



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



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD
En : Sciences biologiques
Option : TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Par : **Taib Chahinez**

Intitulée :

**NEUROTOXICITE DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE
FER ET L'EFFET PROTECTEUR DE SELENIUM CHEZ
LES LAPINS *ORYCTOLAGUS CUNICULUS***

Devant le jury :

M. Arab Karim	Prof	Université de USTHB	Président
M. Rouabhi Rachid	Prof	Université de Tébessa	Rapporteur
M. Djabri Belgacem	Prof	Université Tébessa	Examineur
Mm. Yahiaoui K.	MCA	Université de USTHB	Examinatrice
M. Menaceur F.	MCA	Université USTHB	Examineur

Date de soutenance : 09 / 01 / 2018

ملخص

يستخدم أكسيد الحديد النانوي بشكل أكثر تحديدا في المجال الطبي، اليوم لا يعرف سوى القليل عن الأكسدة و الإجهاد التأكسدي الناتج من Fe_3O_4 على مختلف المناطق الدماغية. يعتبر السيلينيوم عنصر اساسي للتغذية و قد اهتمت البحوث في السنوات الاخيرة بدراسة هذا العنصر بسبب اهميته الهائلة المضادة للأكسدة الناتجة عن الجذور الحرة للأكسجين.

وتخصص هذه الدراسة لدراسة تأثير جسيمات أكسيد الحديد النانوية في جرعات مختلفة (75، 150، 200 و 300 ميكروغرام/كغ/يوم) على المكونات البيو كيميائية للدماغ مثل البروتينات الكلية والكاربوهيدرات و الدهون، على مستوى GSH،MDA و $TNF-\alpha$ و على الانشطة الأنزيمية (GST، GPx، CAT، SOD، AChE و 3-Caspase) على المستوى الخلوي و/أو الميتوكوندري. وكانت مهتمة أيضا دراسة زيادة حجم و نفاذية الميتوكوندريا، والتنفس الخلوي عند الأرنب أوريكتولاغوس كونيكولوس *Oryctolagus cuniculus*. وكان هدفنا أيضا معرفة ما إذا كانت اضافة 0.05 ميكروغرام/كغ/يوم من السيلينيوم في شكل سيلينيت الصوديوم له تأثير وقائي في مواجهة سمية أكسيد الحديد ، وبالتالي يمكن أن تكون بمثابة ترياق في أمراض الجهاز العصبي.

أظهرت النتائج أن وجود تلك المصادر القائمة على الحديد المعدني تؤدي إلى زيادة في نسبة السكر و البروتين وانخفاض مستوى الدهون في الخلية العصبية. بالنسبة للإنزيمات أظهرت النتائج أن أكسيد الحديد النانومتري أدى إلى تغيرات مست كل النشاطات الإنزيمية (AChE, GPx, GST, SOD, CAT و Caspase3) إضافة إلى زيادة في نسبة $TNF-\alpha$ و MDA كمؤشر لهدم الدهون و و انخفاض في GSH على مستوى الخلية العصبية و الميتوكوندري. كما ان هناك تأثير على التنفس الخلوي، النفاذية و حجم الميتوكوندري. في حين يقوم السيلينيوم بتصحيح الآثار السامة للجزيئات النانوية (أكسيد الحديد). وأخيرا، تشير دراستنا إلى أن الإجهاد التأكسدي العالي في الدماغ للأرناب هو أصل السمية العصبية ويمكن أن يسبب الأمراض العصبية التنكسية.

الكلمات المفتاحية:

أكسيد الحديد النانوي، السيلينيوم ،السمية العصبية، الإجهاد التأكسدي، الميتوكوندريا، التنفس، الدماغ، المخيخ.

Abstract

The iron oxide nanoparticles are used more particularly in the medical field, today little is known about the oxidative stress and the neurotoxic potential of Fe₃O₄ on different encephalic regions, in addition selenium (Se) is an essential trace element, in recent years, Se research has attracted tremendous interest because of its important role in antioxidant selenoproteins for protection against oxidative stress initiated by excess reactive oxygen species (ROS).

This research is devoted to the study of the effect of iron oxide nanoparticles at different doses (75, 150, 200 and 300 µg/kg/day) on encephalic metabolites such as total proteins, carbohydrates and lipids, on the level of GSH, MDA and TNF-α, and on the enzymatic parameters (GST, GPx, CAT, SOD, AchE and Caspase-3) at the cytosolic and/or mitochondrial level. Also interested was the study of swelling and mitochondrial permeability, and cellular respiration in rabbits *Oryctolagus cuniculus*. Our objective was also to know if the supplementation of 0.05 µg/kg/day of selenium in the form of sodium selenite has a preventive effect against the toxicity of iron oxide and can thus serve as an antidote in diseases of the nervous system.

Our results showed that nanoparticles affected metabolites, increase of carbohydrates and proteins and decrease of lipids. For enzymes activities our results showed that Fe₃O₄ nanoparticles induced a lot of modifications of enzymes activities (GST, GPx, CAT, SOD, AchE and Caspase-3). On non-enzymatic parameters, our results showed an increase of TNF-α also an increase of MDA index lipid peroxidation and decrease of GSH in mitochondria and cells. Other toxic effects affected respiration, and mitochondrial swelling. While selenium corrects the toxic effects of iron oxide nanoparticles. Finally, our study suggests that the dysfunction of the high oxidative stress in the rabbit brain treated with the nanoparticles is the origin of the neurotoxicity and can cause neurodegenerative diseases.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, selenium, neurotoxicity, oxidative stress, mitochondrial swelling, respiration, brain, cerebellum.

Résumé

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont les plus utilisés en particulier dans le domaine médicale, aujourd'hui on sait peu sur le stress oxydant et le potentiel neurotoxique de Fe_3O_4 sur les différentes régions encéphalique. En revanche le sélénium est un oligoélément essentiel de régime alimentaire, ces dernières années la recherche a attiré des intérêts considérables en raison de son rôle important pour la protection contre le stress oxydatif initiée par les espèces réactives de l'oxygène.

Ce travail est consacré à l'étude de l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer à des doses différentes (75, 150, 200 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jours}$) sur les métabolites encéphaliques tels que les protéines totales, les glucides et les lipides, sur le taux de GSH, de MDA et de $\text{TNF-}\alpha$, et sur les paramètres enzymatiques (GST, GPx, CAT, SOD, AchE et Caspase-3) au niveau cytosolique et/ou mitochondriale. On a intéressé aussi de l'étude de gonflement et de perméabilité mitochondriale, et la respiration cellulaire chez les lapins *Oryctolagus cuniculus*. Notre objectif était également de savoir si la supplémentation de 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ de sélénium sous forme de sélénite de sodium a un effet préventif vis-à-vis la toxicité des magnétite et peut donc servir comme un antidote dans les maladies de système nerveux.

Nos résultats ont montré que les nanoparticules Fe_3O_4 provoquent une augmentation de taux des glucides et des protéines et une diminution de taux des lipides. Concernant les activités enzymatiques nos résultats montrent que Fe_3O_4 aboutit aux modifications des activités des enzymes (GST, GPx, CAT, SOD, AchE et caspase-3), pour les paramètres non-enzymatiques on a montré une augmentation de $\text{TNF-}\alpha$ aussi une augmentation de taux de MDA, l'indice de peroxydation lipidique, et une diminution de GSH au niveau cytosolique et mitochondrial. Autres effets toxiques ont touché la respiration cellulaire, le gonflement et la perméabilité mitochondriale. Tandis que le sélénium corrige les effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de fer. Enfin, notre étude suggère que le dysfonctionnement du au stress oxydatif élevé dans l'encéphale des lapins traités par les nanoparticules d'oxyde de fer est l'origine de cette neurotoxicité et peut être la cause des maladies neurodégénératives.

Mots clés: nanoparticules d'oxyde de fer, sélénium, neurotoxicité, le stress oxydatif, gonflement mitochondrial, respiration, cerveau, cervelet.

Remerciements

Je commence par rendre grâce à DIEU, maître des cieux et de terre pour la volonté, le courage et les compétences qu'il m'a données pour la réalisation de ce modeste travail.

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à Pr. Arab Karim , professeur à l'Université de Boumerdes,. Qui m'a fait l'honneur de présider le présent jury. Je lui témoigne mes sentiments de considération et de respect.

Ces recherches ont été réalisées sous la direction de professeur Rouabhi Rachid, nous tenons à l'exprimer toute nos gratitude pour avoir encadré ce travail, aussi pour nous avoir accordé. Merci pour avoir toujours été disponible pour avoir guidé tout en nous laissant libres dans nos choix. Nous tenons à l'exprimer également infiniment toute nos gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit. Merci pour votre humanisme et votre gentillesse.

J'ai tout le plaisir et l'honneur de la présence de Dr. Yahiaoui K. Maître de conférence A au Département de Biologie, Université de Boumerdes . Qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Toute ma considération à Monsieur Djabri Belgacem . Professeur à l'Université de Tébessa . Qui a bien voulu accepter d'être membre de ce même jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont à Dr. Menaceur F. ; Maître de Conférence « A » à l'Université de Tébessa. D'avoir accepté de faire partie du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Nous adressons également nos remerciements sincères à Monsieur Louafi Chérif :
Merci pour ses conseils et ses encouragements permanents et surtout, pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps pour m'aider.

Nous voudrions remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire pour leur aide, leur efficacité et leur disponibilité.

Mes amis et collègues, pour avoir simplement été eux-mêmes et pour les moments inoubliables qu'ils nous ont permis de partager.



DÉDICACES

Je dédie ce travail :
A l'homme qui j'aime, mon fiancé Chérif
A ma mère Fattoum, A ma mère Fattoum, A ma mère
Fattoum
A mon père Mosbah
A mes sœurs: Warda, Darmen, Fatma,
Khira, Noura, Rafika, Rebya et Dounia.
A mes frères Abdellatif, Maamer, Saïd, Youcef et
Hakim
A Mlle Ferhi Salma
A mes collègues

Liste des abréviations et des symboles

AchE : Acétylcholinestérase

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Al₂O₃ : Oxyde d'aluminium

BBC : Bleu Brillant de Coomassie.

B.S.A : Bovin Serum Albumine

CAT : Catalase.

CO₃HNa: bicarbonate de sodium

DO : Densité optique

DTNB : Acide 5-5- dithio-bis-2-nitrobensoïque

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

EGTA : Acide éthylène glycol-bis, β-aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique

ERO : Espèce réactive oxygénées

Fe₂O₃ : Nano-maghémite d'oxyde de fer

Fe₃O₄ : Nano-Magnétite d'oxyde de fer

G : Gramme.

GPx : Glutathion peroxydase

GRase : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxyde

GST: Glutathion-S-transférase

HEPES: Acide 4-(-2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfurique)

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HRP : peroxydase de raifort

IκB : Inhibiteur de facteur nucléaire kappa B.

IKK: Inhibiteur kappa Kinase .

Kg : Kilo gramme

L : Litre

M : mole.

MDA: Malondialdehyde

mg : milli gramme.

min : minute

ml : Millilitre

mM: milli-mole

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NBT: nitroblue tetrazolium

NP: Nanoparticule

NaCl : chlorure de sodium

NF κ B : Facteur nucléaire kappa B.

nm : Nanomètre

O₂ : Oxygène.

Pi : Phosphate inorganique HPO₄

PM : Poids Moléculaire.

PMS : phénazine méthosulphate.

ROS : Espèce réactive oxygénées.

SiO₂ : Oxyde de silice

SOD : Superoxyde dismutase

SPION : Super paramagnetic iron oxide nanoparticles

TBA : Acide thiobarbiturique

TBS : Tris-buffered saline

TCA : Trichloracétique.

TiO₂ : Oxyde de titane

TNB : Acide 5-thio-2-nitrobensoïque

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TNFR : Récepteur de TNF alpha

V_t : Volume total

V_s : Volume du surnageant

UV : Ultra-violet

Zn : Zinc

ZnO : Oxyde de zinc

μ g : Microgramme.

μ l : Micro-litre

°C : Degré Celsius

%: Pourcentage.

Liste des figures

Figures	Page
Figure 01: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques	03
Figure 02 : structure de base des nanoparticules organiques	06
Figure 03 : structure de base des nanoparticules inorganiques	07
Figure 04: l'élevage des lapins	21
Figure 05: traitement des lapins.	23
Figure 06: prélèvement de l'encéphale	24
Figure 07: dissection de différentes régions de l'encéphale	25
Figure 08 : Variation de taux des glucides de cerveau (en μg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	37
Figure 09 : Variation de taux des glucides de cervelet (en μg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	38
Figure 10: Variation de taux des lipides de cerveau (en μg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	39
Figure 11 : Variation de taux des lipides de cervelet (en μg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	40
Figure 12: Variation de taux des protéines de cerveau (en mg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	41
Figure 13: Variation de taux des protéines de cervelet (en mg) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	42
Figure 14: Variation de taux du MDA de ceveau (en nmole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	43

Figure 15: Variation de taux des MDA de cervelet (en nmole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	44
Figure 16: Variation de taux de GSH de cerveau (en μ mole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	45
Figure 17: Variation de taux de GSH de cervelet (en μ mole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	45
Figure 18: Variation de taux de GST de cerveau (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	47
Figure 19: Variation de taux de GST de cervelet (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	47
Figure 20: Variation de taux de CAT de cerveau (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	48
Figure 21: Variation de taux de CAT de cervelet (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	49
Figure 22: Variation de l'activité de GPx de cerveau (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	50
Figure 23: Variation de l'activité de GPx de cervelet (en μ mole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	50
Figure 24: Variation de taux de AchE de cerveau (en nmole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	51
Figure 25: Variation de taux de AchE de cervelet (en nmole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement.	52
Figure 26: Variation de taux des MDA mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	53
Figure 27: Variation de taux des MDA mitochondriale de cervelet des lapins	53

témoins et traités après 90 jours de traitement	
Figure 28: Variation de taux des GSH mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	54
Figure 29: Variation de taux des GSH mitochondriale de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	55
Figure 30: Variation de l'activité de GPx mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	56
Figure 31: Variation de L'activité de GPx mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	56
Figure 32: Variation de taille des mitochondries de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	57
Figure 33: Variation de taille des mitochondries de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	58
Figure 34: Variation de perméabilité des mitochondries de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement	59
Figure 35: effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur le taux de MDA mitochondriale après 14 jours de traitement	60
Figure 36: effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur le taux de GSH mitochondriale après 14 jours de traitement	61
Figure 37: effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de GPx après 14 jours de traitement	62
Figure 38: effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de CAT après 14 jours de traitement	63
Figure 39: effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de GST après 14 jours de traitement	64

Figure 40 : effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de SOD après 14 jours de traitement	65
Figure 41 : effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de TNF α après 14 jours de traitement	66
Figure 42 : effet des nanoparticules Fe ₃ O ₄ sur l'activité de Caspase-3 après 14 jours de traitement (Absorbance à 450 nm)	67
Figure 43 : Effet des NPs d'oxyde de fer sur le gonflement mitochondrial en fonction de temps	68
Figure 44 : Effet des NPs d'oxyde de fer sur la perméabilité mitochondriale en fonction de temps	69
Figure 45 : Effet des NPs d'oxyde de fer sur la respiration cellulaire en fonction de temps	70

Liste des tableaux

Tableau	Page
Tableau 01: Effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de fer	10
Tableau 02 : La dose létale 50 du Sélénium et ses formes chimiques	16
Tableau 03 : classification des lapins <i>Oryctolagus cuniculus</i>	17
Tableau 04: traitement des lapins à courte terme	21
Tableau 05: traitement des lapins à longue terme	22
Tableau 06: Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des glucides encéphalique.	26
Tableau 07: Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des lipides encéphalique.	27
Tableau 08 : Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des protéines encéphalique.	28
Tableau 09 : Quantité d'oxygène consommée par les mitochondries corticales des lapins témoins et traités en fonction du temps.	70

Sommaire

INTRODUCTION.....	01
I-Synthèse bibliographique	03
1-Les nanoparticules.....	03
1-1-Définition des nanoparticules.....	03
1-2- Classification de nanomatériaux et des nanoparticules	04
1-2-1-Classification de nanomatériaux selon leurs formes d'utilisation.....	04
1-2-2-Classification de nanoparticules en fonction de leurs sources.....	04
1-2-3-Classification de nanoparticules en fonction de leurs nature chimique	05
1-3-Voies d'exposition aux nanoparticules	07
1-4-Les applications des nanoparticules.....	07
1-5-Toxicité des nanoparticules.....	09
1-6-Mécanismes à l'origine de leur toxicité.....	11
1-6-1-Taille (surface de contact).....	11
1-6-2-Biopersistance.....	12
2-Sélénium.....	13
2-1-Définition et biochimie de sélénium.....	13
2-2-Rôle physiologique.....	13
2-3-Métabolisme de sélénium.....	14
2-4-Toxicité de sélénium.....	15
2-5-La carence en sélénium	16
3-Lapins <i>Oryctolagus cuniculus</i>	17
3-1-Taxonomie.....	17
3-2- Définition de lapin.....	17
3-3-Caractéristiques Générales.....	17
3-4-Utilisation du lapin dans le domaine scientifique.....	18
II- Matériel et méthodes	20
1-Matériel	20
1-1-matériel chimique	20
1-2-Matériel biologique.....	20
2-Méthodes d'élevage et traitement.....	20
2-1-Description et élevage	20
2-2-Traitement des lapins	21
2-2-1- Traitement à longue durée	21
2-2-2- Traitement à courte durée.....	22
2-3-Sacrifice et prélèvement du cerveau.....	23
3-Méthodes de dosage	25
3-1-Dosage des métabolites au niveau de cerveau et cervelet	25
3-1-1-Dosage des glucides	25
3-1-2-Dosage des lipides.....	26
3-1-3-Dosage des protéines	27

3-2-Dosage des biomarqueurs non enzymatiques de stress oxydant au niveau de cerveau et cervelet	28
3-2-1-Dosage de malondialdéhyde	28
3-2-2-Dosage de glutathion.....	29
3-3-Dosage des biomarqueurs enzymatiques au niveau de cerveau et cervelet	30
3-3-1-Dosage du glutathion peroxydase	30
3-3-2-Dosage de l'activité de glutathion S-transférase.....	31
3-3-3-Dosage de l'activité de catalase (CAT).....	31
3-3-4-Dosage de l'activité de l'Acétylcholine estérase.....	31
4-Etude subcellulaire	32
4-1-Isolement des mitochondries encéphaliques.....	32
4-2-Mesure de gonflement mitochondrial et perméabilité mitochondriale	33
4-3-Mesure de la respiration mitochondriale.....	33
4-4-Dosage de MDA, GSH, activité de GST et GPX au niveau mitochondriale.....	33
4-5- dosage de l'activité de SOD après intoxication subaigue	34
4-6- Quantification du TNF- α	34
4-7-Détermination de l'activité des Caspase-3.....	34
5-Etude statistique	35
III-Résultats.....	36
1-Effet du traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer et l'effet opposé de sélénium sur les métabolites de cortex et cervelet	36
1-1- Effet sur le taux des glucides de cerveau.....	36
1-2- Effet sur le taux des glucides de cervelet.....	37
1-3-Effet sur le taux des lipides du cerveau	38
1-4-Effet sur le taux des lipides du cervelet.....	39
1-5-Effet sur le taux des protéines du cerveau	40
1-6- Effet sur le taux des protéines du cervelet.....	41
2- Effet de traitement sur les paramètres non enzymatiques	42
2-1-Effet de traitement sur le taux de malondialdéhyde de les deux régions encéphalique.....	42
2-2- Effet de traitement sur le taux de GSH encéphalique	44
3- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres enzymatiques au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium	46
3-1-Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les activité de glutathion S-transférase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium.....	46
3-2- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de catalase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium.....	48

3-3- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de glutathion peroxydase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium.....	49
3-4- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de l'acétyl choline-estérase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium.....	51
4- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres mitochondriaux au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium.....	52
4-1- Effet de traitement sur le taux de malondialdéhyde mitochondriale de les deux régions encéphalique	52
4-2- Effet de traitement sur le taux de GSH mitochondriale de les deux régions encéphalique.....	54
4-3- Effet de traitement sur l'activité de GPx mitochondriaux de les deux régions encéphalique.....	55
4-4- Effet sur le gonflement mitochondrial	57
4-5- Effet sur la perméabilité mitochondriale	58
5- Effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres mitochondriaux de cortex des lapins après intoxication subaiguë.....	60
5-1- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le taux des Malondialdéhydes	60
5-2- Effet sur le GSH mitochondriale après 14 jours de traitement.....	61
5-3- Effet sur l'activité de GPx mitochondriale après 14 jours de traitement	62
5-4- Effet sur l'activité de CAT mitochondriale après 14 jours de traitement	63
5-5- Effet sur l'activité de GST mitochondriale après 14 jours de traitement	64
5-6- Effet sur l'activité de SOD	65
5-7- Effet sur le TNF- α	66
5-8- Effet sur l'activité de Caspase-3	67
5-9- Effet sur la taille des mitochondries corticales	68
5-10- Effet sur la perméabilité mitochondriale	68
5-11- Effet sur la respiration cellulaire	69
IV- Discussion	71
1- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur les métabolites	72
2- Effet sur les biomarqueurs non enzymatiques.....	74
3- Effet sur les biomarqueurs enzymatiques.....	75
4- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le gonflement mitochondrial, la perméabilité membranaire et la respiration cellulaire	78
5- Effet sur les paramètres d'apoptose et d'inflammation	79
6- Effet protecteur de Sélénium.....	80
Conclusions générale et perspectives	83
Références bibliographiques	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont très intéressantes; elles sont utilisées dans le marquage des cellules (**Chen et al., 2010**), le ciblage des médicaments (**Alexiou et al., 2005; McBain et al., 2008**), et comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (**Puppi et al., 2011; Rümenapp et al., 2012 ; Cochran et al., 2013**). Cependant, leur réactivité biologique peut être augmentée et conduit à des interactions toxiques potentielles, **Zhu et al., (2010)** ont démontré que les nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique (SPION) engendrent des lésions endothéliales cellulaires et pourraient jouer un rôle clé dans les maladies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension et l'infarctus du myocarde. En raison de leur taille ultra- fine, SPION peut susciter un spectre de réponses tissulaires y compris l'activation cellulaire, la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la mort cellulaire (**Wilson et al., 2002; Zhu et al., 2011**). **Remyaa et al. (2015)** ont constaté que les NPs de l'oxyde de fer affectaient l'iono-régulation et l'activité de K^+/Na^+ ATPase; Tout cela nous amène à penser à l'effet des nanoparticules sur le système nerveux en tant que cible des toxiques. Les maladies neurodégénératives sont des maladies très dominantes; Elles sont directement liées à la qualité de l'environnement. La forme la plus courante de mort cellulaire dans la neurodégénérescence est à travers le chemin mitochondrial apoptotique de façon intrinsèque. Cette voie contrôle l'activation de la caspase-9 en régulant la libération du cytochrome C à partir de l'espace inter membranaire mitochondrial (IMS) (**DiMauro et al., 2008**). Il y a fort preuve que le dysfonctionnement mitochondriale et le stress oxydant jouent un rôle causal dans les maladies neurodégénératives, y compris les quatre les plus connues: maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et sclérose latérale amyotrophique (**Lin et Beal, 2006**).

Le sélénium est un oligoélément essentiel du régime alimentaire qui joue un rôle important dans certains nombre des processus biologiques pour les humains, il est pris dans la forme de sélénite, séléniate, sélélocystéine et sélénométhionine , après l'absorption, l'augmentation des niveaux de sélénium ont été enregistré dans les protéines du plasma sanguin et de là, il peut être distribué dans les tissus où il est incorporé dans les protéines (**Combs et Gray, 1998**). La principale fonction biochimique de Se chez les humains et les animaux est un antioxydant par l'enzyme

glutathion peroxydase Se-dépendante (**Dungan et Frankenberger, 1999; Cabrera et al., 2010; Jang et al., 2014**) et il protège ainsi les membranes cellulaires et les organites des dommages de peroxydation (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que Fe_3O_4 induit la neurotoxicité. Par conséquent, l'objectif de notre travail est l'étude de l'effet toxique des Fe_3O_4 -NP au niveau mitochondriale et cytosolique chez les lapins à courte et à longue terme et montrer le lien entre mécanismes moléculaires en termes de stress oxydatif et apoptotiques. En plus on cherche les effets détoxifiants de sélénium vis-à-vis cette toxicité.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I-Synthèse bibliographique

1-Les nanoparticules

I-1-1-Définition des nanoparticules

Les nanoparticules sont définies par la norme ISO TS/27687 comme des nano-objets dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique. Leur taille varie de quelques nanomètres de diamètre pour les points quantiques (quantum dots) et les nanoparticules magnétiques, à plusieurs dizaines des nanomètres pour les liposomes. Cette taille est donc comparable à celle des virus et des protéines (figure 01), notamment les récepteurs membranaires. Ceci leur confère la capacité de traverser les membranes biologiques et d'interagir directement avec les molécules intracytoplasmiques. Les nanoparticules de diamètre inférieur à 100 nanomètres possèdent de plus une propriété physique supplémentaire, le superparamagnétisme. Il s'agit d'une phase magnétique particulière apparaissant avec l'agitation thermique (Meunier, 2014). Il existe deux sources de NPs : les NPs dites « manufacturées » (c'est-à-dire produites intentionnellement par l'homme), et les particules « ultra-fines », émises de manière non intentionnelle soit par l'homme (gaz d'échappement, combustion industrielle), soit naturellement par les volcans ou l'érosion des sols (Greco et al., 2014). Ces nanoparticules sont produites dans le cadre des nanotechnologies (Boczkowski et Lanone, 2010).

