000510405	0,003394± 8,91759E-05	0,0097366± 0,000491192	0,0057891± 0,000138978	0,0035478± 0,000314908	0,0025494± 0,000230945
CAT	0,081272± 0,014082674	0,0614298± 0,008987874	0,11388± 0,009776093	0,122272± 0,003306497	0,0509148± 0,007520225	0,0592654± 0,009570021
GPx	2,2828294± 0,402966327	2,87134± 0,319020944	1,6532± 0,022521434	1,91134± 0,23498708	2,23176± 0,304438923	2,497302± 0,12608923

Acta Scientifica Naturalis

Former Annual of Konstantin Preslavsky University of Shumen: Chemistry, Physics, Biology, Geography

 Journal homepage: asn.shu.bg
Cellular apoptosis, mitochondrial swelling, permeability and Cytochrome-c level after (Fe₃O₄)-NPs nanoparticles exposure and protective role of diferuloylmethane in Rats liver
Zina Bouteraa, Rachid Rouabhi*, Fouad Menaceur, Salim Gasmi

Applied Biology department, Faculty of Exact, Nature and life sciences, Larbi Tebessi University, Tebessa, Algeria, 12000

Laboratory of Toxicology and Ecosystems pathologies, Larbi Tebessi University, Tebessa, Algeria

Abstract: *During recent years the defensive role of diferuloylmethane against oxidative stress and apoptosis has been experimentally documented. Fe₃O₄-NPs can cause cellular death by inducing oxidative stress. Present study aimed to investigate whether diferuloylmethane could protect rats mitochondria against Fe₃O₄-NPs intoxication. Twenty adult male rats were randomly chosen and divided into four groups: control; treated with 10 mg/kg/d of Fe₃O₄-NPs; treated with diferuloylmethane at the dose 20 ml/kg/d; treated with Fe₃O₄-NPs (10 mg/kg/d) and diferuloylmethane (20 ml/kg/d) respectively for 28 days. The results showed that Fe₃O₄-NPs increased the Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lipid peroxidation, mit-GSH (Glutathione), mit-CAT (Catalase), mit-GST (Glutathione S-transferase) and decreased mit-GPx (Glutathione peroxidase), with increased in mitochondrial swelling and permeability followed by the increasing level of plasmatic Cyt-c. The addition of diferuloylmethane (DFM) to these samples reduces or corrects the amount of the most of biomarkers. These findings have demonstrated that DFM can act as an antioxidant and antiapoptotic factor against damages induced by Fe₃O₄-NPs.*

Keywords: *mitochondrial status, oxidative stress, Cyt-c, apoptosis, diferuloylmethane*

Introduction

Nanotechnology is one of innovative technologies, find his way of application in molecular imaging, particularly in magnetic resonance imaging (MRI), fluorescence imaging, computed tomography imaging and ultrasound techniques [1, 2]. Nanoparticles (NPs) may be defined as materials that have at least one dimension less than 100 nm [3]. However, the increased surface area of NPs may exhibit greater biological activity, such as an increased generation of reactive oxygen species (ROS) when compared with the large particles at equivalent mass [4, 32].

Oxide nanoparticles (IONPs) are composed of magnetite (Fe_3O_4) or maghemite (Fe_2O_3). They possess superparamagnetic properties which give them enormous potential as mediums for diagnosis and therapy. Superparamagnetic can be functionalized and associated with numerous organic compounds which is useful for specific targeting of altered pathological cells/tissues and efficient drug delivery [5]. Many In Vivo studies suggested that Fe_3O_4 -NPs can be accumulated in the liver, kidney, lung, spleen, brain, and heart, and can generate various inflammatory responses [6, 7], impaired mitochondrial function, and alteration of membrane integrity, oxidative stress [8], chromatin condensation [9], genotoxicity [10] and cellular apoptosis [11]. These adverse effects depend not only on the chemical composition and the dose of nanoparticles, but also on their size [12, 13].

Medicinal plants are traditionally utilized to treat human disorders. *Curcuma longa* is one of the most commonly used herbal medicines. Many studies revealed the protective or therapeutic effects of diferuloylmethane in different forms of liver injury such as hepatitis, alcoholic and nonalcoholic fatty change, hepatocellular carcinoma and hepatotoxicity induced by drugs [14, 15]. Curcumin (CUR; 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6heptadiene-3,5-dione) is a natural yellow pigment isolated from the rhizome of *Curcuma longa* L. (turmeric). It possesses a wide range of pharmacological properties including anti-inflammatory, hypocholesterolemia and ant infectious activities [16, 17]. This study aims to investigate the impact of Fe_3O_4 -NPs on the apoptotic status of the hepatic rats and the efficacy of diferuloylmethane as an antioxidant/antiapoptotic molecule on these damages.

Material and Methods

Chemicals

Experimental Design

We have handled 20 rats; these rats were divided onto 4 lots of 5 rats and we kept five rats as control. The treatments began at the 15th day (adaptation period of rats) all treatments are per *O*s (p.o) as follows:

Group 1: Controls.

Group 2: Treated with Fe_3O_4 -NPs at 10 mg/kg for 28 days.

Group 3: Treated with diferuloylmethane (DFM) at 20 ml/kg for 28 days.

Group 4: Treated with combination NPs and DFM.

After 28 days of treatment the rats were sacrificed and the serum and livers were collected; the mitochondrial extraction were proceeding some parameters of oxidative stress in hepatic mitochondria (GSH, GST, MDA, CAT and GPx) was investigated crowned by the estimation of cytochrome C oxidase and swelling and permeability parameters.