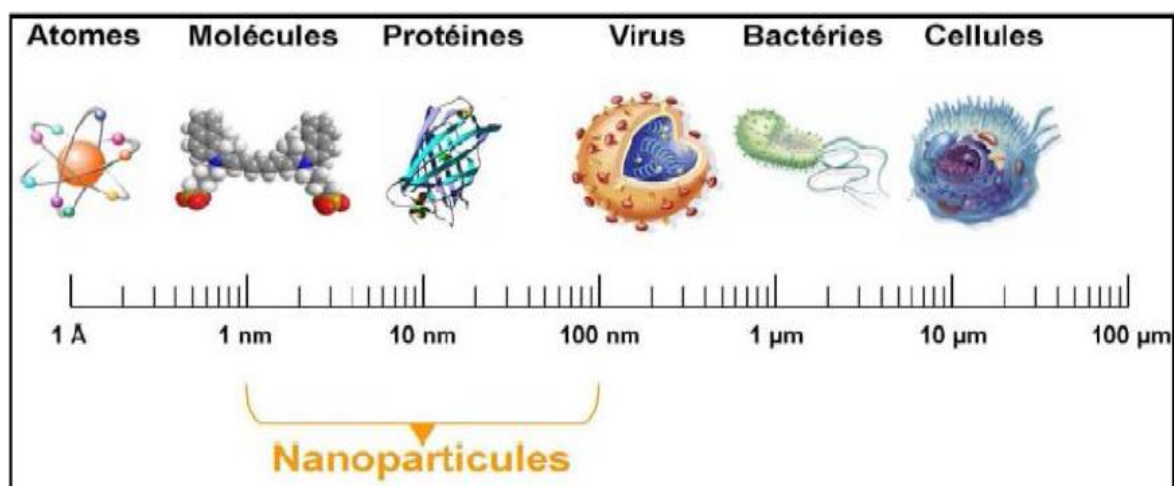


Figure 01: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques (Maafa et Merzouk, 2015).

I-1-2- Classification des nanomatériaux et des nanoparticules

Les nanoparticules sont une classe très hétérogène. Il existe plusieurs critères de classification des nanoparticules, parmi les quels :

I-1-2-1-Classification de nanomatériaux selon leurs formes d'utilisation

Les nanoparticules sont classés selon leurs formes d'utilisation à différentes classes:

-Matériaux de dimension 0 : qui sont des matériaux sous forme dispersée, aléatoire ou organisée, comme dans les cristaux colloïdaux pour l'optique ou les fluides magnétiques.

-Matériaux de dimension 1 : sont des matériaux sous forme de nanofils ou de nanotubes.

-Matériaux de dimension 2 : sont des matériaux sous forme de couche mince, comme dans les dépôts d'agrégats ou de revêtements épais obtenus par projection plasma ou voie électrochimique.

-Matériaux de dimension 3 : matériaux sous forme compacte comme dans les céramiques et les métaux nanostructurés. Les agglomérats de nanoparticules sont un exemple de particules nanostructurées.

I-1-2-2-Classification de nanoparticules en fonction de leurs sources

Selon les sources des nanoparticules on distingue:

✓ Les nanoparticules d'origine naturelle

-Biologique: tels que les protéines nanoparticules comme l'albumine (molécule majeur de transport dans l'organisme), les liposomes qui sont la forme la plus mature des nanoparticules, ils sont constitués de composés amphiphiles comme les phospholipides, glycolipides, et aminolipides, formé dans les membranes (**Debbage et Jaschke,2008**), l'ADN avec un diamètre de l'ordre de 2,5 nm, certaines bactéries d'un diamètre de 30 nm et plusieurs virus 10 à 60 nm (**Prosie et al., 2008**).

-Minérale ou environnementale tels que les poussières atmosphériques, la fraction fine du sable de désert et les fumées originaires d'activité volcanique ou de feux de forêt (**Prosie et al.,2008**).

✓ **Nanoparticules d'origine humaine**

-Les nanoparticules manufacturées sont des nanomatériaux fabriqués dans un but d'application technologique, comme les particules ultrafines d'oxyde de titane et des métaux ultrafins, les pigments de peinture, etc (**Boczkowski et Lanone, 2010**).

-Les « bulk nanoparticules» : par exemple: le noir de carbone, la fumée de silice, la fumée d'huile, le « smog », les particules diesel, etc (**Boczkowski et Lanone, 2010; Prosie et al., 2008**).

I-1-2-3-Classification de nanoparticules en fonction de leurs nature chimique

✓ **Nanoparticules organiques:**

Les nanoparticules organiques tels que la micelle qu' est un agrégat sphéroïdal formé par l'autoassemblage d'une monocouche de phospholipides dont la tête polaire est hydrophile et la queue hydrophobe. Aussi les nanoparticules à base de polymères et les nanotubes de carbone ont que deux dimensions nanométriques, leur longueur pouvant avoisiner le centimètre actuellement. Ils peuvent être observés en microscopie électronique, en spectroscopie Raman, en spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ou en photoluminescence. (figure 02)

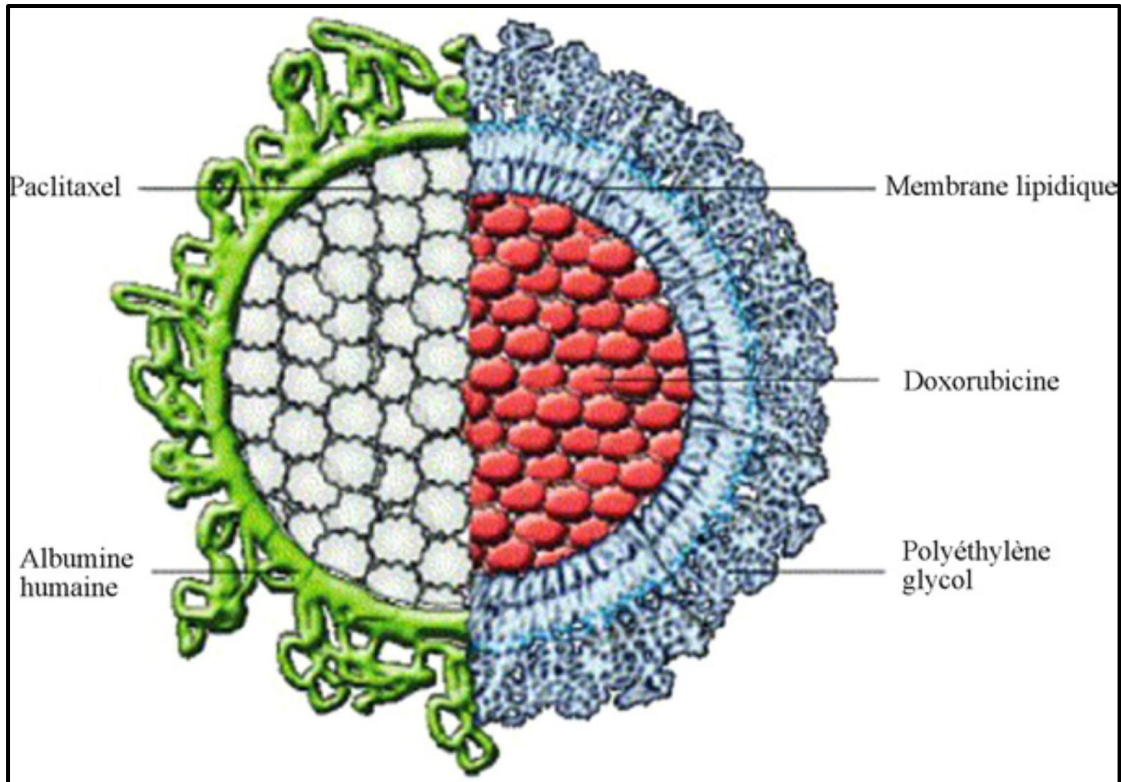


Figure 02 : Structure de base des nanoparticules organiques (Chuto et Chaumet-Riffaud, 2010)

✓ **Nanoparticules inorganiques**

Elles ont la même structure de base que les NP organiques, avec un noyau aux propriétés fluorescentes, magnétiques ou optiques et une couche protectrice organique en surface (figure 03). Parmi lesquelles on peut citer les points quantiques (quantum dots), les nanoparticules de diamant photoluminescentes, les sondes Raman et les nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et supermagnétique qui sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif (fer essentiellement, mais aussi cobalt, nickel) et sont utilisées comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Elles sont couvertes d'une couche organique protectrice sur laquelle peuvent être attachées des molécules vectrices. Elles peuvent être encapsulées dans des micelles (Chuto et Chaumet-Riffaud, 2010).

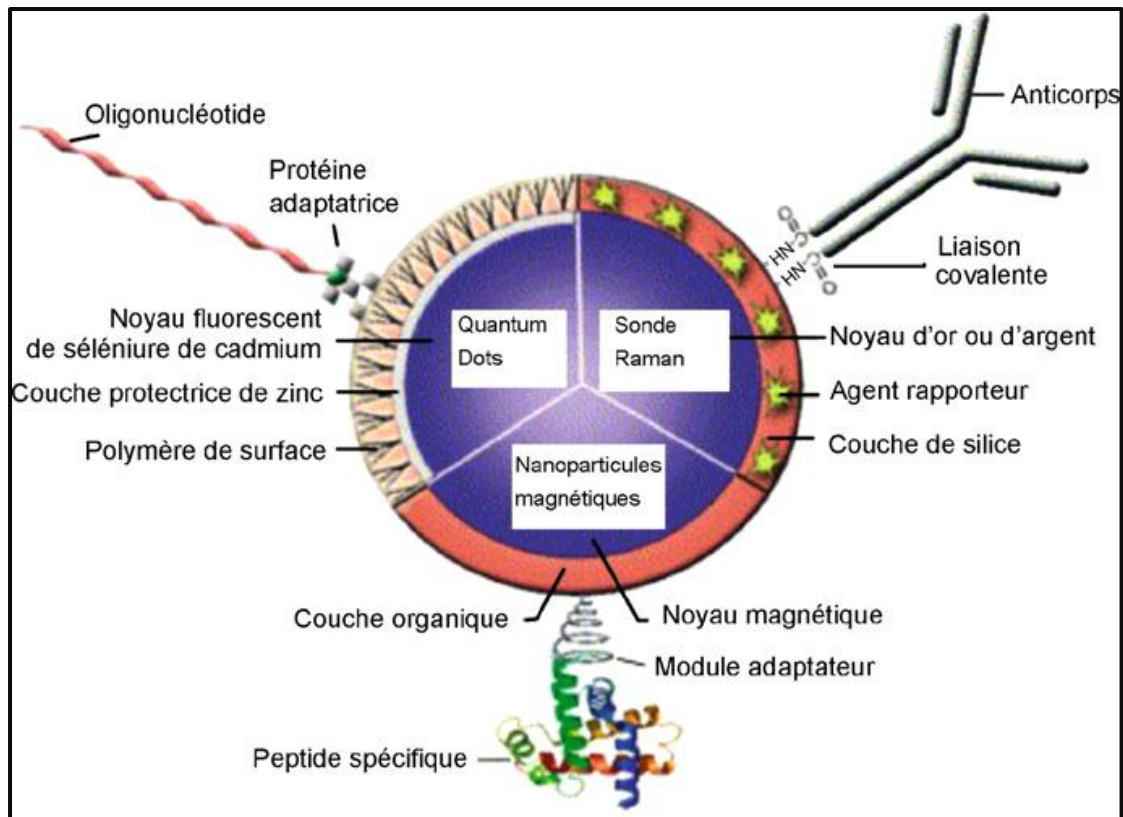


Figure 03 : Structure de base des nanoparticules inorganiques (**Chuto et Chaumet-Riffaud, 2010**)

I-1-3-Voies d'exposition aux nanoparticules

L'homme est exposé à un nombre croissant des nanoparticules, la voie de pénétration la plus fréquente demeure la voie pulmonaire. Il est important de savoir que le site de dépôt des nanoparticules dans les poumons est dépendant de leurs dimensions. Elles peuvent changer substantiellement au cours du procédé de production. Le dépôt des poussières le long de l'arbre pulmonaire varie considérablement en fonction de leur granulométrie et de leur comportement dans l'air (**Prosie et al., 2008**); il y a aussi autres voie d'exposition : la voie transcutanée (**Sadrieh et al., 2010; Miquel-Jeanjean et al., 2012**), la voie sanguine (intraveineuse) représente également une porte de pénétration des NPs dans l'organisme (**Leonard et al., 2015**).

I-1-4-Les applications des nanoparticules

Les nanoparticules ont nombreuses applications dans des domaines très variés:

✓ **Les domaines de médecine:**

Les NPs sont utilisées dans la vectorisation de médicaments: par exemple les nanoparticules magnétiques permettent de guidage et de libération d'un médicament dans un site précis (**Sauzedde et al., 1999; Chomoucka et al., 2010**) , Ils sont utilisées aussi dans le traitement du cancer (**Jain et al., 2005**). La nanotechnologie a permis le développement des dispositifs à l'échelle nanométrique qui peuvent être conjugués avec plusieurs molécules fonctionnelles simultanément, y compris les ligands spécifiques de tumeurs, les anticorps, les médicaments anticancéreux. Puisque ceux-ci sont 100 à 1000 fois plus petite que les cellules cancéreuses, ils peuvent être facilement transférées à travers les vaisseaux sanguins qui fuient et interagissent avec des protéines spécifiques de tumeurs à la fois sur la surface et à l'intérieur des cellules cancéreuses (**Wang et al., 2008**). Ils sont utilisés également comme agent antimicrobien. Ils sont considérés comme des approches ciblées pour réduire les dommages causés par des micro-organismes, et plus précisément les champignons, menaçant les zones médicales et industrielles (**Ghasemian et al., 2012; Sanjenbam et al., 2014**). Ils sont utilisés aussi dans l'imagerie médicale par résonance magnétique (**Thorek et al., 2006; Sahoo et al., 2007**).

✓ **Les domaines des cosmétiques:**

L'industrie cosmétique cherche à améliorer les propriétés des produits cosmétiques telles que la tenue, la transparence, la brillance et les propriétés optiques. Plusieurs types d'applications sont développés par l'industrie cosmétique : filtration des rayonnements ultraviolets, adaptation à l'environnement par effet photochromique, nouveaux effets visuels, anti-âge, etc (**Prosie et al., 2008**). Les nanoparticules d'oxyde métallique par exemple les nanoparticules de dioxyde de titane sont utilisés en tant qu'agent anti-UV dans les crèmes solaires.

✓ **Le domaine de l'environnement :**

Les nanoparticules d'oxyde de fer magnétite sont utilisés dans la purification de l'eau.

✓ **Le domaine de l'électronique:**

Des nanoparticules d'oxyde de zinc sont des matériaux de départ pour des produits électroniques (**Aruojaa et al., 2009**).

✓ **le domaine d'agriculture:**

les nanoparticules sont utilisés également dans le domaine d'agriculture, tels que l'utilisation des pesticides à taille nanométrique (**Grillo et al., 2015**).

✓ **Autres:**

Les domaines du textile, de l'alimentation, de la chimie, du bâtiment (**Greco et al., 2014**).

I-1-5-Toxicité des nanoparticules

En théorie, les particularités intéressantes des nanoparticules d'oxyde de fer, dont leur forte réactivité et leur propension à diffuser à travers les membranes biologiques du fait de leur très petite taille, sont aussi potentiellement sources de cytotoxicité. Elles pourraient ainsi occasionner un dysfonctionnement des composants cellulaires majeurs que sont les mitochondries et l'ADN, même en absence d'une cytotoxicité objectivable, des réponses cellulaires aberrantes, notamment des lésions de l'ADN, un stress oxydatif, un dysfonctionnement de la membrane mitochondriale ou un changement dans l'expression des gènes sont envisageables. Cette toxicité potentielle pourrait résulter d'une accumulation de fer dans un tissu donné, entraînant une dérégulation de l'homéostasie. Les réponses cellulaires aberrantes ou des lésions ADN pouvant induire carcinogenèse à plus long terme, en l'absence de cytotoxicité observable au moment du traitement. Des radicaux oxygénés pourraient aussi être générés (**Meunier, 2014**).

Les nanoparticules ont des effets cytotoxique par exemples les nanoparticules d'or induit la mort cellulaire programmée par apoptose (**Pan et al., 2007**); les nanoparticules d'argent peuvent induire des inflammations pulmonaires (**Silva et al., 2015**) aussi ils peuvent causer des symptômes pathologiques de l'emphysème pulmonaire et la pro-signe de fibrose pulmonaire. Les NPs d'oxyde de fer peut augmenter la perméabilité micro-vasculaire et la lyse cellulaire dans les épithéliums pulmonaires (**Zhua et al., 2008**).

L'impact des NPs sur la fertilité est incomplètement connu. Plusieurs études in vitro et in vivo suggèrent une toxicité sur la ligné spermatique et la stéroïdogénèse testiculaire. Le terme général de reprotoxicité désigne deux aspects : la toxicité développementale et la toxicité sur la reproduction. Concernant la toxicité sur le développement embryonnaire, un grand nombre d'études expérimentales animales est déjà paru et montre un passage transplacentaire de certaines NPs et une perturbation du développement embryonnaire . et la toxicité sur la reproduction, c'est-à -dire aux effets sur la fertilité de l'individu adulte. La taille des NPs rend possible une interaction directe avec le noyau et les organites intracellulaires d' un ovocyte humain mesure en moyenne 120 µm de diamètre, un spermatozoïde 50 µm de long, une mitochondrie 1 à 10 µm (Greco et al., 2014).

Tableau 01: Effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de fer

Nanoparticules	Types cellulaires	Effets observés	Références
MnFe ₂ O ₄	Injection intrapéritonéale chez des souris	Inflammations dans la cavité péritonéale.	Lacava et al., 1999
γFe ₂ O ₃	Injection intraveineuse (souris)	Inflammation des poumons qui disparaît avec le temps	Pereira Garcia et al., 2005
γFe ₂ O ₃ (DMSA)	Cellules nerveuses	Diminution de la capacité de différenciation des cellules nerveuses en présence de nanoparticules enrobées de DMSA. (1 g/L)	Pisanic et al., 2007
γFe ₂ O ₃ DMSA, dextran, albumine	Macrophage de souris, Cellules humaines tumorales ovariennes	Internalisation des nanoparticules avec ou sans enrobage de dextran, d'albumine et de DMSA. (1g/L)	Wilhelm et al., 2002

Fe ₃ O ₄	Injection intraveineuse dans des souris	Effets génotoxiques observés après une semaine	Sadeghiani et al., 2004
Fe ₃ O ₄	Cellules du foie de souris	Pas de toxicité aux doses testées. (0.25 g/L)	Hussain et al., 2005
Fe ₃ O ₄ dextran, albumine	Fibroblastes dermiques humains	Internalisation des nanoparticules avec ou sans enrobage. Cytotoxicité des nanoparticules non-enrobées et enrobées de dextran. Augmentation de la prolifération cellulaire en présence de nanoparticules enrobées d'albumine. (0.05 g/L)	Berry et al., 2003
Fe ₃ O ₄ Transferrine	Fibroblastes dermiques humains	Pas d'internalisation des nanoparticules enrobées de transferrine. Augmentation de la prolifération cellulaire (0.05 g/L) .	Berry et al., 2004

I-1-6-Mécanismes à l'origine de leur toxicité

I-1-6-1-Taille (surface de contact)

La taille est un élément déterminant expliquant leurs mécanismes de toxicité. À cause de leur très petite taille, ces particules offrent une très grande surface de contact par unité de masse. Il a été clairement démontré que le degré de toxicité est lié à cette surface et aux propriétés de surface de ces nanoparticules et non à leur masse (**Prosie et al., 2008**). La particularité d'une nanoparticule réside dans le fait que la majorité des atomes qui la constitue se trouve en surface. Les nanoparticules présentent donc des surfaces d'échanges (surface spécifique) très importantes, de plusieurs centaines de mètres carrés par gramme de particule. Cette surface d'échange très importante confère aux nanoparticules des propriétés physiques et chimiques particulières qui peuvent entraîner des effets biologiques propres, qui restent encore largement incompris, si elles rentrent en contact avec le vivant. La réactivité de

surface des nanoparticules, qui augmente alors que décroît la taille de la particule, laisse prévoir qu'elles auront une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses (**Lanone et Boczkowski, 2010**).

Les nanoparticules multifonctionnels excéder 20 à 30 nm sont facilement pris dans les cellules par l'intermédiaire des vésicules d'endocytose, qui sont typiquement de 40 à 60 nm de diamètre (**Debbage et Jaschke, 2008**).

I-1-6-2-Biopersistance

Les deux mécanismes d'élimination des corps étrangers dont l'organisme humain dispose sont la dissolution chimique (pour les particules solubles) et la translocation physique (pour les particules insolubles ou peu solubles). Par la translocation, les particules les plus grosses qui se déposent normalement dans les parties supérieures des poumons (trachée et bronches) sont éliminées par un mécanisme d'ascenseur mucociliaire vers le système digestif. Le système d'épuration macrophagique des poumons est moins efficace pour les particules ultrafines, probablement en raison du potentiel oxydant, ce qui entraîne une biopersistance plus élevée (**Prosie et al., 2008**).

I-2-Sélénium

I-2-1-Définition et biochimie de sélénium

Le sélénium est un oligo-élément découvert en 1817 par Jöns Jakob Berzelius a été connu pour causer des problèmes majeurs de santé dans le bétail et l'homme depuis plus d'un siècle. L'appréciation du sélénium dans les sciences biologiques a commencé à changer dans les années 1950 (**Birringer et al., 2002**); il est classé en tant que métalloïde (**Muscatelloa et Janza, 2009**) qui se trouve entre le soufre et le tellure dans le groupe VI A et entre l'arsenic et du brome dans Période 4 du tableau périodique. Se ressemble étroitement soufre dans les propriétés chimiques en ce qui concerne taille atomique, énergies de liaison, les potentiels d'ionisation et des affinités d'électrons (**Tinggi, 2003**). Sélénocystéine est reconnu comme étant l'acide aminé 21, et forme un résidu prédominant de sélénoprotéines et sélénoenzyme dans les tissus biologiques. Lors de la synthèse des protéines, le résidu sélénocystéine est inséré et codée par le codon UGA, qui est normalement associé avec un codon de terminaison. Le sélénium dans le corps, à la fois organique (Sélénocystéine, sélénométhionine) et inorganique (sélénite, sélénate) composés Se sont facilement métabolisés à divers formes de métabolites Se (**Tinggi, 2008**).

I-2-2-Rôle physiologique

Le rôle biologique de sélénium est principalement associé aux sélénoprotéines qui sont impliqués dans le système de défense antioxydant (**Rongzhu et al., 2009; Pappas et al., 2011**). Aussi il est un rôle important dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes (**Jablonska et al., 2013**) et la spermatogenèse (**Jablonska et al., 2013; Ahsana et al., 2014**);). Le principal fonction biochimique de Se chez les humains et les animaux est un antioxydant par l'enzyme glutathion peroxydase Se-dépendante (**Dungan et Frankenberger, 1999; Cabrera et al., 2010; Jang et al., 2014**), et il peut protéger ainsi les membranes cellulaires et les organites des dommages de peroxydation (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

La supplémentation en sélénium dans le régime alimentaire a empêché l'apparition de la maladie de Keshan, une cardiomyopathie juvénile associé à un faible statut Se, dans les personnes de République de Chine, et une diminution de des

symptômes d'inconfort musculaire chez un patient sur le long terme (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

Un nombre croissant d'études suggère que le sélénium peut réduire la risque de certains cancers. des chercheurs ont constaté que les gens vivant dans des régions géographiques à forte concentration de sélénium dans le bétail cultures avaient des taux de mortalité plus faibles de cancers de la gastro-intestinal, du poumon et du sein. Des études épidémiologiques ultérieures ont montré que l'incidence du cancer était plus élevé dans les régions géographiques où le sélénium du sol était faible (**Johnson et al.,2003**).

I-2-3-Métabolisme de sélénium

✓ L'absorption

L'absorption intestinale du sélénium est élevée (50-95%), elle dépend de sa forme : La SeMet est mieux absorbé que le sélénite. Le sélénite est absorbé par simple diffusion tandis que le séléniate, presque aussi efficacement transporté que la SeMet, est absorbé par un transport actif (**Fournier, 2005**).

✓ Métabolisme

L'ensemble des formes de sélénium organiques et inorganiques peut être utilisé par l'organisme mais leur métabolisme est différent. Le sélénite entre dans les cellules par transport anionique et est rapidement conjugué au glutathion sous forme de sélénodiglutathion. Les acides aminés séléniés utilisent les transporteurs membranaires destinés à leurs homologues soufrés et sont métabolisés en utilisant les voies métaboliques des enzymes soufrées. Le sélénium absorbé est réduit à l'état de séléniures (H_2Se) puis incorporé dans les protéines sous forme de SeCyst par l'intermédiaire d'un ARNt spécifique (**Fournier, 2005**).

✓ L'excrétion du sélénium

Le sélénium absorbé est éliminé sous forme des dérivés méthylés (méthylséléniol, diméthylséléniure et triméthylsélénonium) ou de sélénosucres excrétés dans les urines et/ou par les poumons (**Fournier, 2005**).

I-2-4-Toxicité de sélénium

Le Sélénium, qui n'est pas considéré comme un élément essentiel pour les plantes, est essentiel en quantités infimes pour les poissons, les oiseaux, les animaux, les humains et de nombreux micro-organismes (**Dungan et Frankenberger, 1999**). Cependant, il existe un seuil bien entre la toxicité Se et la déficience (**Huanga et al., 2012**). La valeur nutritionnelle de Se été découvert en 1957 quand il a été trouvé pour avoir un rôle complémentaire de la vitamine E dans la prévention contre le nécrose hépatique et diathèse exsudative chez les rats et les poussins (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

La limite supérieure tolérable pour le sélénium est de 400 ug. La consommation à long terme de l'excès de sélénium peut conduire à une toxicité caractérisée par la peau, les cheveux et des anomalies des ongles (**Johnson et al., 2003**).

La toxicité des composés de sélénium dépend fortement de sa spéciation. Par exemple: la DL50, selon l'Institut national des États-Unis de la sécurité et la santé au travail, pour l'administration orale chez le rat sont beaucoup plus faibles pour séléniate (2,5 mg Se /kg) que pour le sélénite (4,8 à 7,0 mg/kg) ou sélénium élémentaire (Se: 6700mg/ kg) (**Lenz et al., 2006**).

Les études de toxicité indiquent que les oiseaux, les poissons et les animaux souffrent de chronique Se toxicosis (sélénose) lorsque une alimentation contenant plus de 5 à 25 mg Se kg⁻¹ (**Dungan et Frankenberger, 1999**). Cependant, Se inorganique a été montré plus toxique que les formes organiques (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

Tableau 02: La dose létale 50 du Sélénium et ses formes chimiques (INRS, 2011).