Determination of cytochrome c level

Determination of cytochrome c level in liver tissue was performed using commercial kit the cytochrome c assay kit (CYTOCOXI), uses an optimized colorimetric assay based on observation of the decrease in absorbance of ferrocytochrome c measured at 550 nm.

Extraction of Mitochondria

All operations were carried on ice. Cells were placed into buffer A containing 50 mM tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.40 at +4°C. Then, the homogenate was centrifuged at 1300 g for 3 min, 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000 g for 10 min, 4°C to sediment mitochondria. Finally, the mitochondrial pellet was washed twice and then suspended in 50 mM Tris, 70 mM sucrose, 210 mM mannitol, pH 7.4 at +4°C. Protein content was routinely assayed with a Bradford assay using bovine serum albumin as a standard [44]. Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

Mitochondrial Swelling

Assay According to the method of Kristal et al. [45], we carried out the estimation of the mitochondrial permeability based on the rate of traverse of Ca^{++} followed by an increase in mitochondrial size detected at 540 nm wavelength for 2 minutes and each 15 seconds.

Determination of Glutathione (GSH)

The determination of glutathione realized by Weckbker & Cory [46]. The principle of this determination is based on measuring the absorbance of 2nitro-5-mercapturique.

Lipid peroxidation assay MDA

The lipid peroxidation is determined by the reaction of thiobarbituric acid with MDA and measured according to the method of Esterbauer et al. [47].

CAT

The spectrophotometric assay of catalase (CAT) activity was performed according to the method of Cakmak and Horst. [48]. The decrease of absorbance is recorded for three minutes by a spectrophotometer at a wavelength of 240 nm and an extinction coefficient $\epsilon=39400 \text{ L}\cdot\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

GST

The activity of glutathione S-transferase (GST) was determined according to the method of Habig et al. [49]. It is based on the conjugation reaction between GST and a substrate, the CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) as a cofactor of glutathione (GST), the conjugation results in the formation of a new molecule: 1-S-glutathionyl-2,4-dinitrobenzene to measure the activity of GST.

GPx

The enzymatic activity of GPx was measured by the method of Flohe & Gunzler. [50] using H₂O₂ as substrate.

Statistical Analysis

The significant differences between the control and the treated groups were determined by the Student's t test. Statistical calculations were carried out using Minitab 18.1 statistical package and the Excel 2010 (Microsoft, Inc.).

Results

Effects of Fe₃O₄-NPs on serum ALT and AST level

The effect of Fe₃O₄-NPs on AST and ALT levels in hepatic serum of male albino wistar rats is described in the Figure 1.

After exposure to nanoparticles the AST level was increased to 205.68±4.71 IU/L according to the controls (168±6.78 IU/L). After administration of diferuloylmethane the AST level was return to 96.6±9.66 IU/L.

The control had shown the AST level in serum of 47±5,522IU/L but after Fe₃O₄-NPs treatment; it increased to 67.674±6.222IU/L. whereas after administration of diferuloylmethane at the dose of 20 ml/kg bw po in Fe₃O₄-NPs intoxicated rats, the ALT level reduced to 47.434±5.710IU/L.

Assessment of Oxidative Stress Enzymes

Assessment of GSH and MDA

Treatment of rats with 10 mg/kg Fe₃O₄-NPs during 28 days results increase of the glutathione content in the hepatic mitochondria (27.079±1.055)*10⁻⁴ μM/mg and decreased after administration of diferuloylmethane at the dose 20 ml/kg in Fe₃O₄-NPs intoxicated rats (13.38±64.93)*10⁻⁵ μM/mg compared to the control group (15.456±1,111)*10⁻⁵ μ/mg (Figure 2).

The Figure 3 shows the impact of Fe₃O₄-NPs in 10 mg/kg and effect protective by the diferuloylmethane 20 ml/mg in Fe₃O₄-NPs intoxicated on the lipidic peroxidation in hepatocyte rats by the estimation of the MDA level. The dose of Fe₃O₄ cause a very significant (p<0.001) increase in MDA level

(54,626±4,230 μM/mg) and decrease very significant (p<0.001) in the Fe₃O₄-DFM (41.262±0,919 μM/mg) against (31,796±0,603μM/mg) in controls.

Assessment of Oxidative Stress Enzymes

Treatment by 10 mg/kg of Fe₃O₄-NPs causes increase in enzymatic activity of mitochondrial GST, CAT and decreased in GPx after administration of DFM in the Fe₃O₄-NPs intoxicated respectively decreases in GST, CAT, and increased in GPx according to the group control (Figures 4, 5, and 6).

Assessment of cytochrome oxidation

Treatment by 10 mg/kg of Fe₃O₄-NPs causes an increase in cytochrome oxidation and decreased after administration of DFM in the Fe₃O₄-NPs intoxicated respectively, according to the control group (Figure 7).

Mitochondrial Assays

Effects of Fe₃O₄-NPs on rats mitochondrial swelling and permeability are shown in the (Figures 8 and 9), it is clear that the dose of iron oxide nanoparticle increase the mitochondrial swelling by the increase of permeability and the dose of DFM in Fe₃O₄-NPs decrease the mitochondrial swelling by the decrease of permeability.