Composé	Dose létale 50 (voie orale)
Sélénium élémentaire	6700 mg/kg chez le rat
Sélénite de sodium	7 mg/kg chez les rats 2.25 mg/kg chez les lapins les lapins
Séléniat de sodium	1.6-2.25 mg/kg chez les rats et les lapins
Sulfure de Sélénium	55mg/kg chez les lapins et 38 mg/kg chez les rat et 370 chez les souris
Disulfure de Sélénium	138 mg/kg chez les rats

I-2-5-La carence en sélénium

La carence en Se conduit à la diminution de l'immunité, l'altération du métabolisme de la thyroïde et une diminution la fertilité masculine (**Jablonska et al., 2013**).

Une carence sévère en sélénium, observée dans certains régions géographique caractérisées par une très faible teneur en sélénium dans le sol, est associée à une cardiomyopathie endémique (maladie de Keshan) (**Dungan et Frankenberger, 1999; Jablonska et al., 2013; Estevez et al., 2014**) et l'osteoarthropathie endémique (maladie de Kashin-Beck). Selon certaines données épidémiologiques, l'apport faible en Sélénium peut être associée à un cancer l'incidence et est également impliquée dans les maladies cardiovasculaires, la cirrhose, le diabète et l'asthme (**Jablonska et al., 2013**); tandis qu'une carence modérée produit des effet moins sévère tels que la faiblesse musculaire et des douleurs (**Dungan et Frankenberger, 1999**).

I-3- les lapins *Oryctolagus cuniculus*

I-3-1-Taxonomie

Le lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* appartient à l'ordre des Lagomorphes aux côtés du lièvre (Lepus). La classification du lapin domestique s'établit donc comme suit (Tableau 03)

Tableau 03: classification des lapins *Oryctolagus cuniculus* (Amadoules, 1990).

Classe	Mammifères
Ordre	Lagomorphes
Famille	Leporidés
Genre	<i>Oryctolagus</i>
Espèce	<i>Cuniculus</i>

I-3-2- Définition de lapin

Les lapin domestique de l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, à l'origine semi-liberté de vastes espaces, est à l'origine de multiples races de lapins domestiques dans le monde entier, son élevage appelé cuniculture s'est développé à partir moyen âge. Son but premier est la production de la viande, mais elle permet aussi la production des poils et de fourrures. Par ailleurs, les lapins sont aujourd'hui utilisé comme animale de laboratoire (Quinton, 2009).

I-3-3- Caractéristiques Générales

✓ Alimentation en élevage

L'alimentation des lapins est souvent exclusivement composés des granules fabriqués à partir de diverses céréales, qui permettent d'avoir une très bonne croissance et de contrôler au mieux la qualité sanitaire des produits ingérés par les animaux (Ouhayoun, 1983). Les lapins consomment 150-350 g selon leur stade physiologique, et les lapereaux en engraissement de 100-120g (Lebas, 2006). Chez les éleveurs traditionnels, les lapins sont nourris avec du foin, des choux fourrages,

des betteraves, de graines de céréales germées, des tourteaux, des pommes de terre, des fruits et bien d'autres aliments à disposition des éleveurs (**Lissot, 1974**).

✓ **Communication**

Le lapin est un animal relativement silencieux, il peut néanmoins émettre des soufflements et des grognements en prélude à une attaque, en cas de panique extrême ou des douleurs importantes, il peut pousser un cri aigu d'une intensité surprenante. Il dépose également de posture pour faire comprendre, en cas d'inquiétude il frappe brutalement le sol de ses postérieurs (**Drogoul et al., 2004; Lobert, 1832; Quinton, 2003**).

✓ **Reproduction**

Les lapins domestiques puissent se reproduire toute l'année, la fertilité est maximale au printemps, quand les jours sont plus longs, les femelles sont en générales fécondes jusqu'à quatre ans, les males jusqu'à cinq à six ans (**Bradley et al., 2009**).

La vie sexuelle commence à l'âge de quatre ou cinq mois. Chez le mâle les testicules descendent vers douze semaines. Ils peuvent se trouver en position abdominale puisque l'anneau inguinal reste ouvert. Chez la femelle, l'ovulation est provoquée par la saillie au moment des chaleurs qui durent sept à dix jours alternant avec deux jours de repos sexuel (**Poissonnet, 2004**).

I-3-4-Utilisation du lapin dans le domaine scientifique

Le nombre important de travaux consacrés à l'étude des mammifères de laboratoire montre combien de fois ces animaux sont utiles. Guy en (1981) définissait un animal de laboratoire comme suit : "c'est un réactif biologique ~ de même que le chimiste utilise des produits aussi parfaitement définis que possible, de même le biologiste utilise l'animal comme un réactif expérimental".

Les mammifères de laboratoire ont de nombreux liens de parenté avec l'espèce humaine; ainsi l'anatomie, la physiologie et la pathologie comparées mettent en évidence de nombreuses applications pratiques pour l'homme. L'étude des vitamines ou celle des interactions hormonales par exemple n'aurait pu se réaliser sans expérimentation animale (**Amadoules, 1990**).

Parmi ces mammifères le lapin occupe une place importante. Sa taille, son élevage facile et sa docilité sont autant d'atouts qui font de lui un animal très sollicité au laboratoire. Le lapin est de routine utilisé pour: les travaux de sérologie, le dépistage de substances embryotoxiques et tératogènes, l'expérimentation des contraceptifs ainsi que l'élevage des glossines. L'étude de l'hypertension artérielle, la pathologie infectieuse, la virologie, l'embryologie, la toxicologie, la tératologie expérimentale, l'étude de l'artériosclérose, la génétique, les études sur la reproduction, la chirurgie cardiaque sont également des domaines parmi tant d'autres qui font appel au lapin comme animal de laboratoire (**Amadoules, 1990; Aoun et Marghadi, 2013**).

MATERIEL ET METHODES

II- Matériel et méthodes

II-1-Matériels

II-1-1-Matériels chimique

On a utilisé les nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 issues de laboratoire de physique université de Larbi Tébéssi, elles sont synthétisées par la méthode de coprécipitation de sels de fer qui est probablement la plus simple et la plus efficace pour obtenir ces nanoparticules d'oxyde de fer qui sont généralement préparées grâce à un mélange stoechiométrique de sels ferreux et des sels ferriques en milieux aqueux. Aussi on a utilisé le Sélénium sous forme de sélénite de sodium.

II-1-2-matériel biologique

Les lapins expérimentaux sont de la race *Oryctolagus cuniculus* issus de l'animalerie de Ghelghoum El-aid wilaya de Mila. Ils sont pesés entre 2.940 Kg et 3.870 Kg.

II-2-Méthodes d'élevage et traitement

II-2-1-Description et élevage

Les lapins utilisés au cours de traitement sont logés dans des cages métalliques pendant une période d'adaptation d'un mois, ils sont devisés en deux groupes la première est destinée à l'étude de la toxicité à courte terme et la deuxième est destinée à l'étude de la toxicité à longue terme, l'alimentation des lapins était composé des granules fabriqués à partir de diverses céréales qui permettent d'avoir une très bonne croissance et de contrôler au mieux la qualité sanitaire des produits ingérés par les animaux (figure 04).



Figure 04: l'élevage des lapins

II-2-2-Traitement des lapins

II-2-2-1- Traitement à courte durée

Après la période d'adaptation nous avons effectué notre expérimentation pendant 14 jours, le traitement est par voie orale selon leur poids corporel. Les lapins ont répartis comme la suite (Tableau 04)

Tableau 04: traitement des lapins à courte terme.

Lot	Nombre des lapins/lot	Traitement
Lots n°01 : Témoin	6 lapins mâles	Aucun traitement
Lots n°02	6 lapins mâles	200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ des NPs Fe_3O_4
Lots n°03	6 lapins mâles	300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ des NPs Fe_3O_4

II-2-2-2- Traitement à longue durée

Après la période d'adaptation nous avons effectué notre expérimentation pendant trois mois, le traitement est par voie orale selon leur poids corporel. Les lapins ont répartis comme la suite (Tableau 05)

Tableau 05: traitement des lapins à longue terme

Lot	Nombre des lapins/lot	Traitement
Lots n°01 : Témoin	5 lapins mâles	Aucun traitement
Lots n°02	5 lapins mâles	75 µg/kg/jour des NPs Fe ₃ O ₄
Lots n°03	5 lapins mâles	150 µg/kg/jour des NPs Fe ₃ O ₄
Lots n°04	5 lapins mâles	0.05 µg/kg/jour de sélénium 75 µg/kg/jour des NPs Fe ₃ O ₄
Lots n°05	5 lapins mâles	0.05 µg/kg/jour de sélénium 150 µg/kg/jour des NPs Fe ₃ O ₄



Figure 05: le traitement des lapins.

II-2-3-Sacrifice et prélèvement du cerveau

Le prélèvement des organes a été fait au niveau de laboratoire de l'université de Tébessa "laboratoire de Toxicologie", les encéphales sont récupérés et coupés en différentes parties (figure 6 et 7), des morceaux sont utilisés immédiatement et les autres sont conservés au -80 °C pour stopper l'activité enzymatique temporairement.

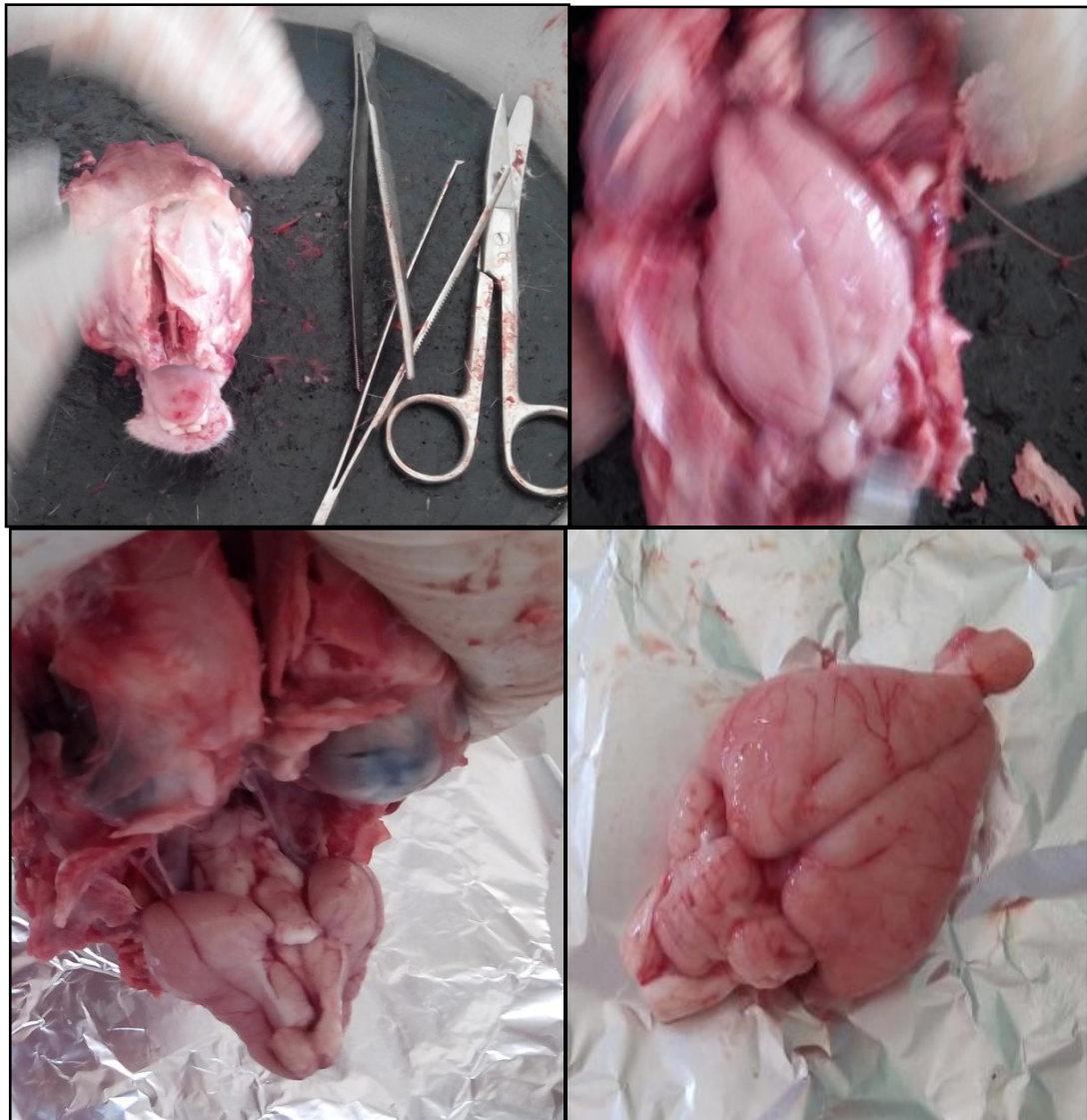


Figure 06: le prélèvement de l'encéphale

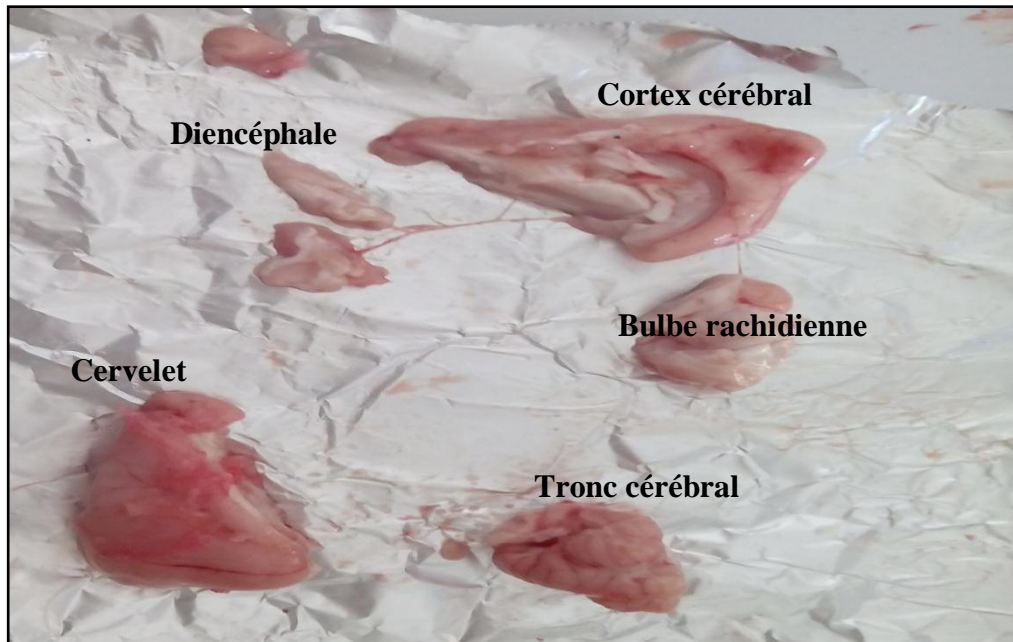


Figure 07: dissection de différentes régions de l'encéphale

II-3-Méthodes de dosage

II-3-1-Dosage des métabolites au niveau de cerveau et cervelet

II-3-1-1-Dosage des glucides

Le dosage des glucides a été fait au niveau de cerveau et cervelet du lapin selon la méthode de **Dubois et al., (1956)**.

✓ Protocole expérimentale:

L'extraction des glucides consiste à:

- Mettre 0.1 g de tissu neuronale dans des tubes à essai.
- Puis ajouter 2 ml d'éthanol à 80%. On laisse le mélange 48 heures.
- Puis on met les tubes à essai dans un bain marie à 70 ° C pour l'évaporation totale de l'alcool.
- Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à 20ml de l'eau distillée.
- Ensuite en prélève 1 ml de la solution et en ajoute 1 ml de phénol à 5 %, puis on ajoute 2 ml de l'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace.

- Enfin, on obtient un chromogène de couleur orange, on procède à la lecture par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire à une longueur d'onde de 490 nm.
- Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose (tableau 06).

Courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides

Tableau 06: Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des glucides encéphalique.

	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose en µl	0	20	40	60	80	100
Eau distillée en µl	100	80	60	40	20	0
Acide sulfurique et phénol en µl	2 1	2 1	2 1	2 1	2 1	2 1

II-3-1-2-Dosage des lipides

Le taux des lipides est déterminées selon la méthode de **Goldsworthy et al., (1972)**.

✓ Protocole expérimentale

- 500 mg de tissu nerveux est découpée et macéré dans 10 ml de l'acide trichloroacétique TCA à 20% ,
- Après le broyage et la filtration, l'homogénat est centrifugé à 5000 tour/min pendant 10 min, on verse le surnageant et on garde le culot.
- 1 ml du mélange éther/chloroforme 1v/1v est ajouté au culot, et on fait une deuxième centrifugation 5000 tour/min pendant 10 minutes qui donne un surnageant contenant les lipides et un culot contenant les protéines.
- On prélève 100 µl de surnageant auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique puis les tubes sont mis dans un bain marie à 100 °C pendant 10 minutes.
- Après refroidissement, on prélève 200 µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5 ml de le réactif sulfophosphanillinique (0,38 g de vanilline, 55ml d'eau distillée et 195ml d'acide orthophosphorique à 85%).

- Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.
- Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère des lipides qui est préparée en utilisant l'huile de table (Cevital), (Tableau 07)

Courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides:

Tableau 07: Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des lipides encéphalique.

	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère des lipides μl	0	20	40	60	80	100
Ether/chloroforme μl	100	80	60	40	20	0
Réactif SV en ml	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

3-1-3-Dosage des protéines

La méthode utilisée est celle de **Bradford, (1976)**.

✓ **Protocole expérimentale**

Sur la même échantillon utilisé pour le dosage des lipides.

- On a récupéré le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1 ml de NaOH à 0.1 et on a agité pour la dissolution des protéines,
- Après on a prélevé 100 μ l et on a ajouté 4 ml de réactif BBC. Puis une couleur bleue a été développée et on a passé les échantillons pour la lecture à une longueur d'onde 595 nm,
- Le calcul des concentrations a été fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (tableau 08).

Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines :

Tableau 08 : Réalisation de courbe d'étalonnage pour les dosages des protéines encéphalique.

	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère d'albumine ul	0	20	40	60	80	100
Eau distillé en ul	100	80	60	40	20	0
BBC ml	4	4	4	4	4	4

II-3-2-Dosage des biomarqueurs non enzymatiques de stress oxydant au niveau de cerveau et cervelet

II-3-2-1-Dosage de malondialdéhyde

Le malondialdéhyde MDA est dosés selon la méthode de **Draper et Hadley, (1990)**. Elle est détectée par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA).

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment rose , ce dernier est mesuré par spectrophotomètre d'absorption à 530nm.

✓ **Protocole expérimentale**

-0.1 g de tissu nerveux est broyé aux ultrasons dans 1 ml de tampon tris-HCl (50 mM, pH 7,5) [1,5137 g tris, 0,0730 g EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), 42,78 g sucrose, 250 ml eau distillée].

- Après l'homogénéisation une centrifugation est effectuée pendant 10 mn à 10000 tours/mn et le surnageant récupéré servira au dosage du MDA.

-Prélèvement de 375 µl de surnageant, et l'ajout de 150 µl de la solution TBS (ph 7.4)

- 375 µl de la solution TCA-BHT est ajouté. Une deuxième centrifugation à 1000 tour/min pendant 5 min est effectuée.
- Prélever 400 µl du surnageant et ajouter 80 µl du HCl (0.6 M).
- Ajouter 320 µl de la solution Tris- TBA (tris 26 mM, TBA 120mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min.

La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Taux de MDA } \left(\frac{\mu\text{Mole}}{\text{mg}} \right) = \frac{DO}{(\epsilon \times l \times Fd \times \text{mg de protéines})}$$

Taux du MDA : (µM/mg de protéines).

Δ Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

ε: coefficient d'extinction molaire du TBA en 156 mM⁻¹cm⁻¹..

L: longueur de trajet: 0.7 cm.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Fd: Facteur de dilution 0.2.

II-3-2-2-Dosage de glutathion

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Weckbreker et Cory, (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique résultant de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-nitrobenzoïque (réactif d'Elleman) par le groupement (-SH) du glutathion. Avant tout il faut protéger les groupements -SH du glutathion par l'ajout de l'acide sulfosalicylique 0.25%.

✓ Protocole expérimentale

- 0.2 g de tissu sont mis en présence de 8 ml de solution d'EDTA à 0.2 M.
- Après broyage, l'homogénat est déprotéinisé, par l'addition de 0.2 ml d'une solution de l'acide sulfosalicylique à 0.25% à 0.8 ml de l'homogénat.
- Après agitation on le laisse dans la glace pendant 15 minutes, on fait une centrifugation à 1000 tour/min pendant 5 min.
- Puis un volume de 0.025 ml de DTNB à 0.01 M est ajouté à 0.5 ml du surnageant

- Laisser pendant 5 min à température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante

$$\text{GSH } (\mu\text{mole})/\text{mg} = \text{DO} \times 1.525/131000 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg}$$

II-3-3-Dosage des biomarqueurs enzymatiques au niveau de cerveau et cervelet

II-3-3-1-Dosage du glutathion peroxydase

La méthode utilisée pour le dosage de l'activité de GPx est celle 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 GPx .

✓ Protocole expérimentale

-Des fractions de cerveau et de cervelet des différents groupes sont broyées en présence de 5 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) pour obtenir un homogénat.

-On prélève 0,2 ml de l'homogénat puis on ajoute 0,4 ml de GSH (0,1 mM) et 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).

-Après Incubation au bain marie à 25°C pendant 5 min. on ajoute 0,2 ml de H_2O_2 (1,3 mM) pour initier la réaction, et on laisse agir 10 minutes, puis ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.

-On Met le mélange dans la glace, après 30 minutes et une centrifugation durant 10 minutes à 3000 tours /minutes, on prélève 0,48 ml du surnageant, ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS et 0,32 ml de DTNB (1,0 mM), mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

II-3-3-2-Dosage de l'activité de glutathion S-transférase

L'activité de GST est déterminé selon la méthode de **Habig et al., (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et le CDNB (1-chloro2,4-di-nitrobenzène) en présence de GSH comme cofacteur. La conjugaison la formation d'une nouvelle molécule appelée 1-S-Glutathionyl 2-4 di nitrobenzène. l'absorbance est proportionnelle à la quantité de conjugué formé qui est liée à l'intensité de l'activité de GST.

Des parties de l'encéphale sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 9 000 tour/min pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Une aliquote de 200 µl du surnageant est additionné de 1.2 ml de substrat CDNB (1mM) dans un tampon phosphate 0,1M, pH 6. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5mn à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée à la place du surnageant.

II-3-3-3-Dosage de l'activité de catalase (CAT)

La mesure de l'activité de CAT est réalisée selon la méthode de **Cakmak et Horst, (1991)** dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une longueur d'onde de 240 nm. Les fragments de l'encéphale sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate1 (0.1 M, pH 7.5). L'homogénat est centrifugé à 9 000 tour/min pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient 20 µl de surnageant, 200 µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et 780 µl de tampon phosphate. La réaction est déclenchée par l'addition de l'eau oxygénée. Le dosage s'effectue en suivant la cinétique de la réaction pendant 5 mn à 240 nm dans des cuves UV en quartz au spectrophotomètre. L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée d'après le loi de Beer-Lambert

II-3-3-4-Dosage de l'activité de l'Acétylcholine estérase

La méthode de dosage de l'AchE la plus courante et celle d'**Ellman et al., (1961)**, elle consiste à fournir à l'enzyme (AchE), un substrat artificiel,

l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse catalysée par l'AchE libère de la thiocholine et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique révélée grâce à une méthode colorimétrique faisant intervenir le DTNB (acide 5-5- dithio-bis-2- nitrobensoïque) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune, le TNB (acide 5-thio-2-nitrobensoïque) qui est dosé.

L'activité spécifique de l'AchE est déterminée d'après la formule d'(Ellman *et al.*, 1961) :

$$\text{AChE } (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta D_0/mn \times Vt}{1,36 \times 10^4 \times Vs} \text{ / mg de protéines}$$

ΔD_0 : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

$1,36 \times 10^4$: coefficient d'extinction molaire du DTNB.

Vt : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml acétylthiocholine].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

II-4-Etude subcellulaire

II-4-1-Isolement des mitochondries encéphaliques

Les mitochondries du cerveau ont été isolées par centrifugation différentielle selon la méthode de **Kristal *et al.*, (1996)**. En suivant les étapes suivantes:

-Le tissu de cerveau frais a été refroidie sur un bain de glace, hachée avec des ciseaux, et lavé avec une solution (0,22 M mannitol, 0,07 M saccharose, 0,02 M HEPES, 2 mM de Tris-HCl, et 1 mM EDTA, pH 7,4).

- L'homogénat a été centrifugé à 3000 tours/min pendant 2 min. Alors, le surnageant a été centrifugé à 17 500 tours/min pendant 3 min. le culot résultant a été lavé dans la solution A et on centrifuge à 17500 tours/min pendant 4 min. Par la suite,

le culot a été remis en suspension dans solution B (0,22 M de mannitol, 0,07 M saccharose, 0,01 M de Tris-HCl et 1 mM EDTA, pH 7,4) et centrifugé à 17 500 g pendant 4 min. Le culot a été remis en suspension finalement dans la solution B. Toutes les opérations ont été réalisées à 0-4 ° C.

-la concentration des protéines mitochondriales a été mesurée par la méthode de Bradford en utilisant le sérum albumine bovine comme étalon.

II-4-2-Mesure de gonflement mitochondrial et perméabilité mitochondriale

Le gonflement mitochondrial a été mesuré par des altérations de l'absorbance à 540 nm selon les méthodes de **Kristal et al., (1996)** et **Richelli et al., (1999)**, les mitochondries (0,5 mg ml⁻¹) a été suspendu dans 2 ml de solution C (saccharose 200 mM, Tris-Mops 10 mM, 1Mm Pi, EGTA-Tris 10 uM, roténone 2 uM, et oligomycine 3 µg.ml⁻¹, pH 7,4). Les spectres ont été enregistrés à température ambiante sur un spectrophotomètre.

Pour étudier la perméabilisation membranaire on ajoute les cations de calcium (Ca²⁺) (1 uM) à la solution C, puis on suit l'absorbance à 540 nm.

II-4-3-Mesure de la respiration mitochondriale

La consommation d'oxygène par les mitochondries isolées a été estimée à l'aide d'un Oxygraph (Han-Satech) selon la méthode décrite par **Rouabhi et al., (2006, 2009)**. Le tampon d'incubation contient du saccharose 125 mM, 2,5mM de MgCl, 2, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM de HEPES, et 3 uM la roténone (pH 7,2) ce tampon est considéré comme tampon de respiration et enfin on a ajouté 5 mM de succinate en tant que substrat d'excitation.

II-4-4-Dosage de MDA, GSH, activité de GST et GPX et CAT au niveau mitochondriale

On a dosé le taux de GSH, le taux du MDA, l'activité de GST et l'activité de GPx selon les mêmes méthodes utilisés dans le dosage au niveau cytosolique.

II-4-5- dosage de l'activité de SOD après intoxication subaiguë

Pour cette étude, l'activité de SOD a été mesurée selon la méthode de **Kakkar et al., (1984)** . En bref, la cellule lysat a été mélangé avec 0,52 M de tampon pyrophosphate de sodium, PMS (186 ul IM), NBT (300 ul IM). La réaction a été commencée par l'addition de NADH. L'absorbance du chromogène formé était Mesurée à 560 nm.

II-4-6- Quantification du TNF- α

La détermination du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) au niveau de l'homogénats de cortex cérébral de lapin a été effectuée en utilisant un kit commercial TNF- α de lapin : tumoral necrosis factor Alpha (**Kit ELISA de MyBioSource. ETATS-UNIS**) Ce kit ELISA utilise Sandwich-ELISA comme méthode.

- ✓ La micro plaque ELISA fournie dans ce kit a été Pré-enduit avec un anticorps spécifique de TNF- alpha.
- ✓ Les échantillons sont ajoutés aux micro-puits de plaque ELISA et liés par les anticorps.
- ✓ Ensuite, un anticorps de détection biotinylé pour le TNF- α de lapin et l'Avidine-Peroxydase est ajouté à chaque microplaque successivement et incubés. Les composants libres sont lavés.
- ✓ La solution de substrat est ajoutée à chaque microplaque. Seuls les puits qui contiennent TNF- α de lapin, anticorps de détection biotinylé et Avidine-HRP conjugué apparaîtra en couleur bleu.
- ✓ La réaction de substrat enzymatique est terminée par l'addition d'un acide sulfurique et la couleur devient jaune. La densité optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie à longueur d'onde de 450 nm \pm 2 nm.
- ✓ La valeur DO est proportionnelle à la concentration de TNF- α de lapin en pg/ml. Vous pouvez calculer la concentration de TNF-Alpha dans les échantillons en comparant la DO de l'échantillon à la courbe standard.

II-4-7-Détermination de l'activité des Caspase-3

La détermination de l'activité des caspases-3 dans les cortex des lapins a été réalisée en utilisant un kit commercial (**Caspase 3 Assay Kit (Colorimétrique) (ab39401) d'Abcam tech** selon les directives du fabricant.

5-Etude statistique

Les résultats sont obtenus à partir d'un test à un critère présentée sous forme (moyenne plus/moins Ecart type) les résultats obtenus ont représenté par des histogrammes.

Nous avons déterminé les paramètres statistiques pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance avec un taux de signification P et comparées par rapport aux témoins par le test de Dunnett. Ces calculs ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB 17.01.

RESULTATS

III- Résultats

III-1 Effet du traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer et l'effet opposé de sélénium sur les métabolites de cortex et cervelet

Cette partie, vise à examiner l'effet des nanoparticules de magnétite sur la composition biochimique des encéphales des lapins , en déterminant les taux de glucoses, de lipides et de protéines après traitement 90jours.

III-1-1- Effet sur le taux des glucides de cerveau

La quantité des glucides dans le cerveau et le cervelet a été calculée à partir de la droite de régression de la gamme d'étalonnage en utilisant le glucose comme standard. Les résultats sont présentés par les figures (8) et (9).

Nos résultats montrent une augmentation non significative de taux de glucose de cortex chez les lapins traités par les deux doses (75 et 150 µg/kg/jour) de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à 0.05 µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport aux traités par les nanoparticules d'oxyde de fer seulement (0.34% contre 1.86%) pour la dose 1 et (0.88 % contre 3.28%) pour la deuxième dose.

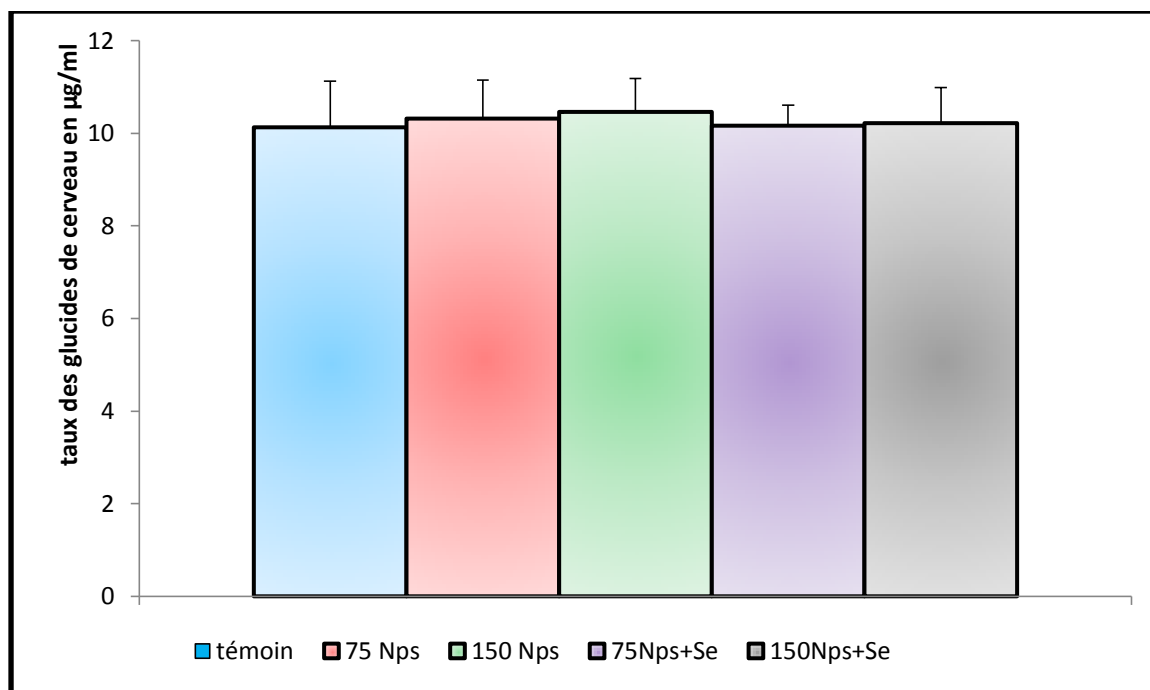


Figure 08 : Variation de taux des glucides de cerveau (en µg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.37$).

III-1-2- Effet sur le taux des glucides de cervelet

Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.000$) de taux de glucose de cervelet chez les lapins traités par la dose 150 µg/kg/jour et une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les lapins traités par la dose 75 µg/kg/jour de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à 0.05 µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par les nanoparticules d'oxyde de fer seulement (1.03 % contre 11.8%) pour la dose 75 µg/kg/jour et (11.91% contre 26.88%) pour l'autre dose ($P=0.000$ entre les traités).

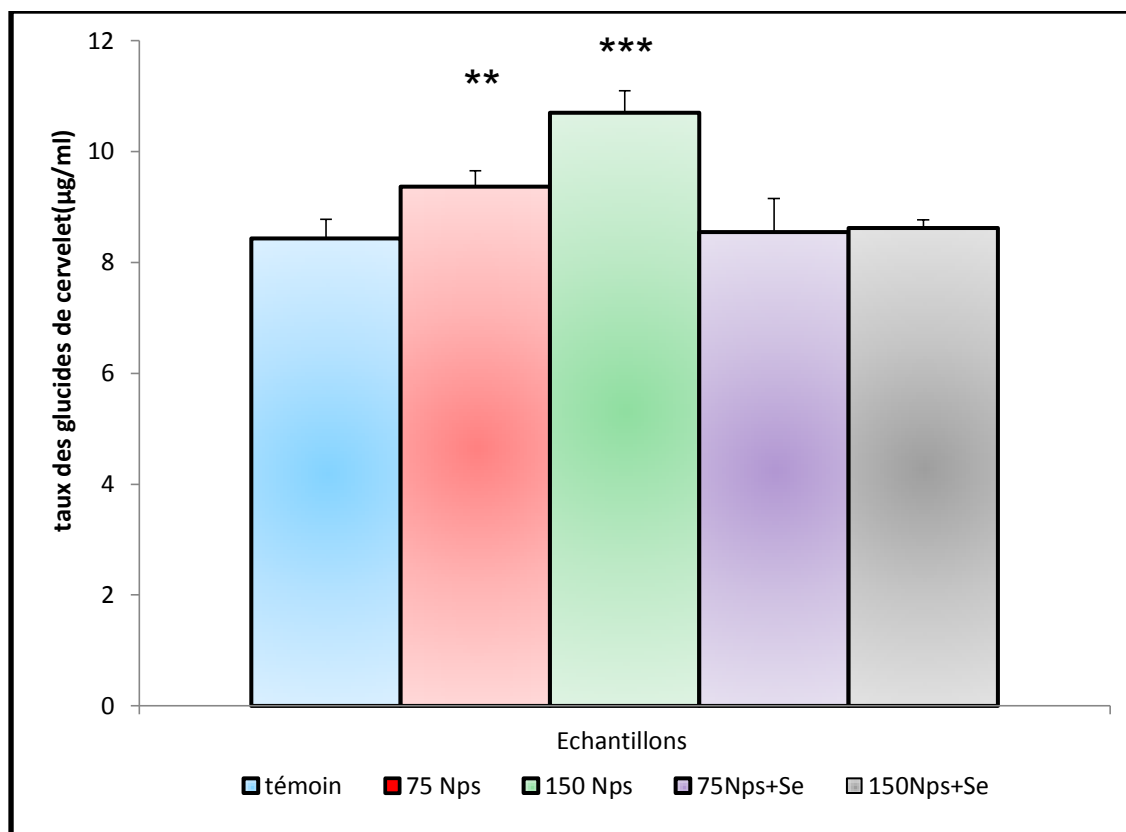


Figure 09 : Variation de taux des glucides de cervelet (en µg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$)

III-1-3-Effet sur le taux des lipides du cerveau

Le taux des lipides encéphalique est illustré par les figures (10 et 11).

Nos résultats montrent une diminution non significative ($p \geq 0.05$) de taux de lipides de cortex chez les lapins traités par la dose 75 µg/kg/jour de l'oxyde de fer et une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les lapins traités par la dose 150 µg/kg/jour par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à 0.05 µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par l'oxyde de fer seulement (2.44% contre 6.753% pour la dose faible) et (11.21% contre 16.31% pour la dose 150 µg/kg/jour) ($p \leq 0.001$ entre les traités).

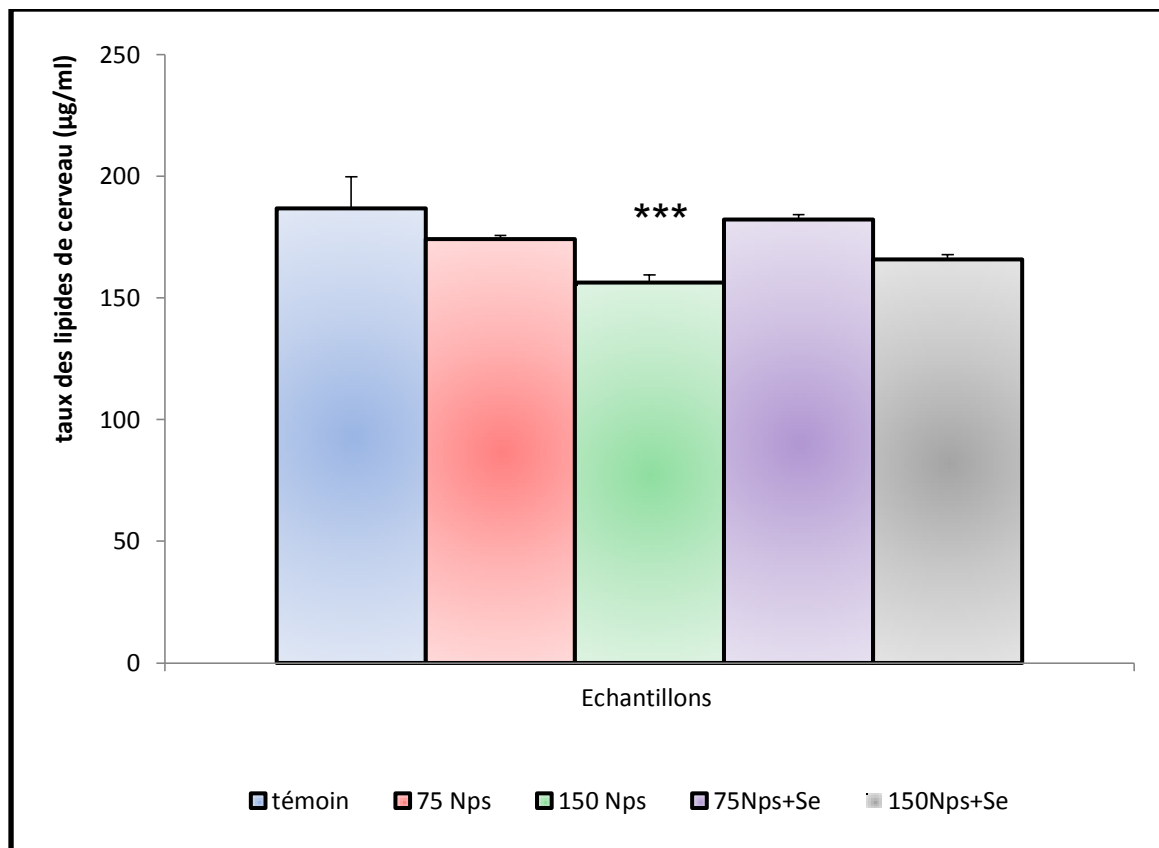


Figure 10: Variation de taux des lipides de cerveau (en µg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$)

III-1-4-Effet sur le taux des lipides du cervelet

Nos résultats montrent aussi une diminution très hautement significative de taux de lipides de cervelet chez les lapins traités par la dose 75 et 150 µg/kg/jour de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par l'oxyde de fer seulement (2.26% contre 12.40 %) pour la dose 75 et (2.32% contre 16.98%) pour l'autre dose. ($p \leq 0.001$ entre les traités).

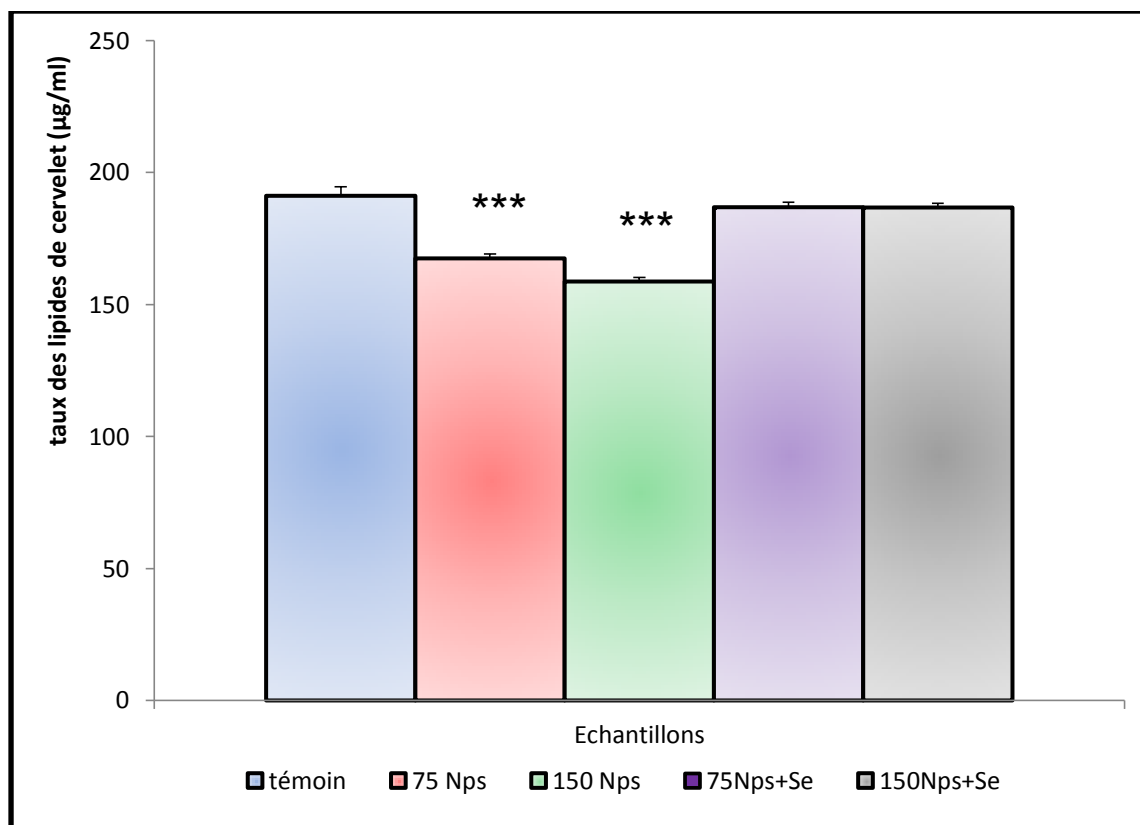


Figure 11 : Variation de taux des lipides de cervelet (en µg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-1-5-Effet sur le taux des protéines du cerveau

La détermination de la quantité de protéines encéphaliques a été réalisée à partir d'une courbe de référence utilisant l'albumine comme protéine standard. Les résultats enregistrés sont représentés dans les figures (12 et 13).

Nos résultats montrent aussi une augmentation très hautement significative de taux de protéines de cerveau chez les lapins traités par la dose 75 et 150 µg/kg/jour de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par l'oxyde de fer seulement ($p=0.002$ entre les traités).

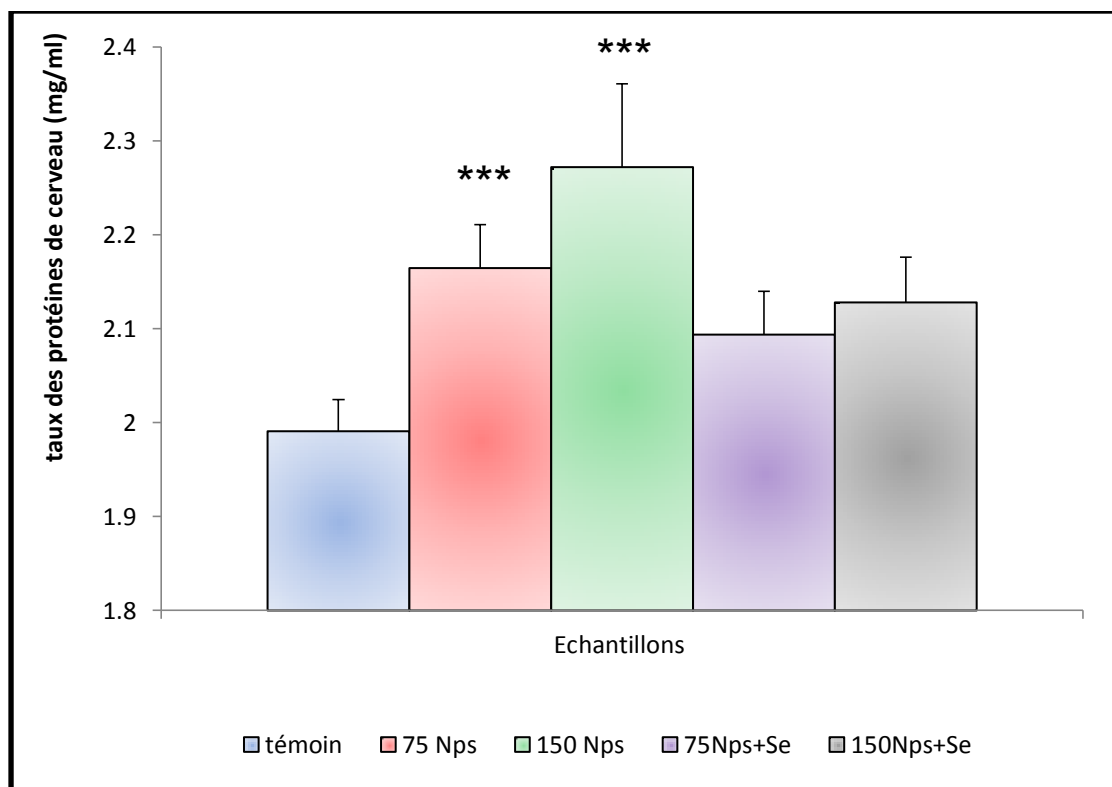


Figure 12: Variation de taux des protéines de cerveau (en mg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.000$).

III-1-6- Effet sur le taux des protéines du cervelet

Nos résultats montrent aussi une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) de taux de protéines de cervelet chez les lapins traités par la dose 75 $\mu\text{g/kg/jour}$ de l'oxyde de fer et une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les lapins traités par la dose 150 $\mu\text{g/kg/jour}$ par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à 0.05 $\mu\text{g/kg/jour}$ neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par l'oxyde de fer seulement (1.77% contre 8.87 %) pour la dose 75 et (5.32% contre 13.96%) pour l'autre dose ($p=0.000$ entre les traités).

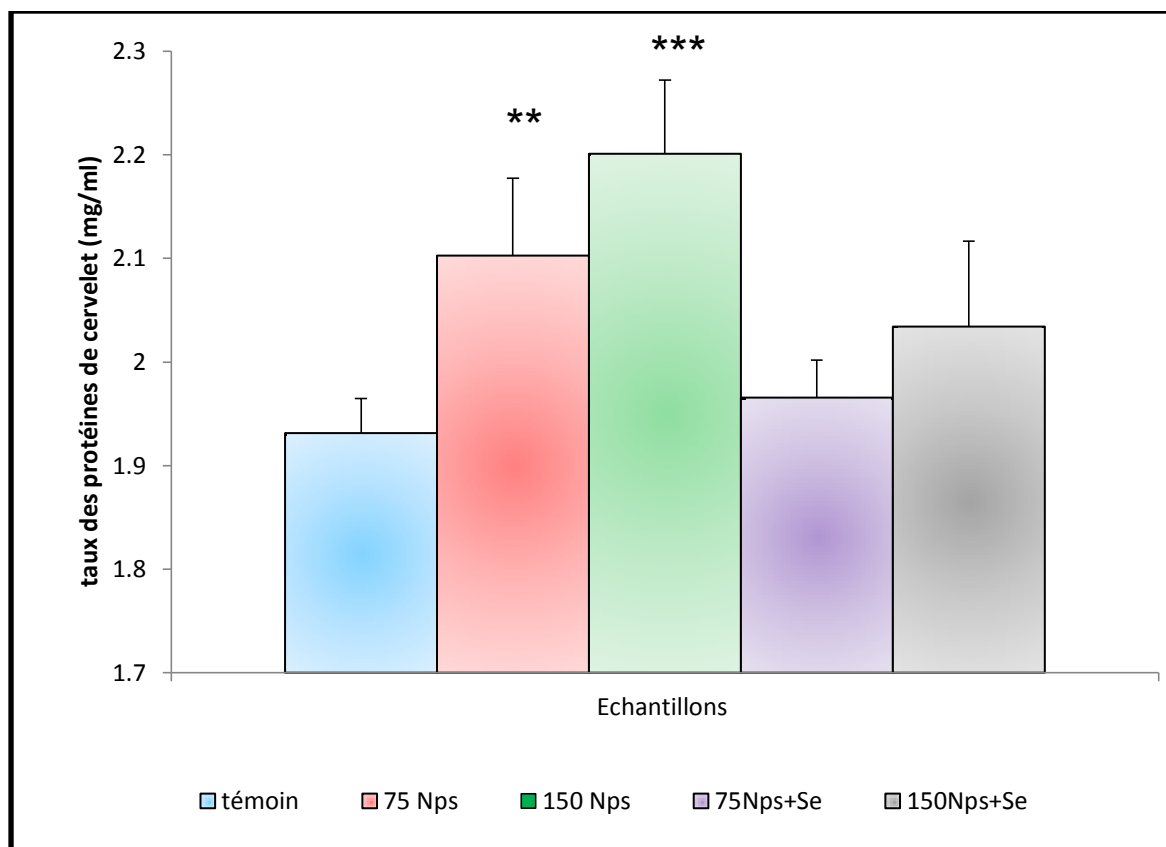


Figure 13: Variation de taux des protéines de cervelet (en mg/ml) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-2- Effet de traitement sur les paramètres non enzymatiques

III-2-1-Effet de traitement sur le taux de Malondialdéhydes de les deux régions encéphalique

Le taux des Malondialdéhydes au niveau encéphalique est calculée selon le loi de Beer- Lambert avec un coefficient d'extinction molaire de TNB-TBA2 égale à $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Les résultats obtenues sont représentés dans les figures (14 et 15).