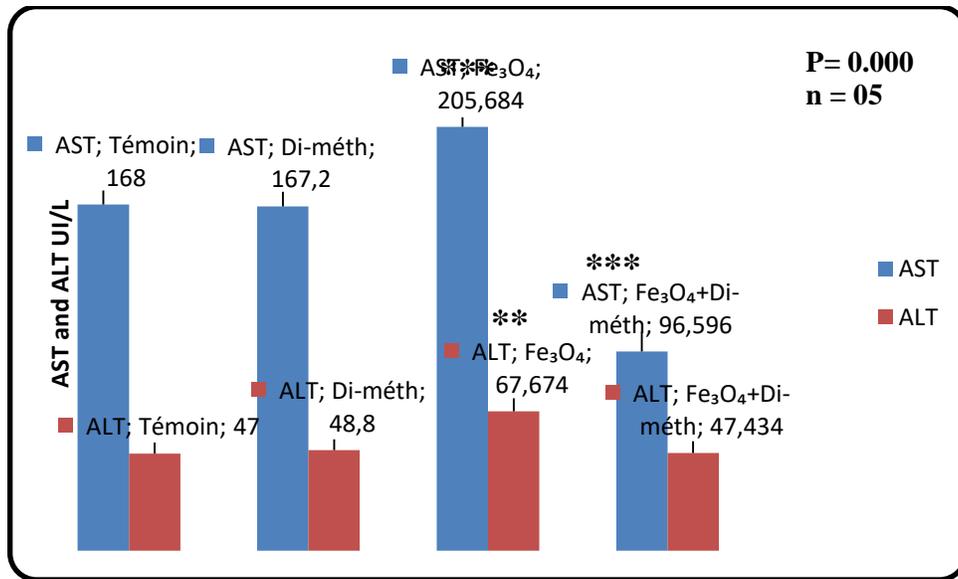


Fig. 1. Effect of diferuloylmethane on serum AST (aminotransferase) and ALT (Alanine aminotransferase) levels in Fe₃O₄-NPs induced hepatotoxicity in albino wistar rats after 28 days (p<0.001)

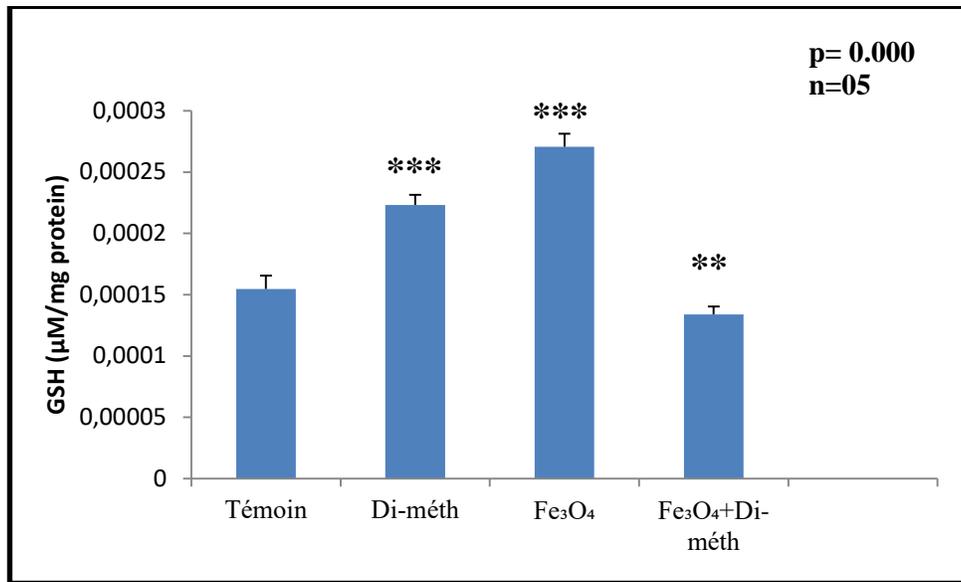


Fig. 2. Variation of stromal GSH (µM/mg prot.) in the control and treated hepatic rats after 28 days (p<0.001)

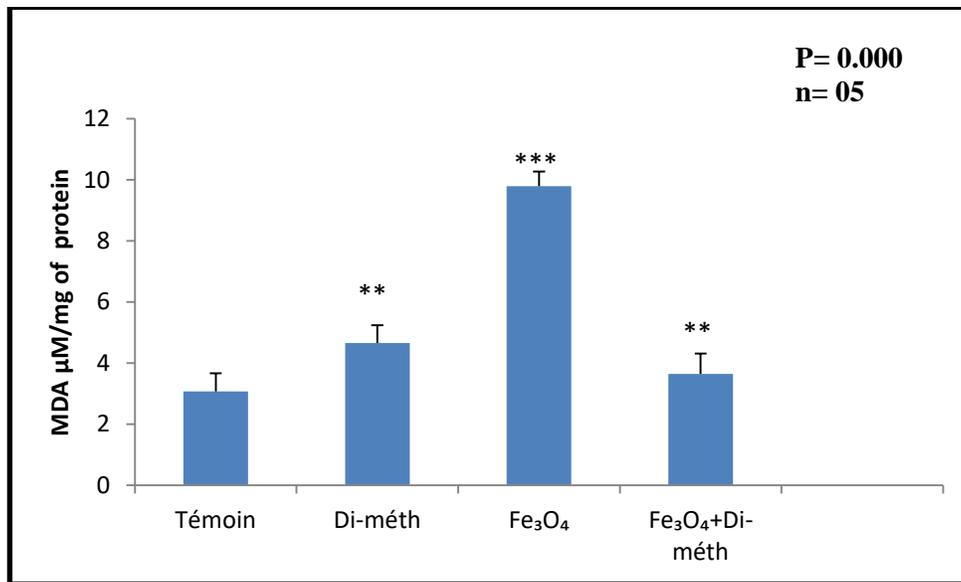


Fig. 3. Variation of stromal MDA (µM/mg prot.) in the control and treated hepatic rats after 28 days (p<0.001)