Les résultats montrent une augmentation non significative ($p \geq 0.05$) de taux de malondialdéhyde de cerveau des lapins traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les traités par la dose de 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par les nanoparticules de Fe_3O_4 seul (2.82% contre 8.92% pour la première

dose 7.09% contre 26.37% pour la deuxième dose) ($p=0.000$ entre les traités pour le cerveau et $p=0.005$ pour celles de cervelet)

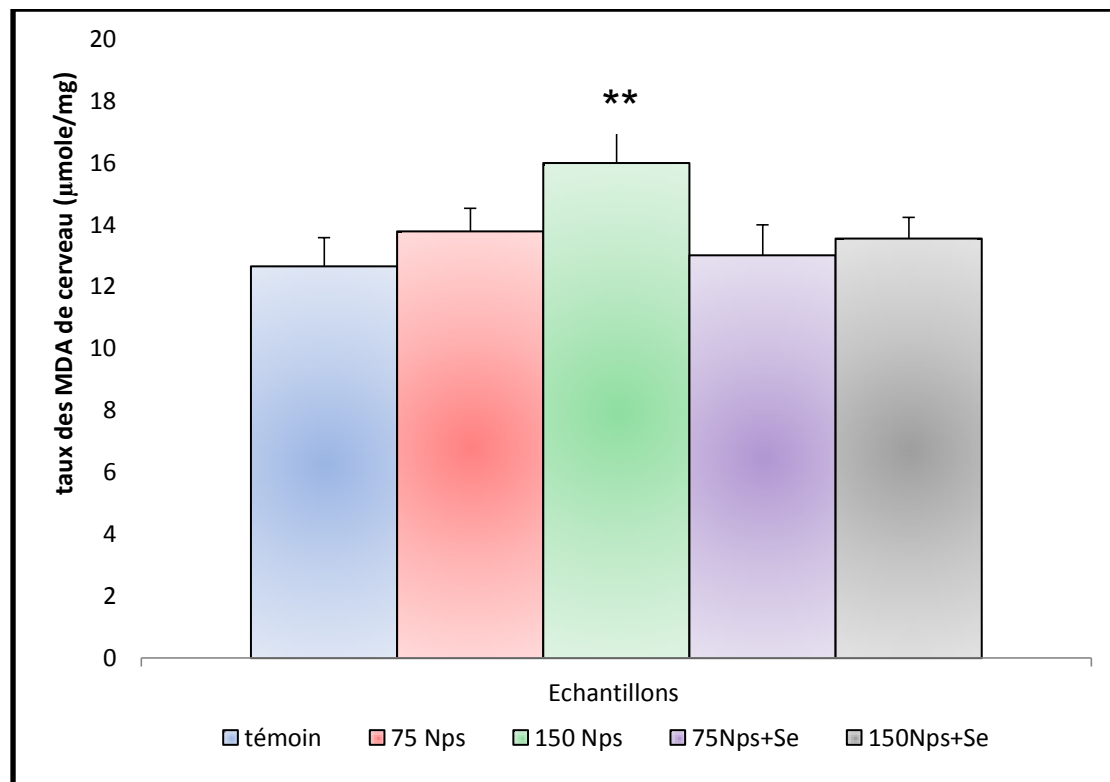


Figure 14: Variation de taux du MDA de ceveau (en µmole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.000$).

Les résultats montrent:

- une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) de taux de molandialdéhydes de cervelet des lapins traités par la dose 75 µg/kg/jour et
- une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les traités par la dose de 150 µg/kg/jour de l'oxyde de fer par rapport au groupe témoin,
- l'addition de sélénium à 0.05 µg/kg/jour neutralise l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer par rapport au traités par les nanoparticules de Fe_3O_4 seulement (2.53% contre 15.27%) pour la première dose et (6.89 % contre 26.34%) pour la deuxième dose.

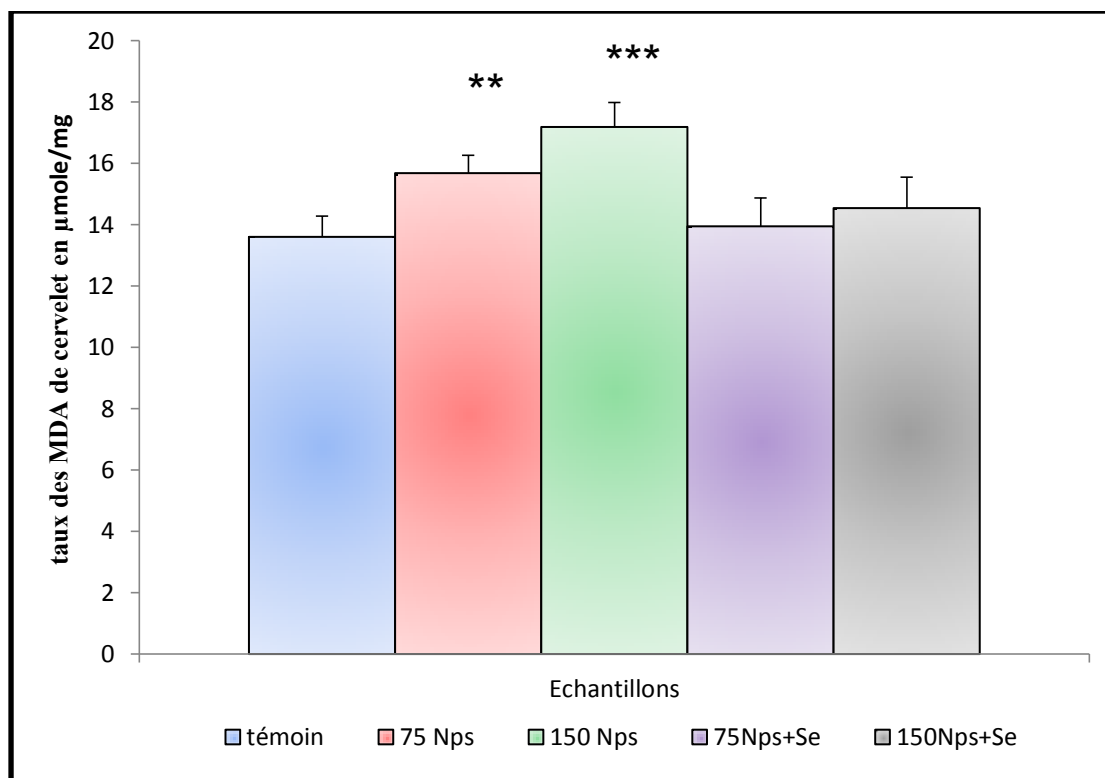


Figure 15: Variation de taux des MDA de cervelet (en $\mu\text{mole/mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.000$).

III-2-2- Effet de traitement sur le taux de GSH encéphalique

Le taux de glutathion réduit ($\mu\text{M/mg}$ de protéines) a été calculé pour chaque échantillon par application de la formule de **Weckberker & Cory (1988)**. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures (16 et 17).

Une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) de taux de GSH après le traitement des lapins par les nanoparticules d'oxyde de fer a été clairement envisageable dans les deux régions encéphalique (cerveau et cervelet), cette diminution est corrigée par l'addition de sélénium (une correction égale à 12.38% pour les traités par dose 1 et 12.38% pour la deuxième dose) dans la région de cervelet et (une correction égale à 1.54 contre 10.61 pour la première dose et 3.76 contre 19.24 pour la deuxième dose dans la région de cerveau) ($p=0.000$ chez les traités par la dose $75\mu\text{g/kg/jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par $150\mu\text{g/kg/jour}$ en mixture avec le sélénium, dans les deux régions encéphaliques)

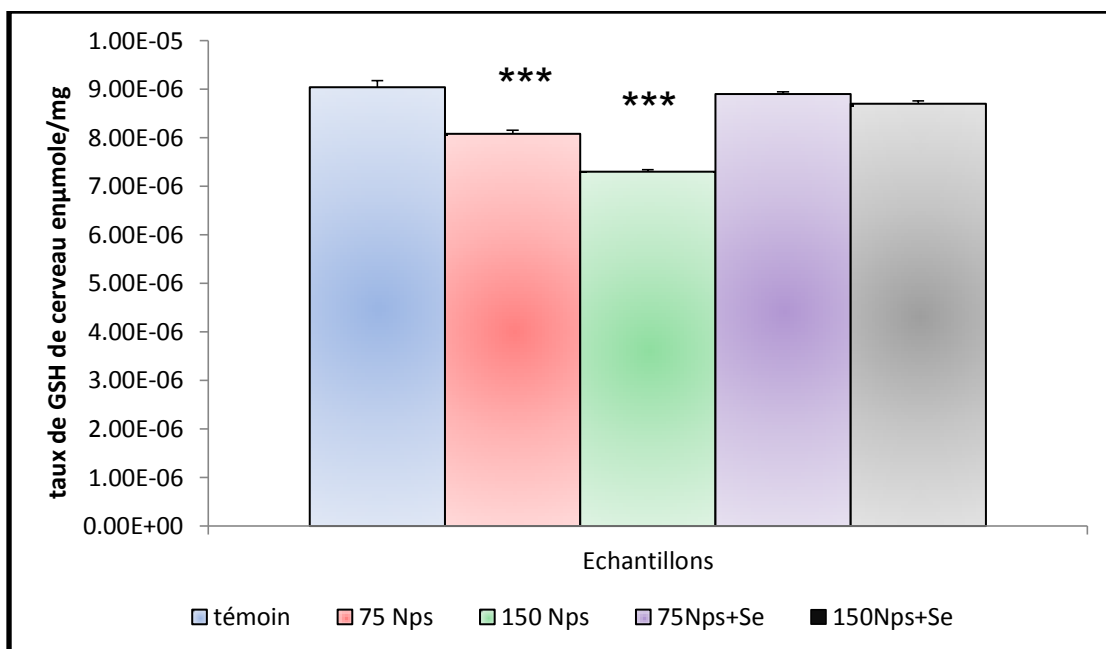


Figure 16: Variation de taux de GSH de cerveau (en µmole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

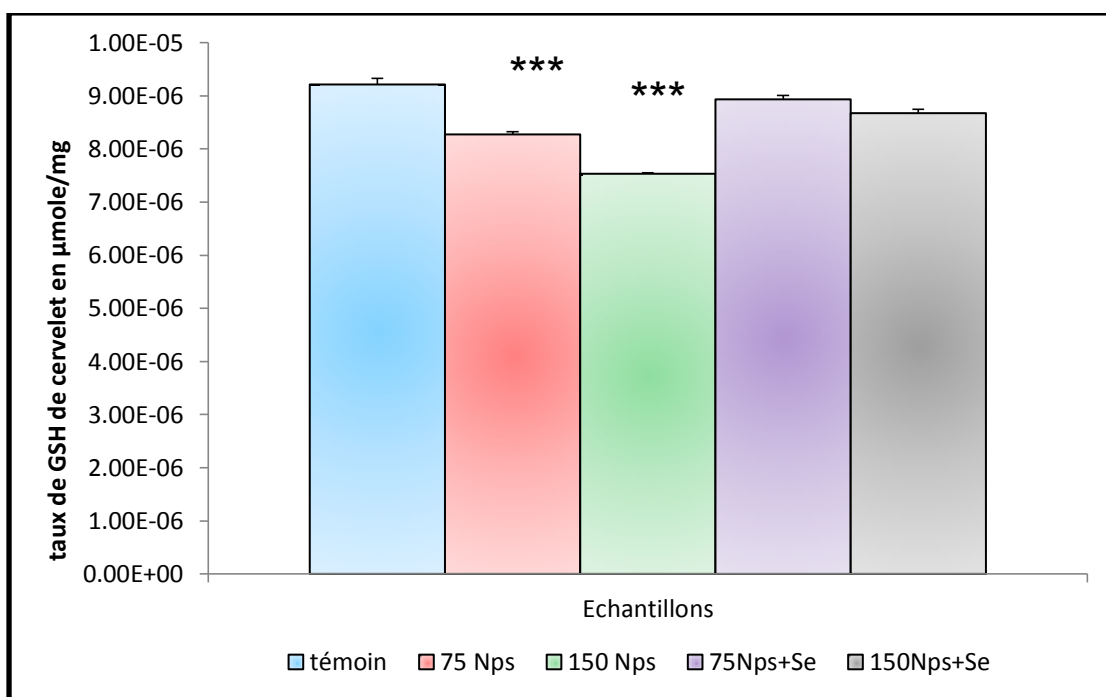


Figure 17: Variation de taux de GSH de cervelet (en µmole/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-3- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres enzymatiques au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

III-3-1-Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les activité de glutathion S-transférase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

L'activité de GST au niveau encéphalique est calculée selon le loi de Beer-Lambert avec un coefficient d'extinction molaire égale à $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Les résultats obtenues sont représentés dans les figures (18 et 19).

L'administration de la dose de $75 \text{ } \mu\text{g/kg/jour}$ des nanoparticules d'oxyde de fer entraine une augmentation non significative ($p \geq 0.05$) de l'activité enzymatique de glutathion S-transférase par rapport au groupe témoin (cette augmentation est environ 16.11% pour la GST de cerveau et 7.21 % pour la GST de cervelet),

En Revanche la dose $150 \text{ } \mu\text{g/kg/jour}$ entraine une augmentation hautement significative de l'activité de GST dans la région de cerveau et une augmentation très hautement significative dans la région de cervelet,

Par contre l'addition de $0.05 \text{ } \mu\text{g/kg/jour}$ de sélénium corrige cette augmentation avec ($p=0.007$ entre les traités par le Fe_3O_4 et les traités par le mixture)

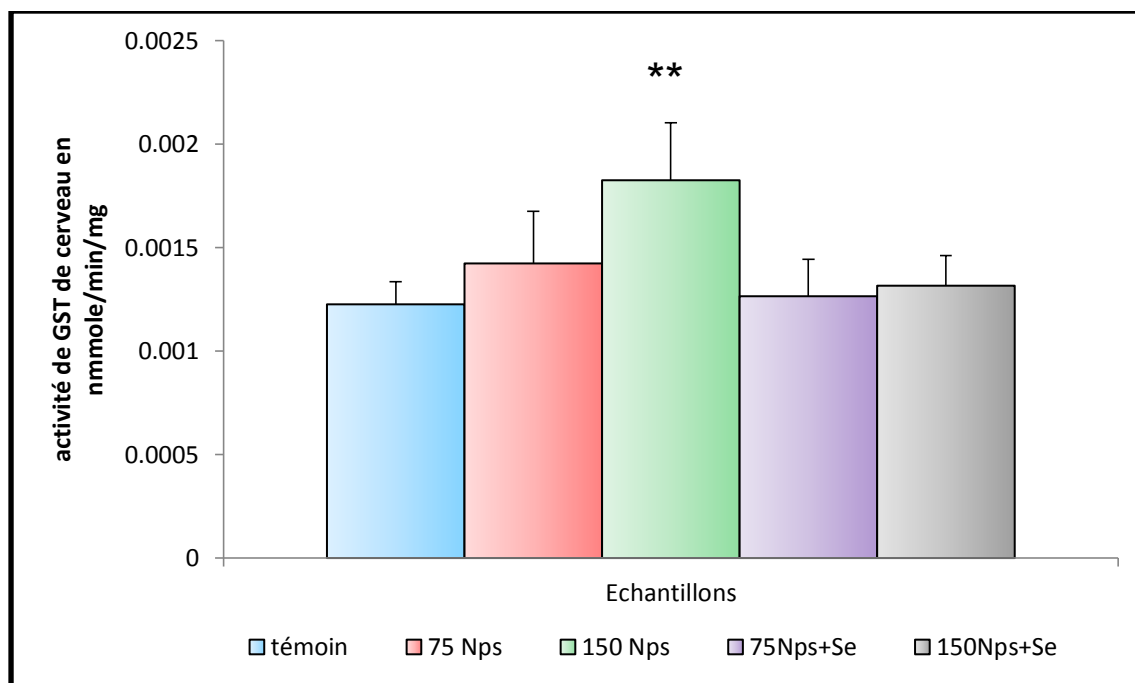


Figure 18: Variation de l'activité de GST de cerveau (en mmole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.001$).

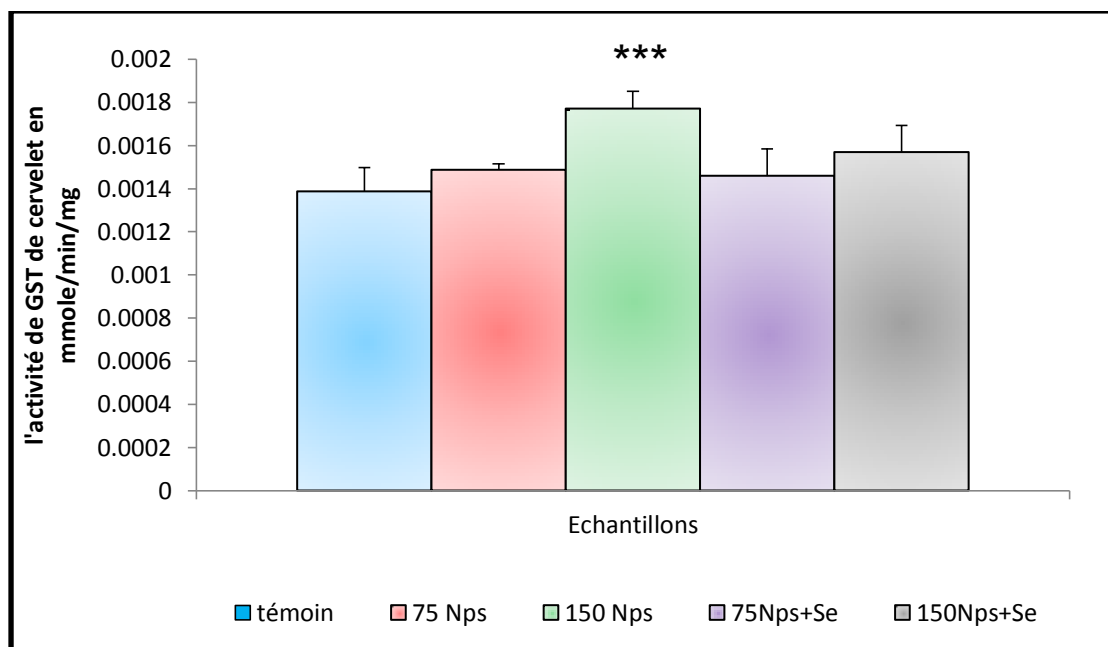


Figure 19: Variation de l'activité de GST de cervelet (en mmole/min/mg des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-3-2- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de catalase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

L'activité de CAT au niveau cytosolique encéphalique est calculée selon le loi de Beer- Lambert. Les résultats obtenues sont représentés dans les figures (20 et 21).

Nos résultats montrent une augmentation non significative ($p \geq 0.05$) de l'activité de catalase de cortex (avec les deux doses) et de cervelet (avec la dose faible), tandis que la forte dose entraîne une augmentation significative ($p \leq 0.05$) par rapport au groupe témoin, l'addition de sélénium à $0.05 \mu\text{g/kg/jour}$ corrige cette augmentation.

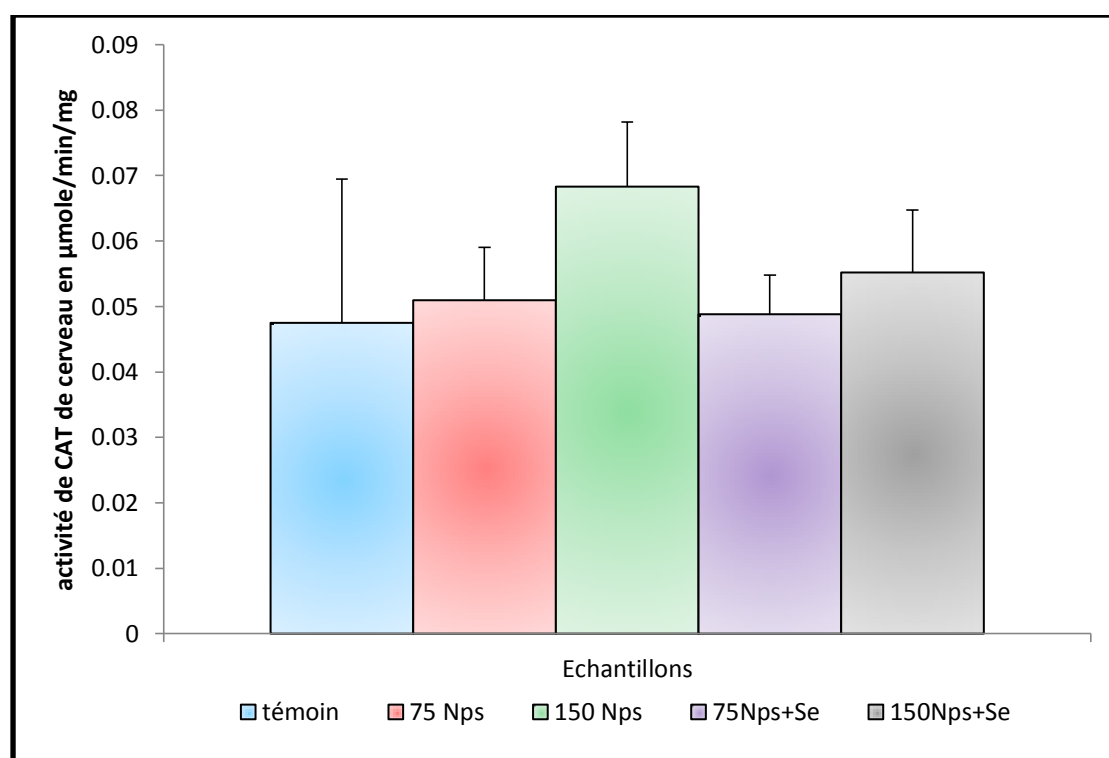


Figure 20: Variation de l'activité de CAT de cerveau (en $\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.097$)

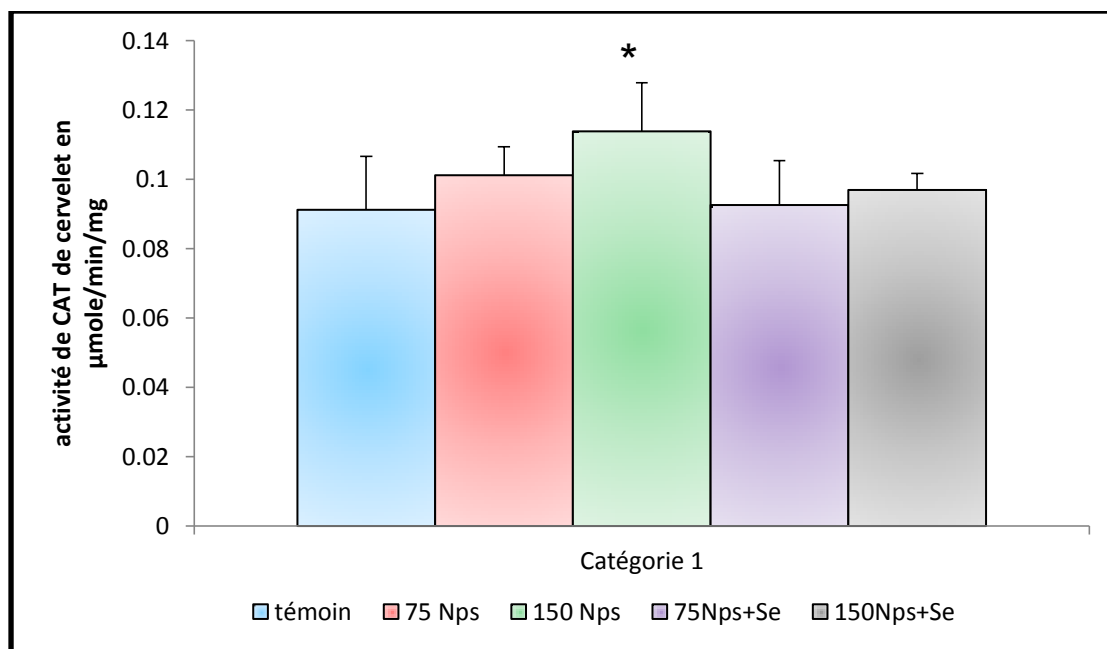


Figure 21: Variation de l'activité de CAT de cervelet (en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.041$).

III-3-3- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de glutathion peroxydase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

Les figures (22 et 23) illustrent les variations de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) au niveau de deux régions encéphaliques (le cerveau et le cervelet) en présence des nanoparticules d'oxyde de fer et de Se après le traitement pendant trois mois. Nous remarquons que l'activité glutathion peroxydase (GPx) a diminuée chez les lapins traités comparé à celui des témoins.

L'étude statistique illustre une diminution non significative de l'activité enzymatique de glutathion peroxydase chez les lots traités par les différentes doses (75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ des nanoparticules d'oxyde de fer).

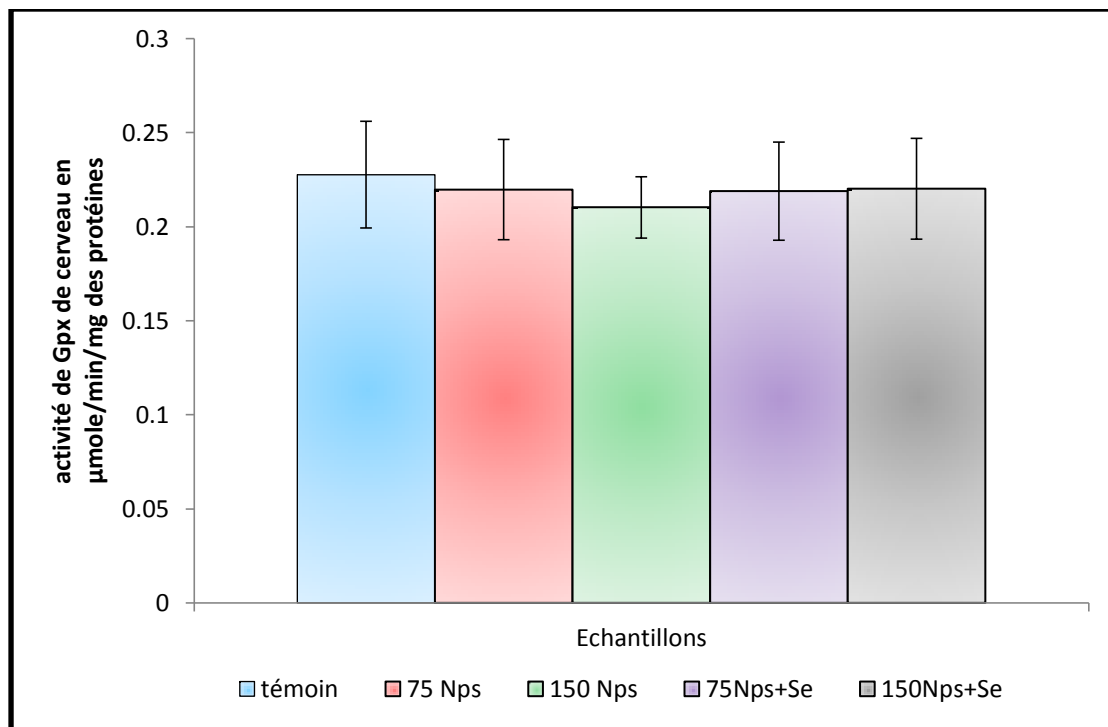


Figure 22: Variation de l'activité de GPx de cerveau (en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.877$).