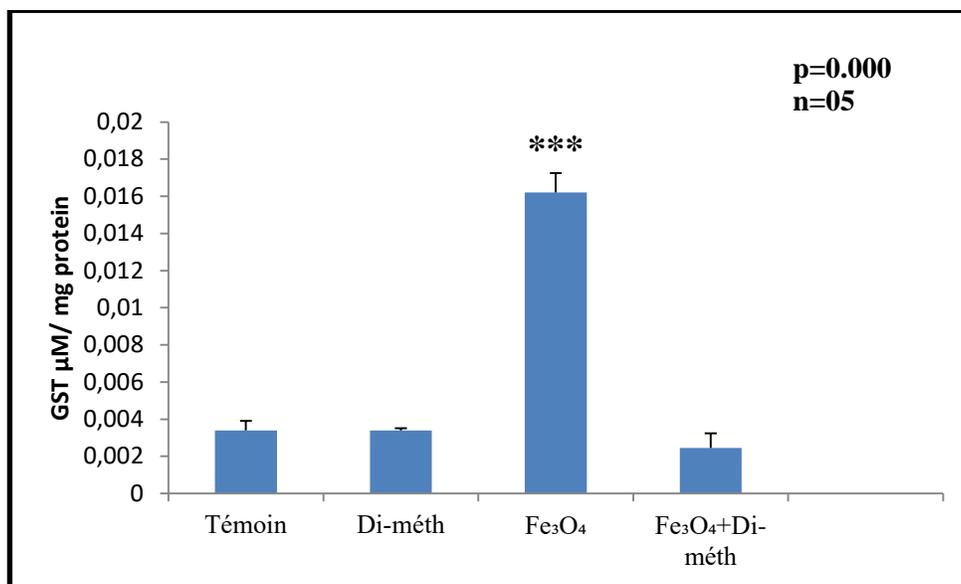


Fig. 4. Variation of stromal GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg prot.}$) in the control and treated hepatic rats after 28 days ($p < 0.001$)

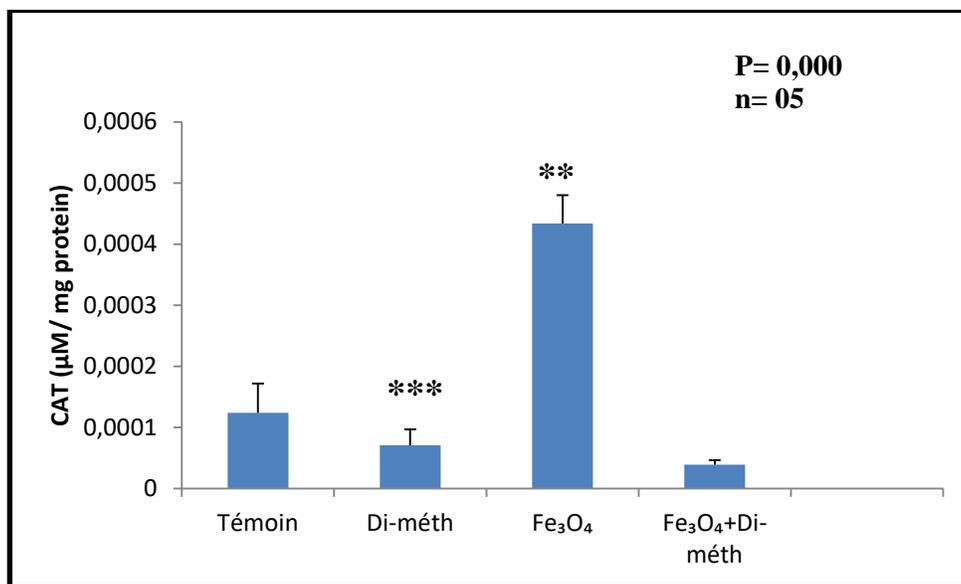


Fig. 5. Variation of stromal CAT ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg prot.}$) in the control and treated hepatic rats after 28 days ($p < 0.001$)

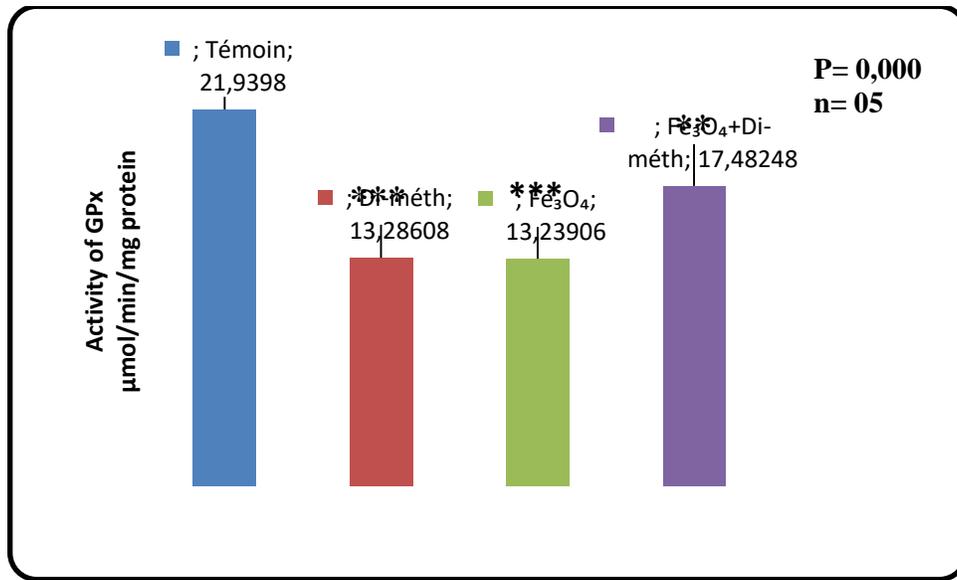


Fig. 6. Effect of Fe₃O₄-NPs treatments on the variation of stromal GPx (µM/mg) after 28 days (p<0.001)

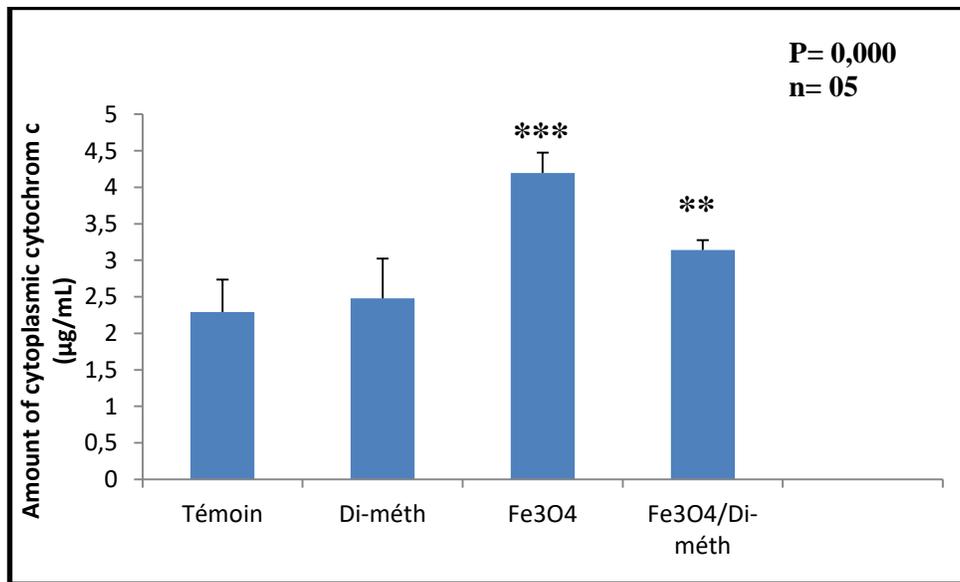


Fig. 7. Effect of Fe₃O₄-NPs treatments on the variation of cytochrome c (µg/ml) after 28 days (p<0.001)

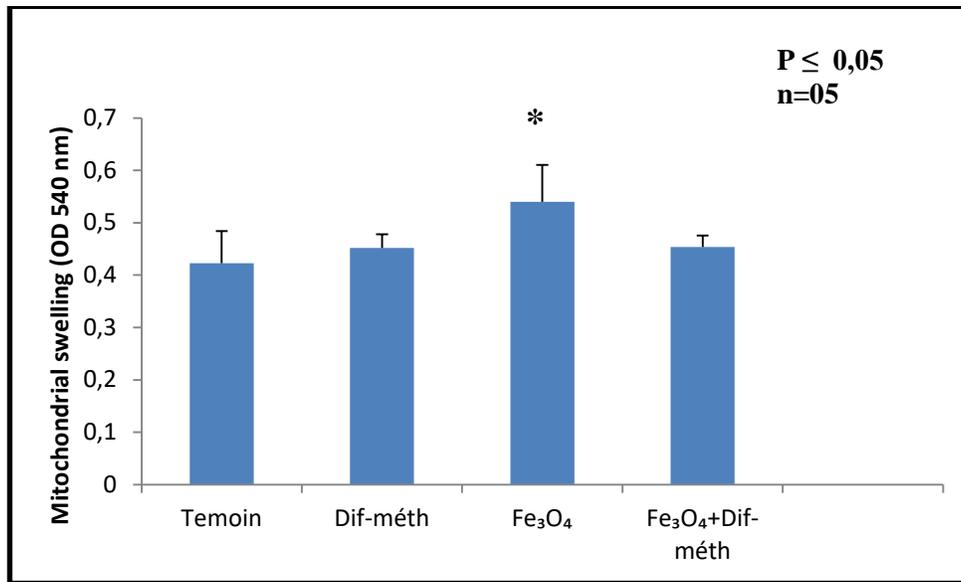


Fig. 8. Effect of Fe₃O₄-NPs at 10 mg/ kg and Dif-méth 20 ml/kg on hepatic mitochondrial swelling at OD540 nm after 28 days