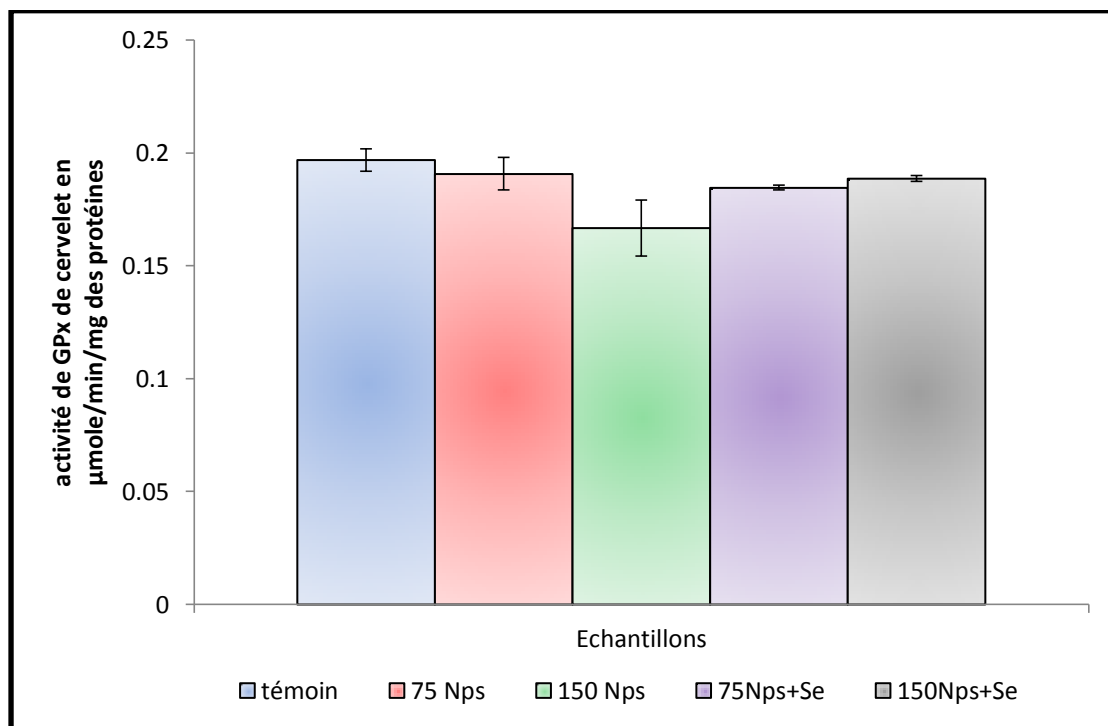


Figure 23: Variation de l'activité de GPx de cervelet (en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.499$).

III-3-4- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de l'acétyl choline-estérase au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

L'activité de l'AchE ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) a été calculé pour chaque échantillon par application de la formule d'Ellmand . Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures (24 et 25).

Nous remarquons que l'activité d'AchE a été diminuée chez les lapins traités comparé à celui des témoins. L'étude statistique révèle qu'il y a une différence hautement significative avec ($P \leq 0.01$) dans l'activité d'AchE entre les témoins et les traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ dans les deux régions (cerveau et cervelet);

Concernant la dose 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ l'étude statistique révèle une différence hautement significative pour la région de cerveau et différence très hautement significative dans le cervelet.

Par contre l'addition de sélénium à 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ corrige cette augmentation. ($p \leq 0.05$ chez les traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ en mixture avec le sélénium, dans le cerveau)

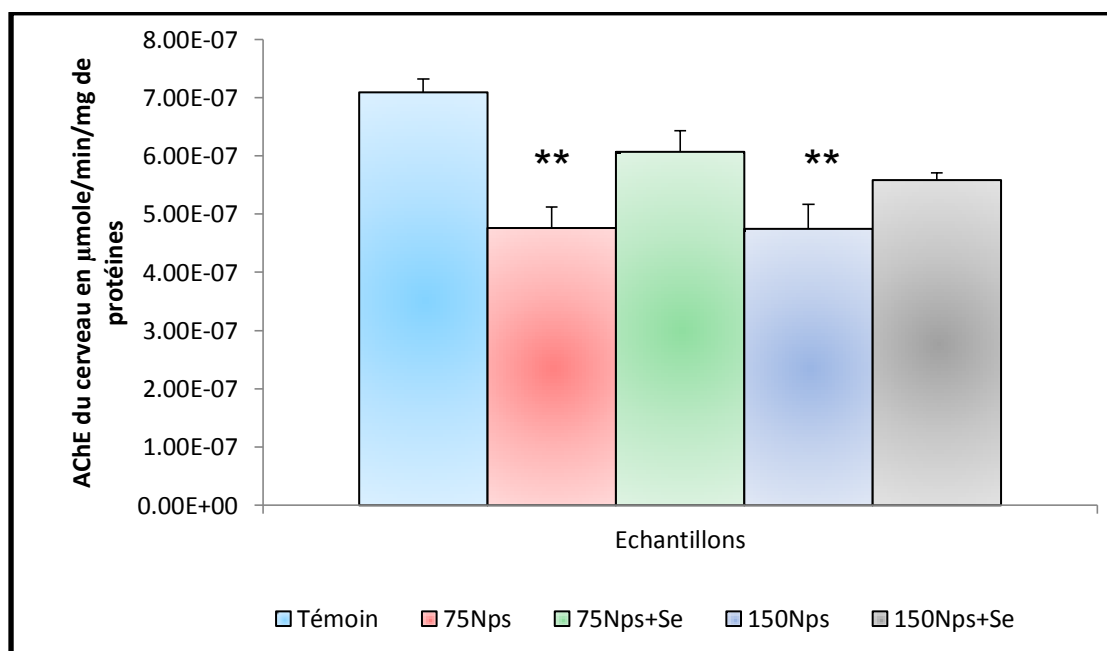


Figure 24: Variation de l'activité de AchE de cerveau (en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.002$)

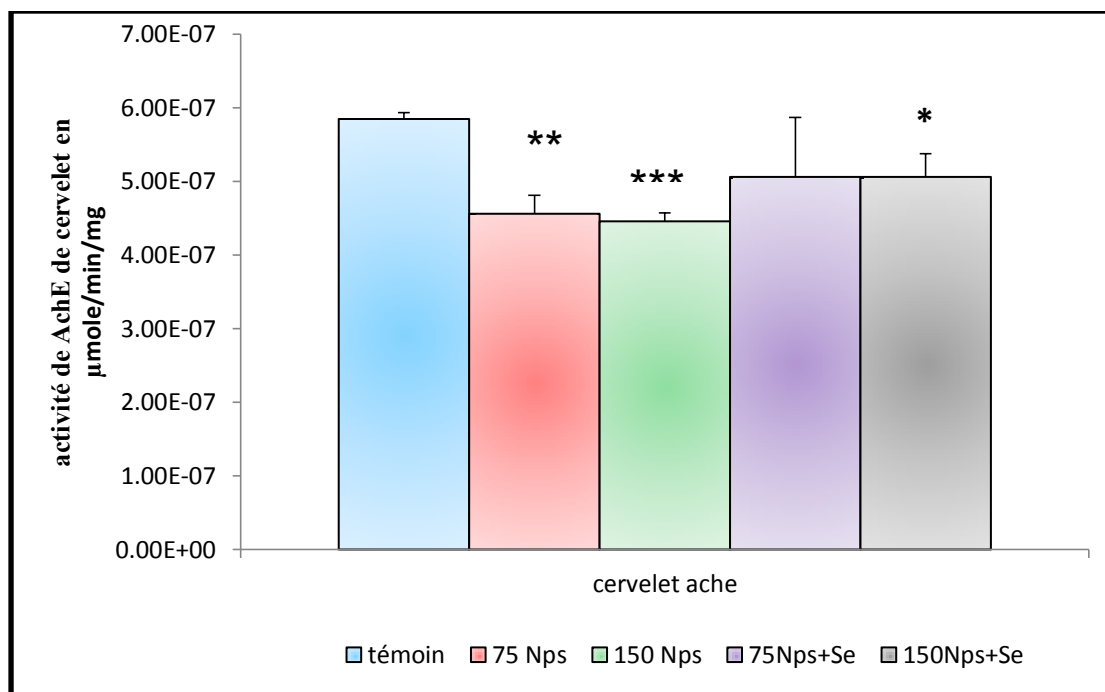


Figure 25: Variation de l'activité de AchE de cervelet (en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ des protéines) des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.000$).

III-4- Effet de traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres mitochondriaux au niveau de cortex et de cervelet des lapins et l'effet protecteur de sélénium

III-4-1- Effet de traitement sur le taux de malondialdéhyde mitochondriale de les deux régions encéphalique.

Le taux de MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) a été calculé pour chaque échantillon par application de la formule de **Draper et Hadley, 1990**. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures (26 et 27).

Le traitement des lapins pendant trois mois par $75 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ des nanoparticules d'oxyde de fer entraîne une augmentation non significative de taux de MDA au niveau des deux régions tandis que la dose $150 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ entraîne une augmentation non significative au niveau de cerveau et une augmentation hautement significative au niveau de cervelet; l'addition de $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ de sélénium corrige cette augmentation.

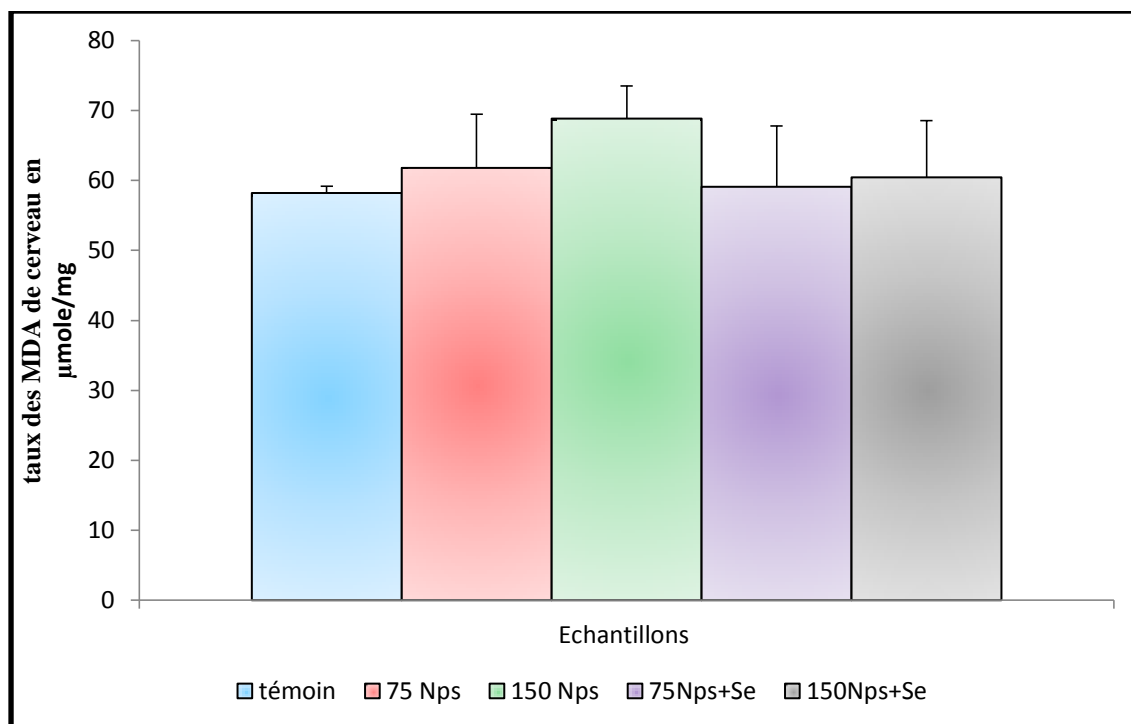


Figure 26: Variation de taux des MDA mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.012$).

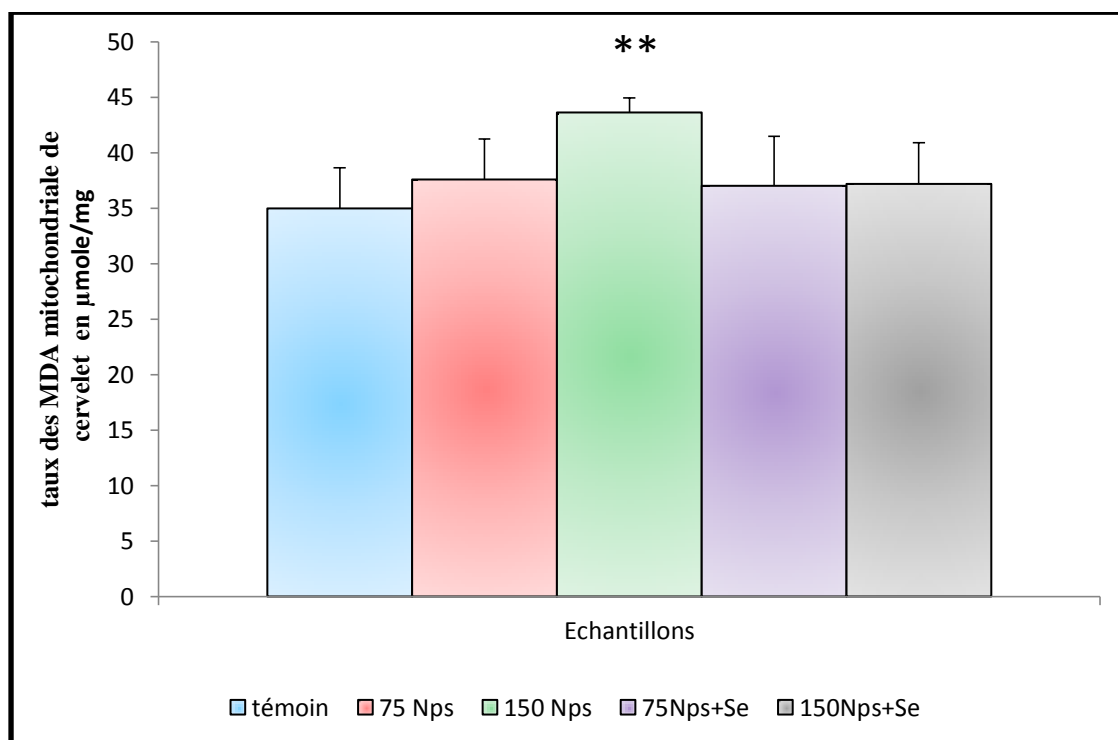


Figure 27: Variation de taux des MDA mitochondriale de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement ($n=05$, $p=0.001$).

III-4-2- Effet de traitement sur le taux de GSH mitochondriale de les deux régions encéphalique

Les figures (28 et 29) représentent le taux de GSH mitochondriale encéphalique chez les lapins après le traitement pendant trois mois par les nanoparticules d'oxyde de fer et de sélénium. La mesure des concentrations des GSH est réalisé par la formule de **Weckbreker et Cory, 1988**.

D'après nos résultats nous remarquons une diminution très hautement significative de taux de GSH mitochondriale chez les lapins traités par les deux doses dans les deux régions, l'addition de sélénium corrige cette diminution ($p \leq 0.001$ chez les traités par la dose $75 \mu\text{g/kg/jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par $150 \mu\text{g/kg/jour}$ en mixture avec le sélénium, dans les deux régions encéphaliques).

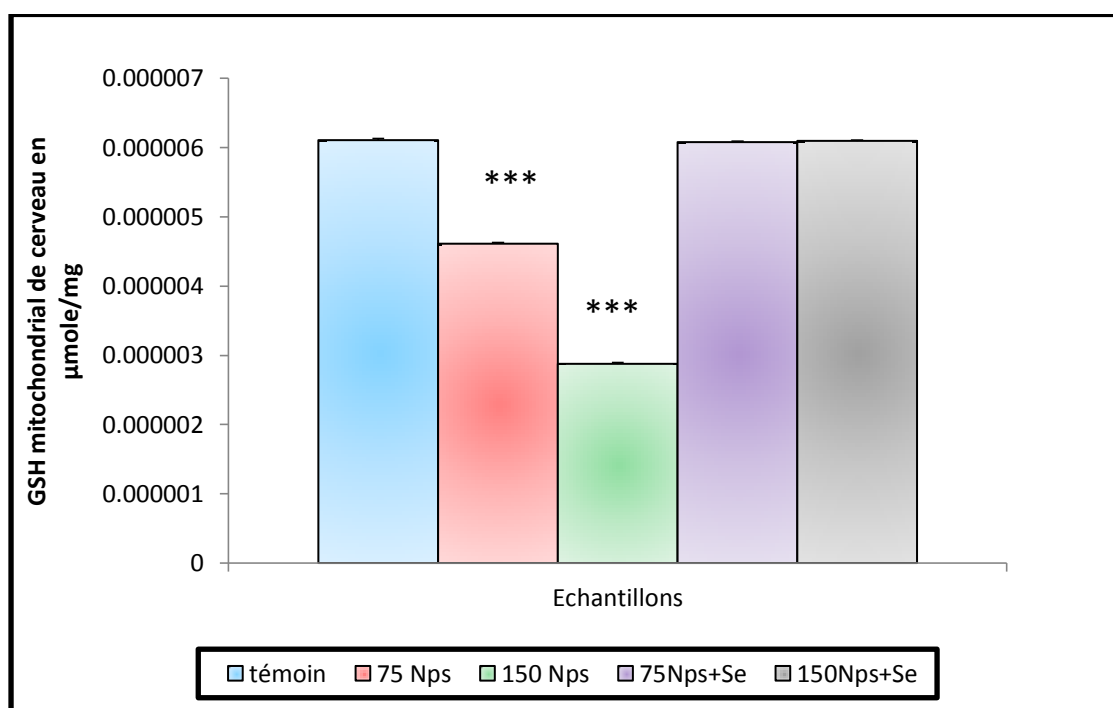


Figure 28: Variation de taux des GSH mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$)

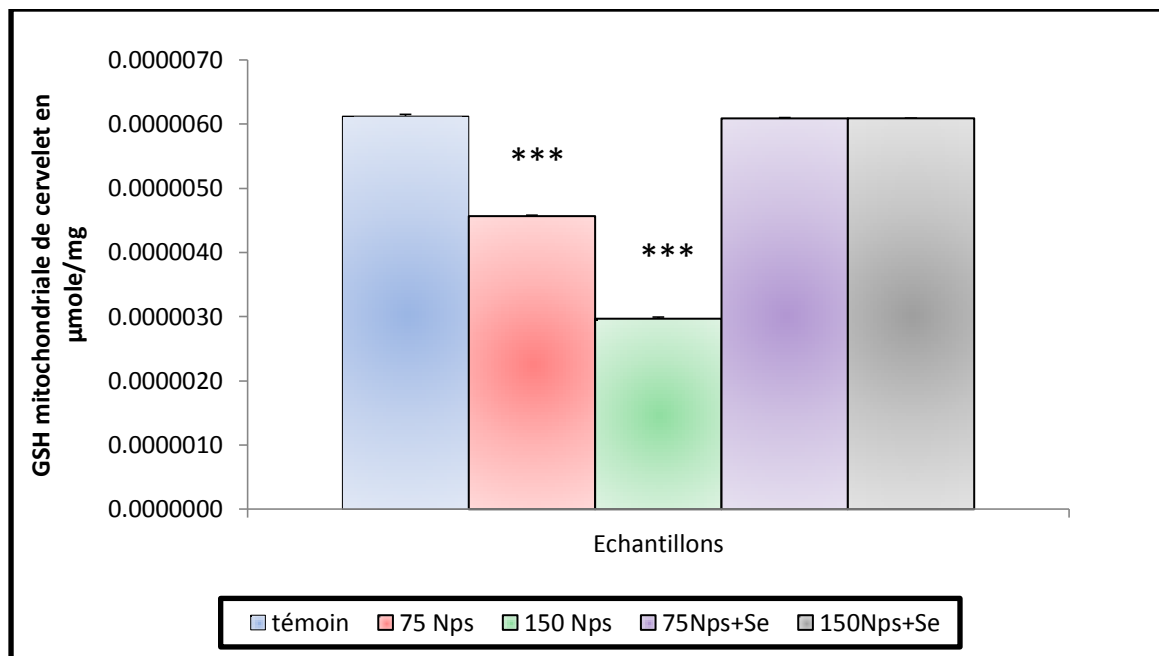


Figure 29: Variation de taux des GSH mitochondriale de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-4-3- Effet de traitement sur l'activité de GPx mitochondriales de les deux régions encéphalique

L'activité de GPx ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) au niveau de stroma des mitochondries des lapins témoins et traités est illustrée dans les figures (30 et 31), on remarque une diminution de l'activité de GPx chez les échantillons traités par les deux doses, l'analyse de la variance révèle:

- ✓ La dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ entraine une diminution significative et la dose 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ entraine une diminution très hautement significative dans la région de cervelet.
- ✓ Les deux doses entrainent une diminution très hautement significative dans le cerveau.
- ✓ L'ajout de sélénium corrige cette diminution ($p \leq 0.001$ chez les traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ en mixture avec le sélénium, dans la région de cerveau)

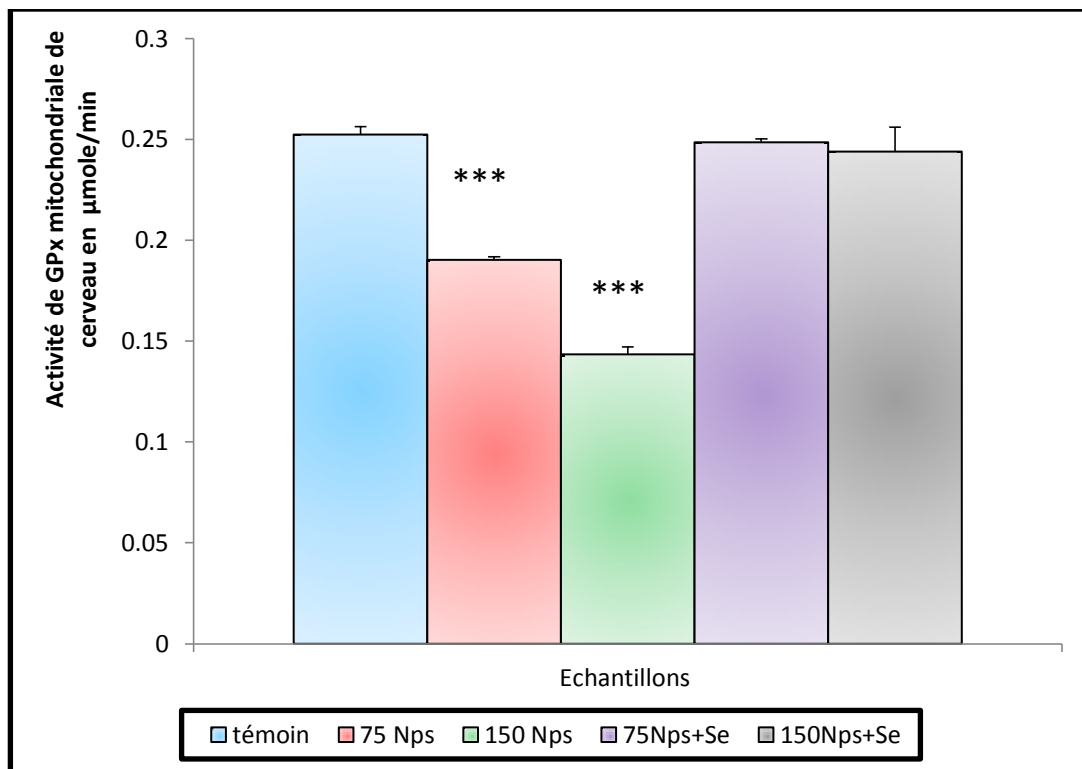


Figure 30: Variation de l'activité de GPx mitochondriale de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

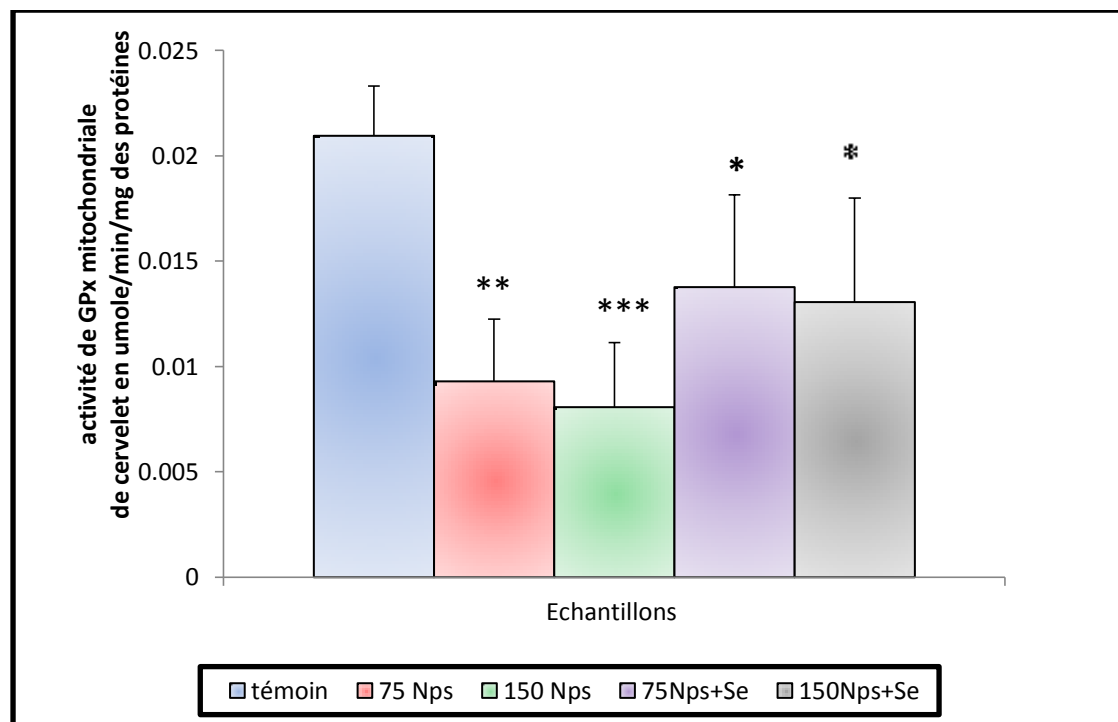


Figure 31: Variation de L'activité de GPx mitochondriale de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-4-4- Effet sur le gonflement mitochondrial .