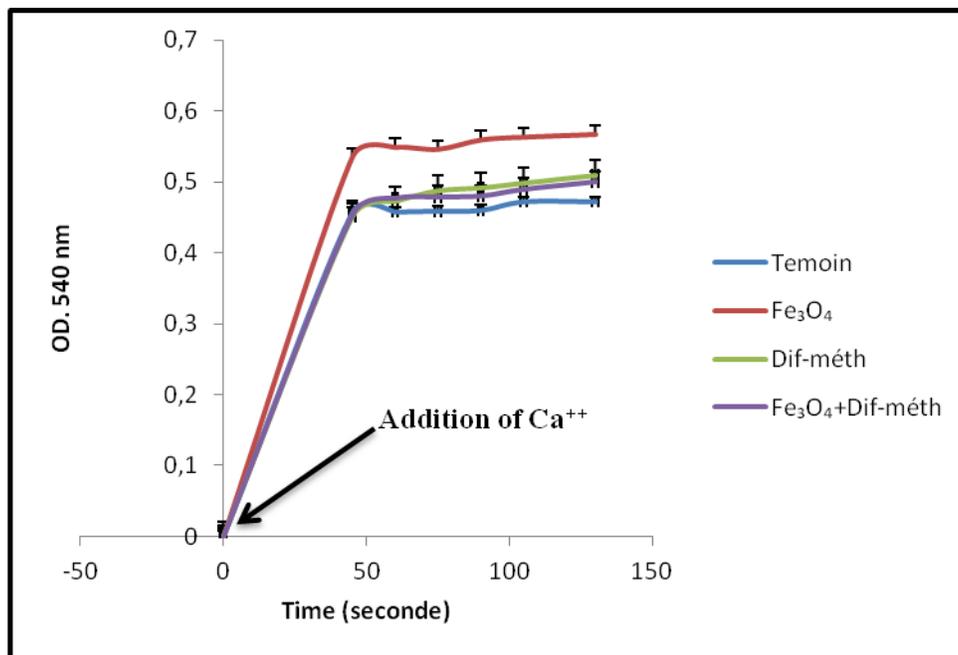


Fig. 9. Effect of Fe₃O₄-NPs and DFM on hepatic mitochondria permeability after 28 days

Discussion

Liver is highly prone to toxicity as it is the major organ involved in metabolism and detoxication of xenobiotics. Liver plays a critical role in clearance of nanoparticles from circulation. Phase transforming enzymes in liver convert these xenobiotics into more water-soluble compounds.

This research was supported in part by hepatotoxicity of Fe₃O₄-NPs and other part by hepatoprotective of diferuloylmethane. From the most important parameters that can be useful in evaluation of hepatotoxic effects of Fe₃O₄-NPs include aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT). Thereby, elevated transaminases (AST and ALT) may be an indicator of hepatocyte destruction, either due to the direct toxic effects of NPs or the subsequent immune system activity [18, 19]. In this study, we have demonstrated that the oral administration of Fe₃O₄-NPs cause a very significant ($p < .001$) increased in the serum activity of ALT and AST is indicative for liver damage and thus causes alteration in liver function, This elevated activity was decreased by the diferuloylmethane is an indication of prevention of hepatic tissue damage caused by Fe₃O₄-NPs. This study concordant to the results of Jinyuan et al. and Jacobs et al. [20, 21]. The serum activity of these enzymes is measured for the detection of liver disorders [22]. Which are hepatotoxicity and impaired liver function indicators [23, 24].

Fe₃O₄-nanoparticles can cause cell death by induced oxidative stress [25, 26]. ROS such as anions, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide is by products of oxidative metabolism, which occurs in mitochondria. Cells respond to increased levels of ROS by a “detoxification” mechanism, which involves enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase [27]. Further, GSH an antioxidant tripeptide, represents 90% of the non-protein intracellular thiols and neutralizes the H₂O₂, O₂ and lipid hydroperoxides by its functional group-SH [28]. The administration of Fe₃O₄-NPs causes a very significant ($p < .001$) increasing in the amount of GSH in hepatic mitochondria. Various studies have indicated that cellular levels of GSH are either increased or decreased after in *in vitro* treatment with NP [29], the increased levels of GSH in some NPs treated cell may involve cellular response to coping with NPs-mediated oxidative stress damage, in contrast the decreased levels of GSH inhibitor synthesizing enzyme and/or abnormally increased demand for GSH in conjugation with electrophilic molecules [30, 31]. However, the hepatoprotective by DFM is observed in rats supplemented with DFM. The diphenylmethane is bifunctional antioxidant the presence of phenolic groups in the structure of diferuloylmethane explain the ability to react directly with reactive species and to induce an up-regulation of various cytoprotective and antioxidant proteins [32-34]. Recent studies indicate that mechanism of action of diferuloylmethane is inhibition of Ca²⁺ entry and PKC activity. The diferuloylmethane exerts antioxidant and anti-inflammatory effects by inhibiting NF- κ B and suppressing major proinflammatory cytokines like IL-6 and TNF- α [35]. In this study, the mitochondrial hepatic MDA increased according to the results of [36], the elevated amount of MDA and activity of GPx

suggests the enhanced formation of lipid peroxidation leading to hepatotoxicity and a deficiency of antioxidant protection against the formation of excessive free radicals [35]. These results are concordant with the results of [37].

Moreover, diferuloylmethane scavenges or neutralizes the free radicals, interacts with oxidative cascade, quenches oxygen, inhibits oxidative enzymes like cytochrome P450, and chelates metal ions like Fe^{2+} , inhibits peroxidation of membrane lipids and maintains cell membrane integrity and their function in the liver, lungs and kidneys [38]. In our studies the diferuloylmethane could also decreased the GST and CAT, the hepatoprotective effect of diferuloylmethane may be due to its antioxidant action. The oxidative stress has an important role in the hepatotoxicity induced by NPs, the results obtained in this study concordant with other studies suggesting that increased CAT are common cellular defense mechanisms against ROS and oxidative stressors. These enzymes are also considered to be sensitive biomarkers for hepatic oxidative stressors [39].

Our results confirmed that treatment with Fe_3O_4 -NPs increased cytochrome c levels caused by swelling and permeability high amount. The permeability transition (PTP) would be associated with the reduction in potential mitochondrial membrane, the opening PTP and the entry of compounds osmotically active causes swelling mitochondria. Following this swelling, the outer membrane can break and cause the release of proapoptotic molecules (cytochrome c, AIF: Apoptosis Inducing Factor). The cytochrome c then released interacts with Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) and pro-caspase 9, which results in the activation of apoptosis [40].

Further, diferuloylmethane activates the Heme oxygenase-I (HOI) gene, a redox-sensitive inducible protein that provides protection against various forms of stress. This activation was done by regulation of Nrf2, and the antioxidant responsive element which in turn enhances renal mitochondrial cytochrome c oxidase activity [41]. Nrf2 is also known to activate the transcriptional genes coding for antioxidants or phase II detoxifying enzymes [42]. Both HSP70 and HO-1 are stress proteins that have been implicated in defense mechanisms against agents that may induce oxidative injury [43].

Conclusion

In this work, we are interested in the toxic effect of Fe_3O_4 -NPs and protective effect of diferuloylmethane on the subcellular scale. We demonstrated that diferuloylmethane can effectively protect against Fe_3O_4 -NPs-induced cell death in rat liver tissue.

Compliance with Ethical Standards: This study has no funding from any institution.

Conflict of Interest: No conflict of interest.

References

- [1] Wickline, S. A.; Lanza, G.M., Nanotechnology for molecular imaging and targeted therapy. *Circulation*, **2003**, *107*, 1092–1095.
- [2] Lanza, GM; Abendschein, DR; Yu, X; Winter, PM; Karukstis, KK; Scott, MJ; Fuhrhop, RW; Scherrer, DE; Wickline, SA, Molecular imaging and targeted drug delivery with a novel, ligand-directed paramagnetic nanoparticle technology. *Acad. Radiol.*, **2002**, *9*, S330–S331.
- [3] Balasubramanyam, A.; Sailaja, N.; Mahboob, M; Rahman, MF; Hussain, SM; Grover, P., *In vivo* genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. *Mutagensis*, **2009**, *24* (3), 245–251.
- [5] Paunovic, J.; Vucevic, D.; Radosavljevic, T.; Pantic, S.; Nikolovski, D.; Dugalic, S.; Pantic, I., Effects of metallic nanoparticles on physiological liver functions. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **2017**, *49*, 123-127.
- [6] Brown, JS; Zeman, KL; Bennett, WD, Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med.*, **2002**, *166*, 1240-1247.
- [7] Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima, D.; Yamamoto, S.; Fukushima, A.; Funabashi, T.; Kobayashi, T.; Fujimaki, H., Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **2008**, *226*, 192–198.
- [8] Naqvi, S.; Samim, M.; Abdin, M.; Ahmed, F.J.; Maitra, A.; Prashant, C.; Dinda, A.K., Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine*, **2010**, *5*, 983–989.
- [9] Häfeli, UO; Riffle, JS; Harris-Shekhawat, L; Carmichael-Baranauskas, A; Mark, F; Dailey, JP; Bardenstein, D., Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Mol Pharm.*, **2009**, *6*(5), 1417–1428.
- [10] Naghavi, N.; Ghodduzi, J.; Sadeghnia, H.R.; Asadpour, E.; Asgary, S., Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent. Mater. J.*, **2014**, *33*(1), 64–69.
- [11] Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M., Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem C.*, **2009**, *113*(22), 9573-9580.
- [12] Hong, SC; Lee, JH; Lee, J; Kim, HY; Park, JY; Cho, J; Lee, J; Han, DW, Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int J Nanomedicine*, **2011**, *6*, 3219-3231.
- [13] Karlsson, H.L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L., Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*, **2008**, *21*(9), 1726-1732.

- [14] Farombi, EO; Shrotriya, S; Na, HK; Kim, SH; Surh, YJ., Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. *Food Chem Toxicol*, **2008**, *46*, 1279-1287.
- [15] Nabavi, S.F.; Daglia, M.; Moghaddam, A.H.; Habtemariam, S.; Nabavi, S.M., Curcumin and liver disease: from chemistry to medicine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2014**, *13*, 62-77.
- [16] Aggarwal, B.B.; Harikumar, K.B., Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent. Against neurodegenerative diseases. *Int J Biochem cell Biol*, **2009**, *41(1)*, 40-59.
- [17] Cole, G.M.; Teter, B.; Frautschy, S., Neuroprotective effects of curcumin in: the molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. *Adv Exp Med Biol*, **2007**, *595*, 197-212.
- [18] Hutchison, TA; Shahan, DR; Anderson, ML, Drugdex System. Englewood, CO; Micromedex Inc. Expires, **2000**.
- [19] Tice, S.A.; Parry, D., Medications that need hepatic Monitoring. *Hospital Pharmacy*, **2001**, *36(4)*, 456-464.
- [20] Chen, J; Dong, X; Zhao, J; Tang, G., In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol*, **2009**, *29(4)*, 330–337.
- [21] Jacobs, JJ; Skipor, AK; Black, J; Urban, Rm; Galante, JO, Release and excretion of metal in patients who have a total hip replacement component made of titanium base alloys. *J. Bone Joint. Surg. Am.*, **1991**, *73(10)*, 1475-1486.
- [22] Kim, H.J.; Jang, Y.P., Direct analysis of curcumin in turmeric by DART-MS. *Phytochem. Anal.*, **2009**, *10*, 1002-1136.
- [23] Somchit, MN et al., Hepatoprotective effects of Curcuma longa rhizomes in paracetamol-induced liver damage in rats. *Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources*. **2002**, 698-702.
- [24] Fu, Y; Zheng, S.; Lin, J.; Ryerse, J.; Chen, A., Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol. Pharmacol.*, **2008**, *73(2)*, 399-409.
- [25] Johnston, HJ, Hutchison, GR; Christensen, FM; Peters, S.; Hankin, S.; Stone, V., Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Part Fibre Toxicol*, **2009**, *6*, 33.
- [26] Li, PF; Dietz, R.; von Harsdorf, R., Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **1997**, *96*, 3602-3609.