La mesure de la densité optique à 540 nm renseigne sur les tailles des mitochondries (La taille des mitochondries est proportionnelle à la densité optique à 540 nm). On remarque une augmentation d'absorbance chez les lots traités par les nanoparticules seulement par rapport aux témoins et celles de mixture de Fe₃O₄ et de sélénium. Les résultats obtenues sont envisagées dans les (figures 34 et 35).

L'ANOVA révèle une augmentation très hautement significative des tailles des mitochondries de cerveau, et une augmentation hautement significative de celles de cervelet, l'addition de Sélénium corrige cette augmentation avec un seuil de signification $p \leq 0.001$ chez les traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ en mixture avec le sélénium, dans la région de cerveau et $p \leq 0.01$ chez les traités par la dose 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par rapport aux traités par la dose 75 en mixture avec le sélénium et celles traités par la deuxième doses par rapport aux traités par 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ en mixture avec le sélénium, dans la région de cervelet.

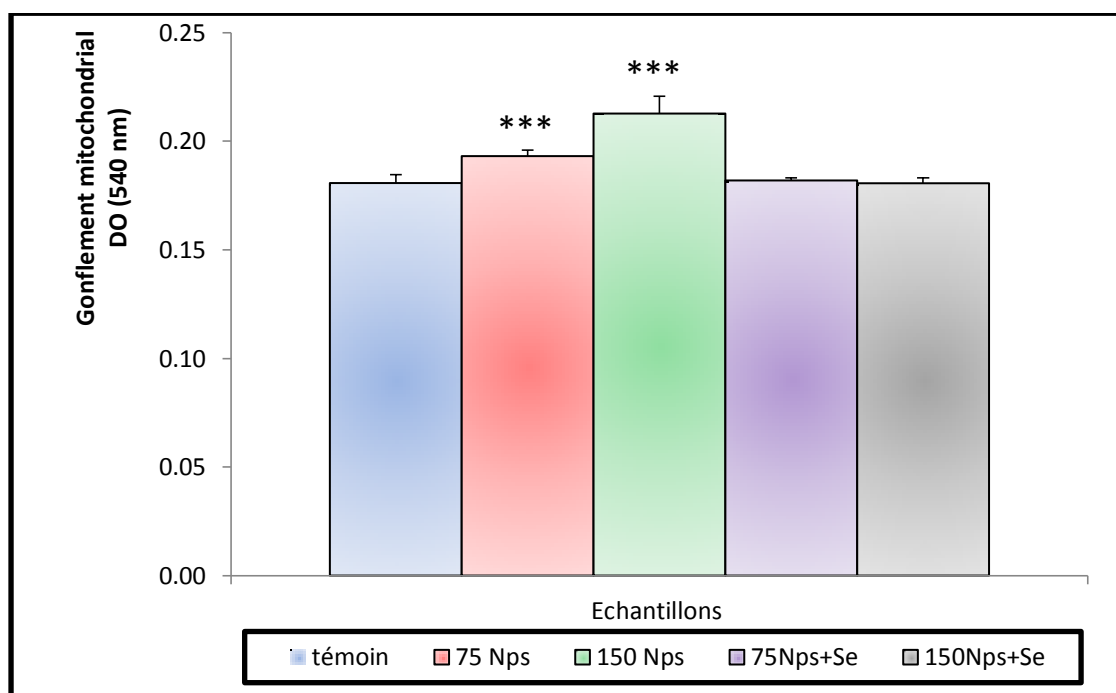


Figure 32: Variation des tailles des mitochondries de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

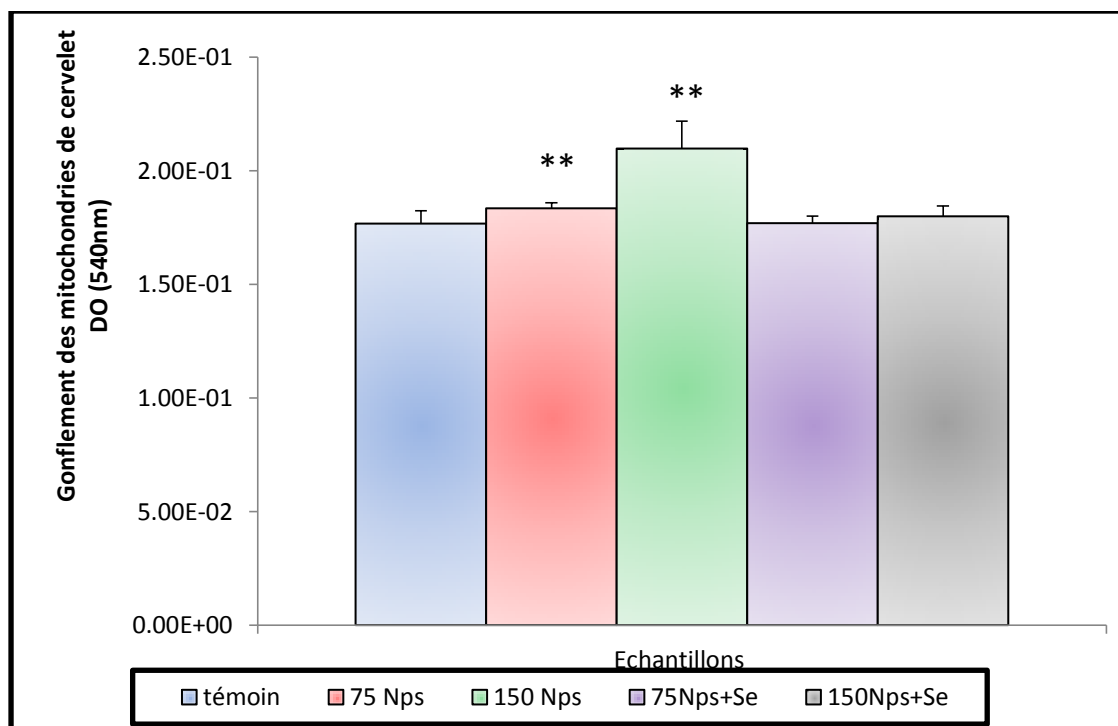


Figure 33: Variation de taille des mitochondries de cervelet des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.001$).

III-4-5- Effet sur la perméabilité mitochondriale

La Figure (34) mise en évidence l'augmentation de perméabilité mitochondriale au niveau de cerveau des lapins témoins, traités par les nanoparticules d'oxyde de fer et de sélénium après le traitement pendant 90 jours .

Après l'addition de calcium nous remarquons une augmentation hautement significative de la taille des mitochondries chez les lapins traités par 75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et une augmentation très hautement significatives chez celle traités par la dose 150 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ par rapport aux témoins ce qui signifie une grande perméabilité. L'addition de sélénium corrige cette augmentation.

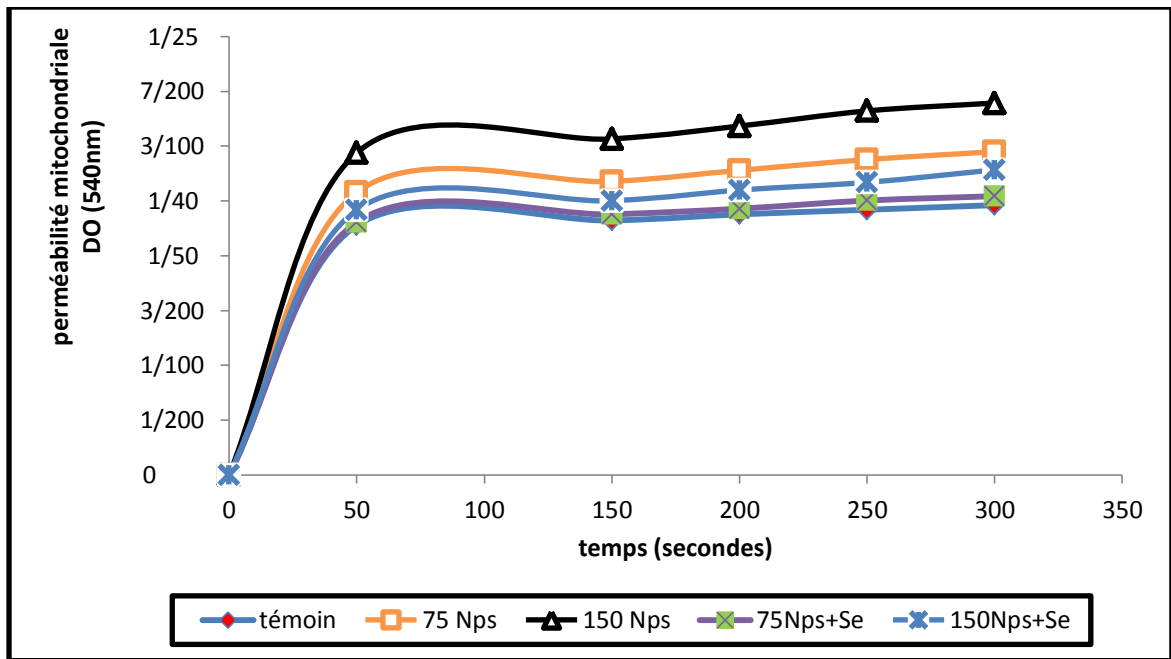


Figure 34: Variation de perméabilité des mitochondries de cerveau des lapins témoins et traités après 90 jours de traitement (n=05, $p=0.000$).

III-5- Effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres de cortex des lapins après intoxication subaigüe.

III-5-1- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le taux des Malondialdéhydes

La figure (35) illustre les variations de taux des Malondialdéhydes en présence des nanoparticules d'oxyde de fer. Nous remarquons que le taux des MDA a augmenté chez les traités comparé à celui des témoins. L'étude statistique révèle qu'il y a une différence très hautement significative avec ($P \leq 0.001$) entre les témoins et les traités par 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$.

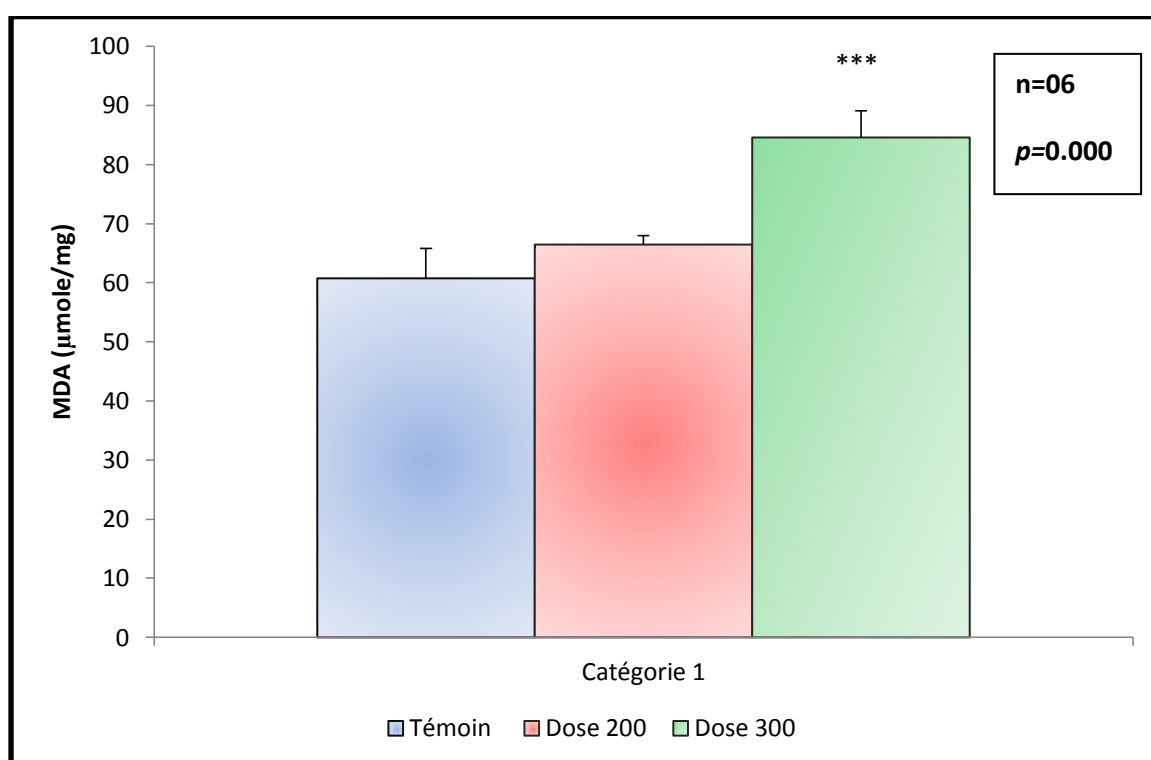


Figure 35: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur le taux de MDA mitochondriale après 14 jours de traitement

III-5-2- Effet sur le GSH mitochondriale après 14 jours de traitement

La figure (36) illustre les variations du taux de Glutathion réduit GSH au niveau des mitochondries de cortex cérébral des lapins en présence des nanoparticules d'oxyde de fer à deux doses . Nous remarquons que le taux de GSH a diminué chez les lapins traités comparé à celui des témoins.

Nous notons une différence très hautement significative avec ($P \leq 0.001$) entre le taux de GSH des traités par la concentration $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ /jour et les témoins. Tandis qu'il n'y pas différence significative chez les traités par $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ /jour.

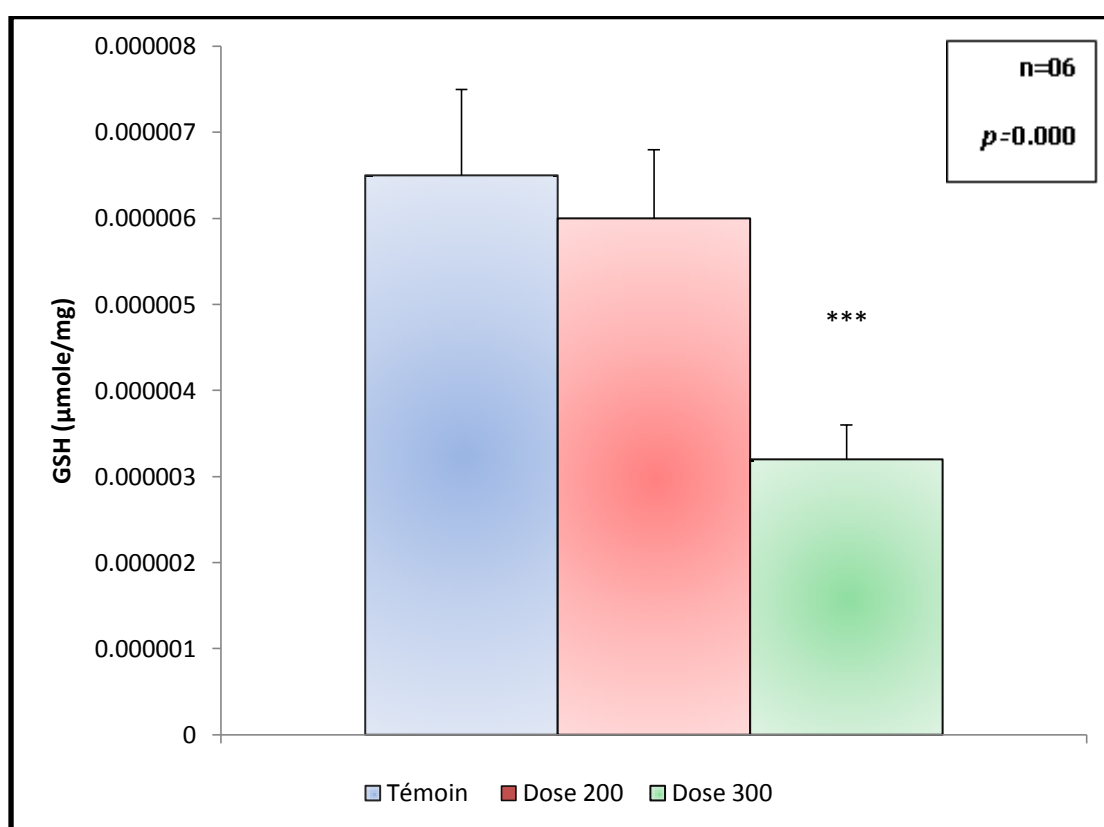


Figure 36: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur le taux de GSH mitochondriale après 14 jours de traitement

III-5-3- Effet sur l'activité de GPx mitochondriale après 14 jours de traitement

La figure (37) illustre les variations de l'activité de glutathion peroxydase (GPx) au niveau de cortex cérébral des lapins traités par deux doses des nanoparticules Fe₃O₄. Nous remarquons que l'activité glutathion peroxydase (GPx) a diminuée chez les lapins traités comparé à celui des témoins. L'étude statistique révèle qu'il y a une différence hautement significative avec ($P \leq 0,01$) entre les témoins et les traités par la dose 200 µg/kg/jour. Ainsi qu'il y a une différence très hautement significative entre les témoins et les traités par la dose 300 µg/kg/jour avec ($P \leq 0,001$) dans l'activité du GPx.

En effet l'activité du GPx passe de 0,25 µmol /mg de protéine chez le témoins à 0,17 µmol /mg de protéine pour ceux traités par la dose 300 µg/kg/jour.

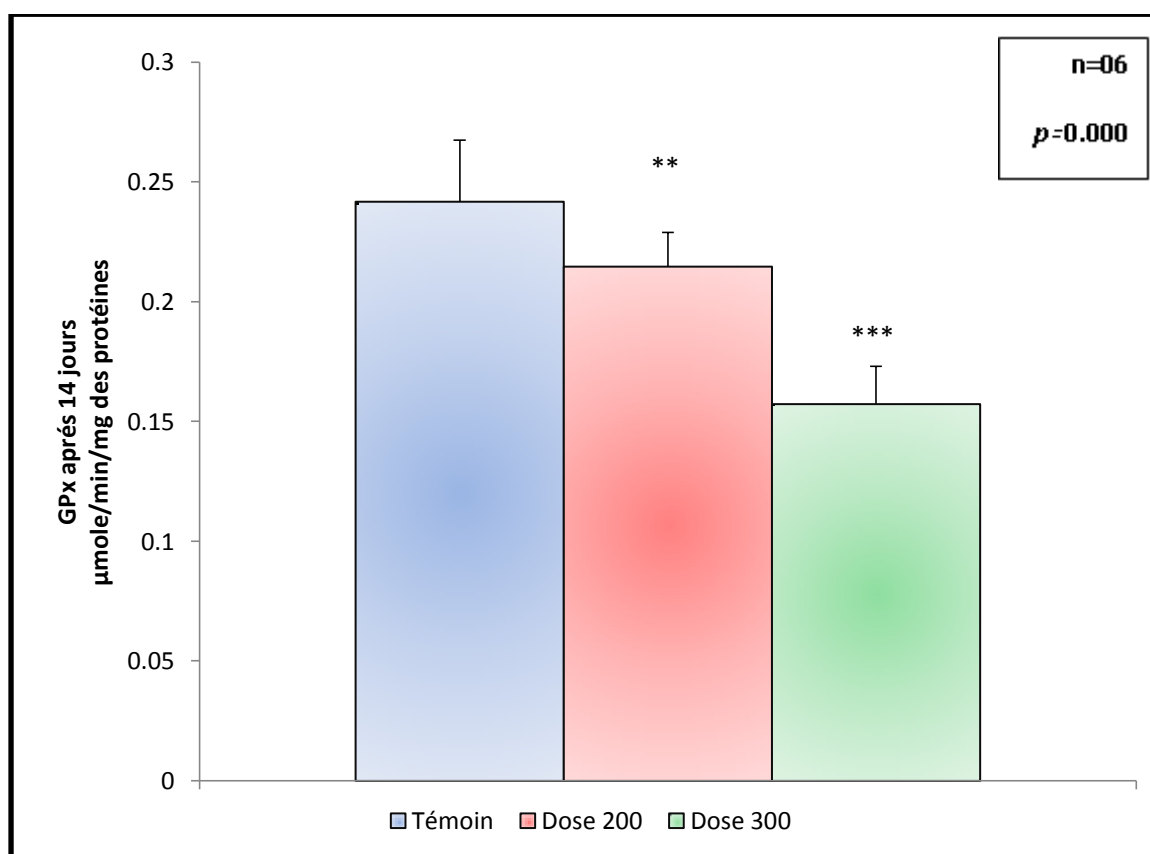


Figure 37: effet des nanoparticules Fe₃O₄ sur l'activité de GPx après 14 jours de traitement

III-5-4-Effet sur l'activité de CAT mitochondriale après 14 jours de traitement

La figure (38) illustre les variations de l'activité catalase au niveau de cortex cérébral des lapins en présence des nanoparticules d'oxydes de fer. Nous remarquons que l'activité catalase a diminué chez les lapins traités comparé à celui des témoins.

L'activité catalase varie entre 0,078 $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins à 0,021 $\mu\text{mol}/\text{mn}/\text{mg}$ de protéines pour ceux traités par la forte dose . D'après l'étude statistique on enregistre une diminution très hautement significative de l'activité de catalase chez les lapins traités par la dose 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$, et une augmentation non significative chez les traités par la dose 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$.

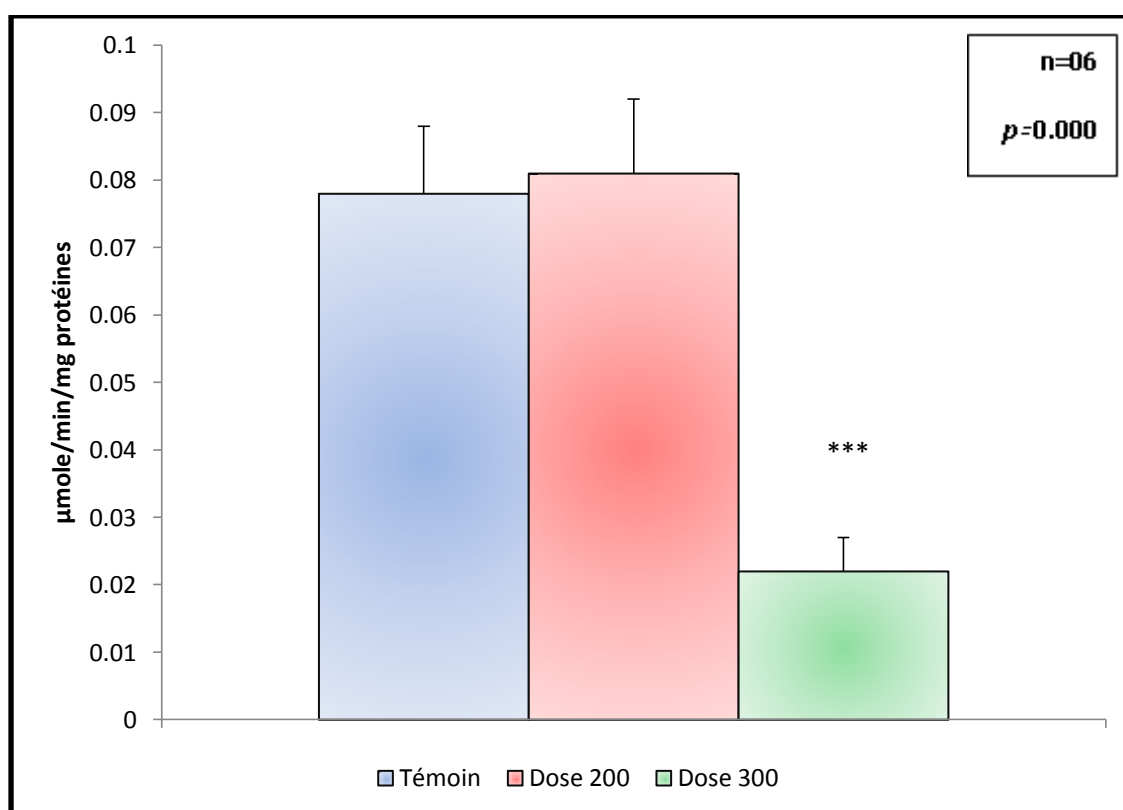


Figure 38: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de CAT après 14 jours de traitement

III-5-5- Effet sur l'activité de GST mitochondriale après 14 jours de traitement

L'effet du traitement avec Fe_3O_4 sur l'activité spécifique de l'activité de GST a été évalué. Les résultats de l'estimation de l'activité spécifique de la glutathion S - transférase des témoins et traitées sont présentés dans la figure 39 ; on note une moyenne de $90 \pm 0,14 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins, $60.12 \pm 0,112 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ chez le lot traité par la faible dose et de $54.02 \pm 0,11 \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ chez les lapins traités par la dose $300\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ des Fe_3O_4 Nps.

L'analyse de la variance indique une diminution très hautement significative de l'activité de GST des lots traités.