- [27] Armstrong, J.S.; Steinauer, K.K.; Hornung, B.; Irish, J.M.; Lecane, P.; Birrell, G.W.; Peehl, D.M.; Knox, S.J., Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ*, **2002**, *9*, 252-263.
- [28] Mishra, R.K.; Singh, S.K., Reversible antifertility effect of aqueous rhizome extract of *Curcuma longa* L. in male laboratory mice. *Contraception*, **2009**, *79*, 479-487.
- [29] Fadila, K; Houria, D; Rachid, R; Reda, DM., Cellular response of pollution biondicator model (*Ramalina farinacea*) following treatment with fertilizer (NPKs). *Am-Eurasian J Toxicol Sci*, **2009**, *1* (2), 69-73.
- [30] Arora, S; Jain, J; Rajwade, JM; Paknikar, KM, Cellular responses induced by silver nanoparticles: *in vitro* studies. *Toxicol Lett*, **2008**, *179*, 93-100.
- [31] Ferkas, J; Christian, P; Gallego-Urrea, JA; Roos, N; Hassellöv, M; Tollefsen, KE; Thomas, KV, Uptake and effects of manufactures silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, **2011**, *101*, 117-125.
- [32] Dinkova-Kostova, A.T; Talalay, P., Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins, *Mol Nutr Food Res*, **2008**, *52*, Suppl. 1, 128-138.
- [33] Reddy, ACP; Lokesh, BR, Studies on the inhibitory effects of curcumin and euganol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem*, **1994**, *137*, 1-8.
- [34] Somparn, P; Phisalaphong, C; Nakornchai, S; Unchern, S; Morales, NP, Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull*, **2007**, *30*(1), 74-78.
- [35] Motaghinejad, M.; Karimian, M.; Motaghinejad, O.; Shabab, B.; Yazdani, I.; Fatima, S, Protective effect of various dosage of Curcumin against morphine induced apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Pharmacol Rep*, **2015**, *67*(2), 230-235.
- [36] Afaq, F; Abidi, P; Matin, R; Rahman, Q., Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol*, **1998**, *18*(5), 307-312.
- [37] Rouabhi, R.; Gasmi, S.; Boussekine, S.; Kebieche, M., Hepatic Oxidative Stress Induced by Zinc and Opposite Effect of Selenium in *Oryctolagus cuniculus*. *J. Environ. Anal. Toxicol.*, **2015**, *5*, 289.
- [38] Sharma, V.; Sharma, C.; Paliwal, R.; Sharma, S., Protective Potential of Curcuma longa and Curcumin on Aflatoxin B Induced Hepatotoxicity in Swiss Albino Mice. *Asian J. Pharm. Hea. Sci.*, **2011**, *1*, 116-122.
- [39] Lee, CP; Shih, PH; Hsu, CL; Yen, GC, Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl4-induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*, **2007**, *45*(6), 888–895.
- [40] Henine Sara; Rouabhi Rachid; Gasmi Salim; Amrouche Aml; Abide Amna; Salmi Aya; Toualbia Nadjiba; Taib Chahinez; Bouteraa Zina; Chenikher Hajer; Boussekine Samira; Kebieche Mohamed; Aouimeur Mariem; Djabri Belgacem, Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial

respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, **2016**, 8 (2), 161-167.

[41] Balogun, E.; Hoque, M.; Gong, P.; Killeen, E.; Green, C.J.; Foresti, R.; Alam, J.; Motterlini, R., Curcumin activates the heme oxygenase-I gene via regulation of NrF2 and the antioxidant responsive element. *Biochem J.*, **2003**, 371, 887-895.

[42] Cho, H.Y.; Jedlicka, A.E.; Reddy, S.P.; Kensler, T.W.; Yamamoto, M.; Zhang, L.Y.; Kleeberger, S.R., Role of NrF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **2002**, 26, 175-182.

[43] Calabrese, V.; Scapagnini, G.; Ravagna, A.; Fariello, R.G.; Giuffrida Stella, A.M.; Abraham, N.G., Regional distribution of heme oxygenase, HSP70, and glutathione in brain: relevance for endogenous oxidant/antioxidant balance and stress tolerance. *J Neurosci Res*, **2002**, 68(1), 65-75.

[44] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248-254.

[45] Kristal, B.S.; Park, B.K.; Yu, B.P., 4-hydroxynonanal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 6033-6038.

[46] Weckbker, G.; Cory, J.G., Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells *in vitro*. *Cancer Lett*, 1988, 40, 257-264.

[47] Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jungens, G., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, **1992**, 13, 341.

[48] Cakmak, I.; Horst, W.J., Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum.*, **1991**, 83, 463-468.

[49] Habig, H.; Pabst, M.J.; Jokoby, W.B., Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **1974**, 249, 7130-7139.

[50] Flohe, L.; Gunzler, W.A., Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, **1984**, 105, 114-121.