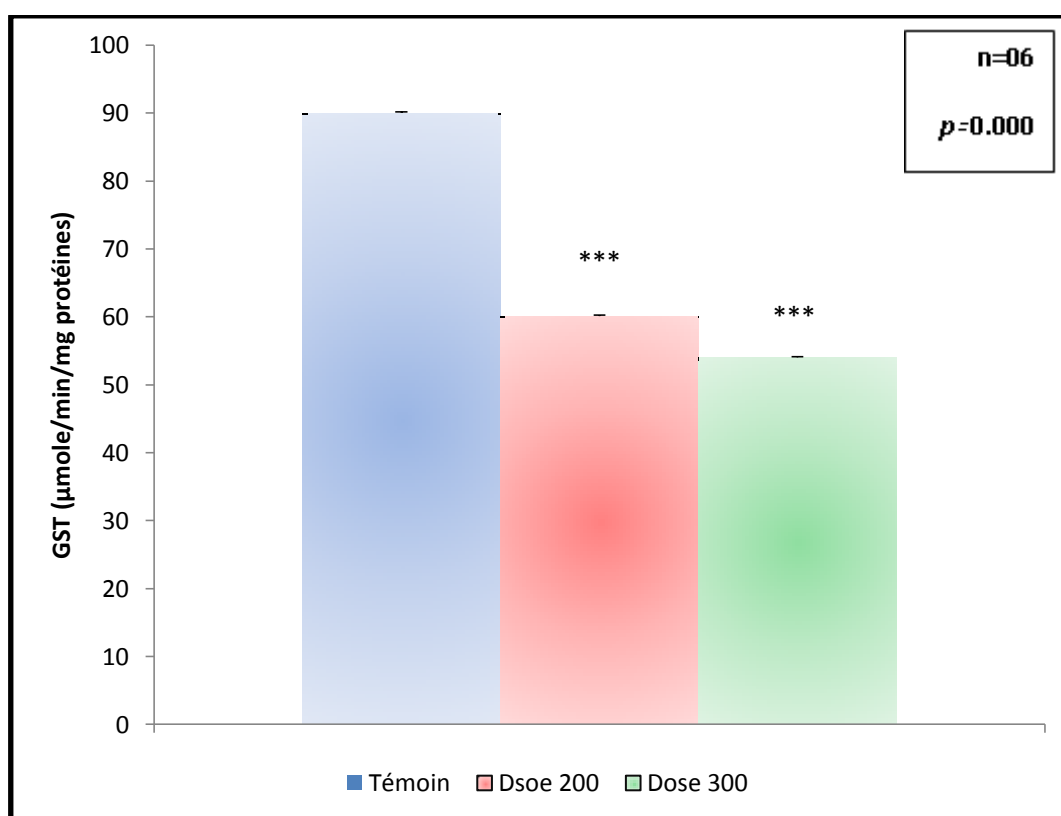


Figure 39: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de GST après 14 jours de traitement

III-5-6- Effet sur l'activité de SOD

L'activité de Superoxyde dismutase (SOD) a été estimée chez les séries témoins et traitées (200 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) (Figure 40).

Les résultats enregistrés chez les lots traités indiquent que le Fe_3O_4 réduit de manière très hautement significative l'activité de SOD.

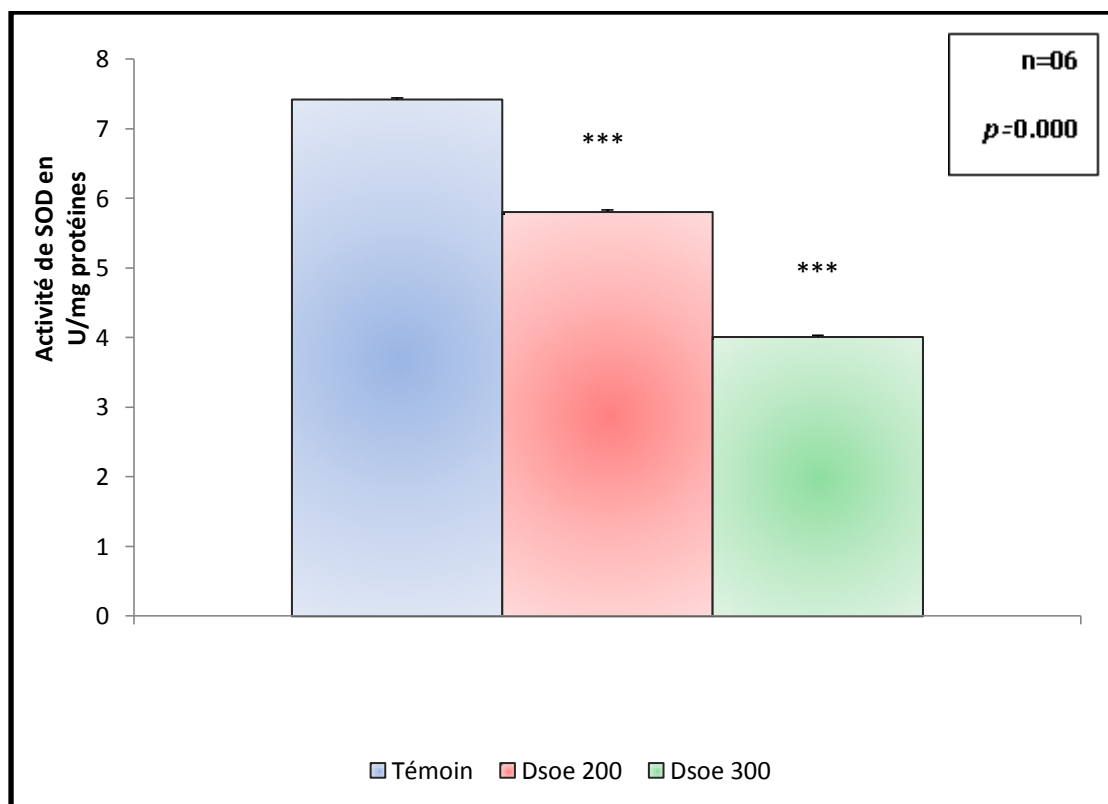


Figure 40 : effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de SOD après 14 jours de traitement

III-5-7- Effet sur le TNF- α

La Figure (41) mise en évidence l'augmentation du facteur de nécrose tumorale TNF alpha des lapins traités par les nanoparticules d'oxyde de fer après le traitement pendant 14 jours.

L'analyse statistique montre une différence très hautement significative entre le TNF alpha des témoins et des traités par les deux doses (200 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$). Qui varie de 20.5 picogramme chez les témoins à 50 à 53 pg/ml chez les traités.

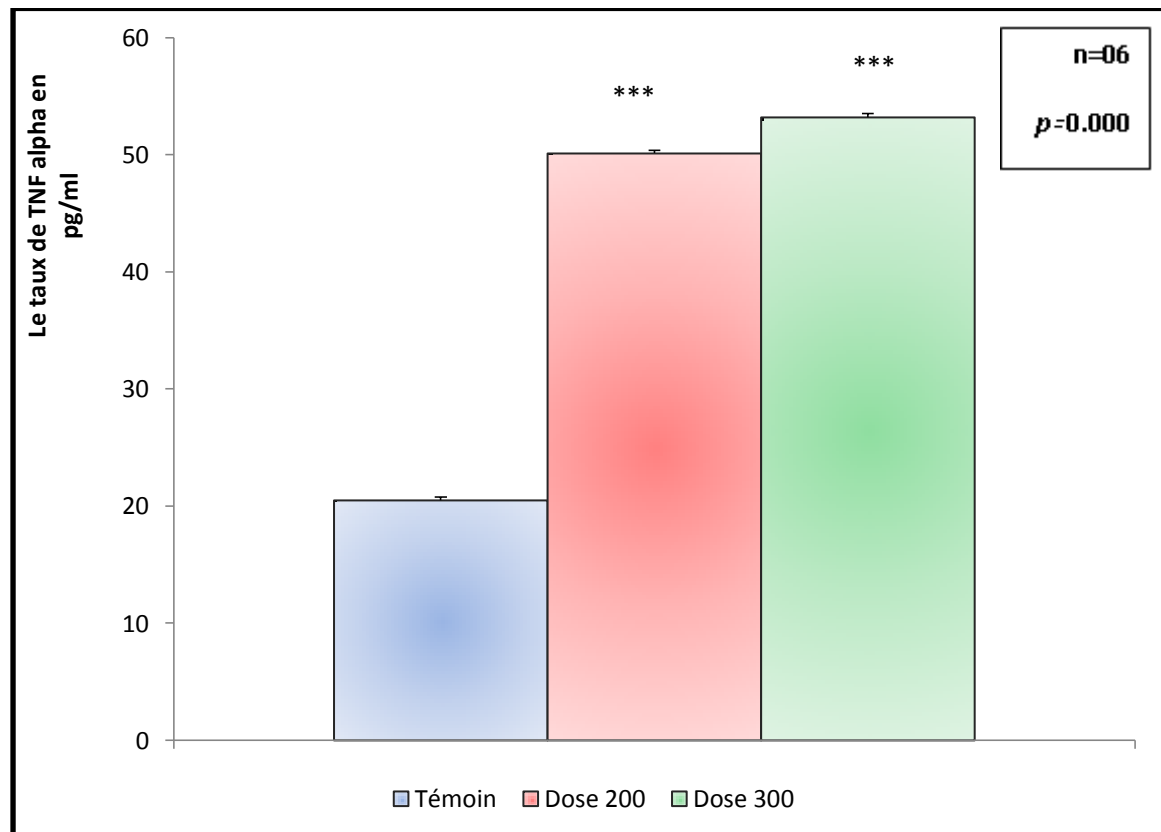


Figure 41: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de TNF α après 14 jours de traitement

III-5-8- Effet sur l'activité de Caspase-3

Les résultats concernant la quantification du caspases-3 sont présentés dans la figure 42 . une augmentation très hautement significative de la densité optique (qui est proportionnelle à l'activité des caspases-3) a été enregistré chez les lots traités.

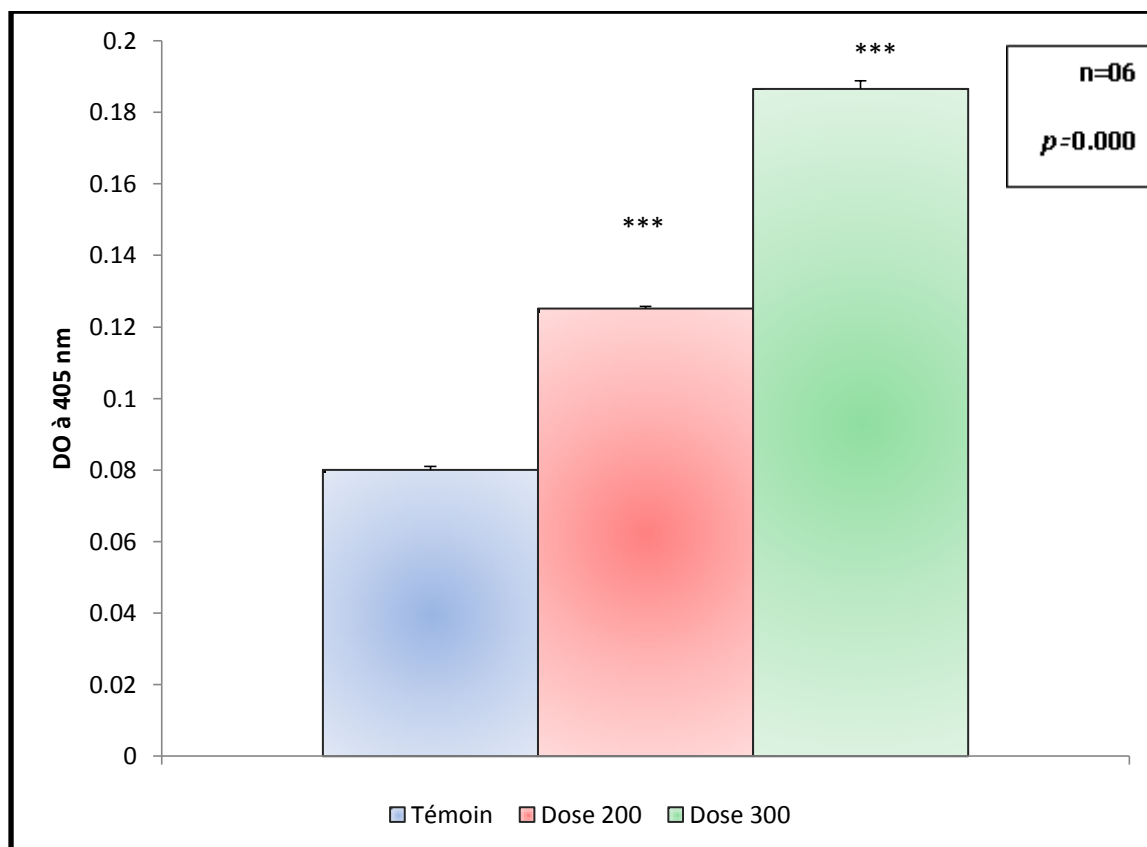


Figure 42: effet des nanoparticules Fe_3O_4 sur l'activité de Caspase-3 après 14 jours de traitement (Absorbance à 450 nm)

III-5-9- Effet sur la taille des mitochondries corticales

La figure (43) montre les tailles des mitochondries de cortex cérébrale chez les lapins témoins et traités par des nanoparticules d'oxyde de fer pendant 14 jours. On a remarquée une augmentation des tailles des mitochondries des lapins exposés aux Fe_3O_4 à 200 et 300 $\mu g/kg/jour$ par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance révèle une augmentation très hautement significative des tailles des mitochondries des lapins traités par les deux doses des nanoparticules ($p \leq 0.001$).

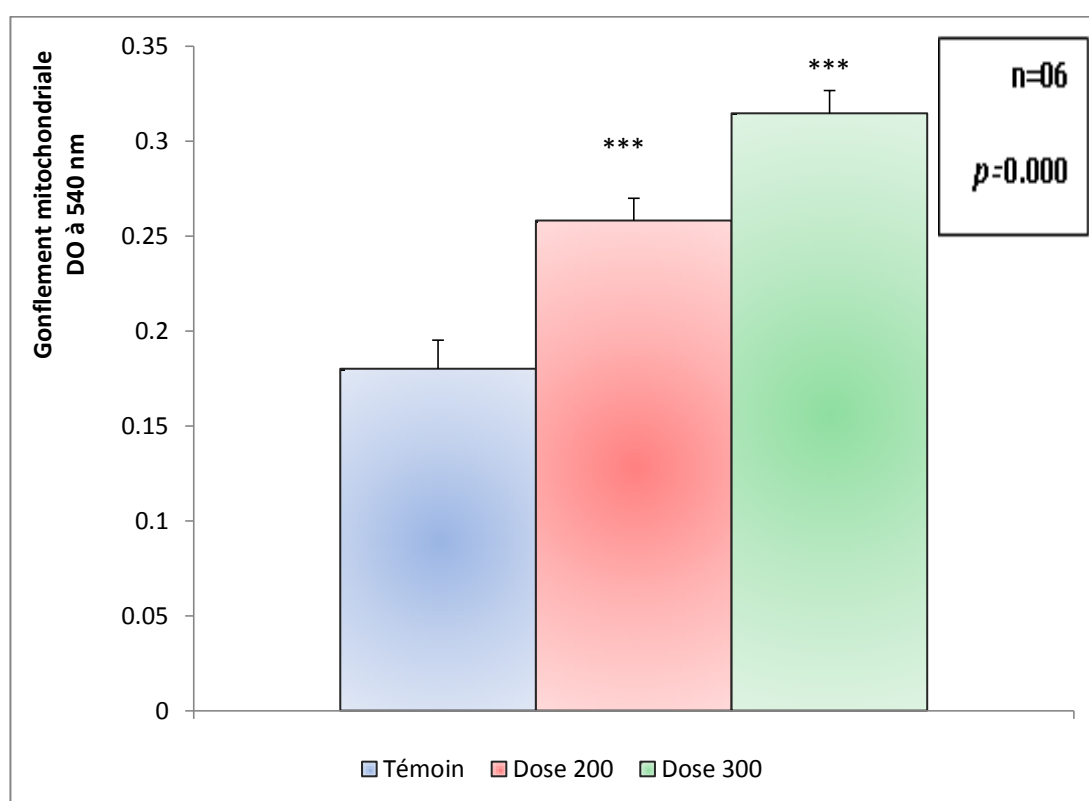


Figure 43: Effet des NPs d'oxyde de fer sur le gonflement mitochondrial en fonction de temps

III-5-10- Effet sur la perméabilité mitochondriale

La figure (44) mise en évidence les variations du perméabilité mitochondriale aux ions de Calcium en fonction du temps. Nous remarquons que chez les témoins et les traités avec les différentes doses (200, 300 $\mu g/kg/jour$), la perméabilité de mitochondries est augmenté rapidement dans les premier 30 secondes et devient lente.

L'étude statistique révèle une augmentation très hautement significative des tailles des mitochondries chez les lapins traités par les deux doses (200 µg/kg/jour et 300 µg/kg/jour) ce qui signifie une grande perméabilité aux ions de calcium par rapport aux témoins.

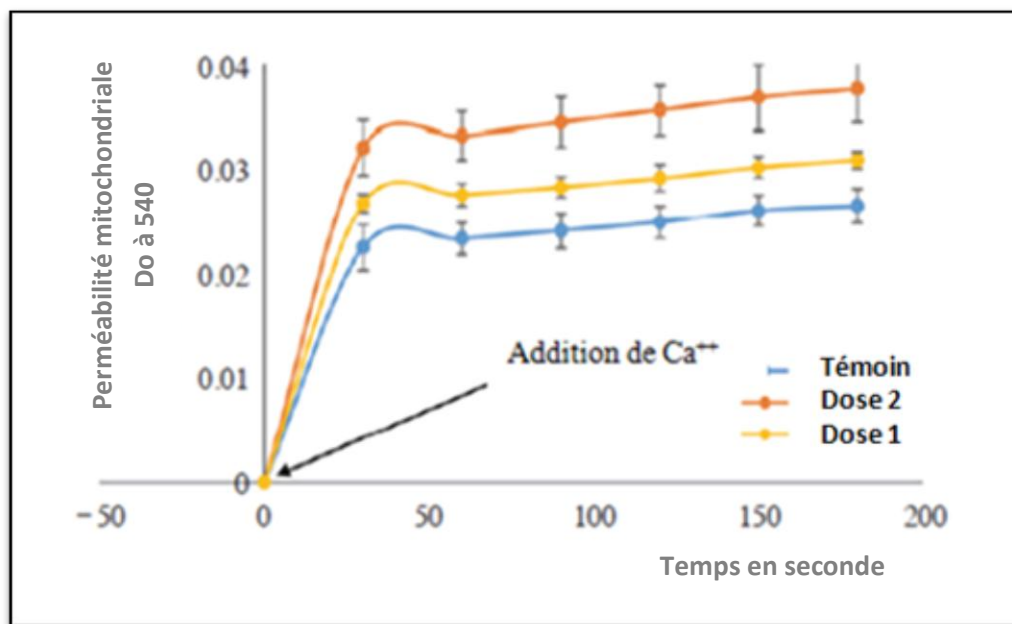


Figure 44: Effet des NPs d'oxyde de fer sur la perméabilité mitochondriale en fonction de temps ($p \leq 0.001$, $n=06$).

III-5-11- Effet sur la respiration cellulaire

La figure (45) et le tableau (09) mise en évidence les variations des quantités de l'oxygène consommées par les mitochondries en fonction du temps. Nous remarquons que chez les témoins et les traités avec les différentes doses (200, 300 µg/kg/jour), la consommation d'O₂ par les mitochondries est augmenté en fonction de temps. En effet la quantité d'oxygène consommé par les mitochondries des lapins traités est plus faible que la quantité consommée par les témoins.

L'analyse de la variance révèle une diminution très hautement significative de la respiration cellulaire chez les lots traités par rapport aux témoins.

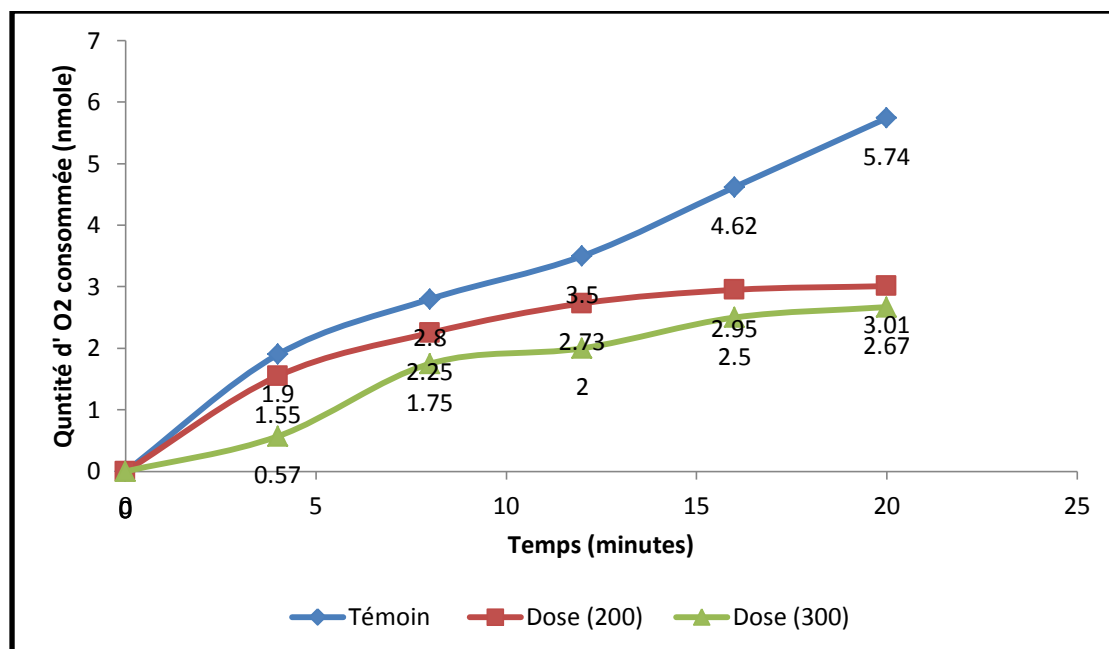


Figure 45: Effet des NPs d'oxyde de fer sur la respiration cellulaire en fonction de temps ($p \leq 0.001$, $n=06$).

Tableau 09: Quantité d'oxygène consommée par les mitochondries corticales des lapins témoins et traités en fonction du temps.

	Temps (min)	4	8	12	16	20
Quantité d'oxygène consommé (nmole)	Témoin	1.9 ± 0.219	2.80 ± 0.193	3.5 ± 0.082	4.62 ± 0.086	5.74 ± 0.074
	Dose 200 µg/kg/j	1.55 ± 0.093	2.25 ± 0.090	2.73 ± 0.083	2.95 ± 0.084	3.01 ± 0.097
	Dose 300 µg/kg/j	0.57 ± 0.129	1.75 ± 0.111	2.00 ± 0.074	2.50 ± 0.084	2.67 ± 0.092

Discussion

IV- Discussion

On a tenté dans le cadre de le présent travail d'évaluer les effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres enzymatiques et biochimiques au niveau des deux régions encéphaliques (le cerveau et le cervelet) des lapins *Oryctolagus cuniculus* comme modèle biologique, aussi on a cherché des effets neurotoxiques au niveau mitochondriale, on a intéressé aussi de l'effet protecteur de sélénium contre la neurotoxicité induite par les nanoparticules d'oxyde de fer. Pour une meilleure compréhension des mécanismes et les causes de toxicité, les résultats obtenus sont analysés et discutés en fonction des plusieurs études et travaux relatés dans la monographie.

Les nanomatériaux ont une grande variété d'applications dans de nombreux secteurs technologiques. La diffusion des nanoparticules, leur persistance dans l'atmosphère et leurs impacts sur le vivant sont totalement différents des particules de plus grande dimension et de même composition chimique. Plusieurs études documentées, y compris chez l'homme, conduisent à suspecter l'existence de leurs effets toxiques cutanés, pulmonaires, cardiovasculaires et cancérogènes. Des nombreuses études concernant les effets sur la santé et l'environnement sont en cours. Leurs conclusions définitives ne seront connues que dans quelques années. Les effets toxiques documentés issus de l'expérimentation animale et de l'épidémiologie, ainsi que les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules justifient, sur la base du principe de précaution, de prendre toutes les mesures utiles pour limiter l'exposition et protéger la santé des personnes potentiellement exposées (**Prosie et al., 2008**).

Les nanomatériaux peuvent entrer dans le corps par voie orale, respiratoire, cutanée ou bien intraveineuse, puis ils peuvent être distribués dans les différents tissus (**Burch, 2002; Takenaka et al., 2001**). Y compris le cerveau, il y a plusieurs arguments que les nanoparticules peuvent traverser la barrière hémato encéphalique (**Begley, 1996**).

Cependant, la perturbation directe des membranes cellulaires neuronales par NPs permettraient leur entrée dans le cerveau. Par exemple, les nanoparticules métalliques par exemple Ag, Cu ou Al qui mesurent entre 50 et 60 nm perturbent le barrière hémato encéphalique (**Sharma et Sharma, 2007**).

Dans une étude réalisé en 1970 par **De Lorenzo**, montre que les particules ultrafine Ag sont transportés jusqu'aux les bulbes olfactifs des singes. Aussi les nanoparticules d'oxyde de Mn, Cd, Ni et Co peuvent être transportés vers le cerveau via les neurones olfactifs (**Talkvist et al., 1998; Elder et al., 2006**).

Oberdorster et al. , (2004), ont démontrés que l'inhalation des nanoparticules de taille 36 nm par les rats pendant 6 heures dans tout le corps et montrent aussi que les concentrations des nanoparticules sont significativement élevé dans le cerveau et le cervelet. **Elder et al., (2006)**, démontre que les nanoparticules d'oxyde de manganèse ont été trouvées dans les différentes parties du cerveau du rat après une exposition durant 6 jours.

La consommation d'oxygène dans le cerveau représente près d'un quart de la consommation de tout le corps. Par conséquent, le cerveau est plus sensible à des blessures hypoxique que d'autres tissus et est plus vulnérable aux dommages oxydatifs (**Song et al., 2016**).

IV- 1- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur les métabolites

Lorsque l'intensité du libération des radicaux libres augmente anormalement, les composant cellulaires peuvent être touchées tels que les protéines, les lipides (**Halliwell et Chirico, 1993 ; Radi et al., 1991**) et les glucides (**Jaeschke, 1995**).

✓ Les glucides

Le traitement par les nanoparticules d'oxyde de fer à la dose 75 µg/kg/jour et la dose 150 µg/kg/jour pendant 3 mois chez les lapins *Oryctolagus cuniculus* est capable de modifiée le taux générale des métabolites encéphalique en comparaison avec le témoin, ces modification reflètent une perturbation générale des métabolites au niveau des deux régions (cerveau et cervelet).

L'augmentation significative de taux des glucides encéphaliques chez les lapins traités par les deux doses est expliqué par l'effet inhibiteur des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité enzymatique, lactate déshydrogénase iso enzyme succinate déshydrogénase et $Na^+ -K^+$ ATP-ase et l'interférence avec la chaine de transport énergétique résultant une accumulation endocellulaire des glucides (**Kramer et al., 1986**).

Le glucose est quasi le seul substrat capable d'être utilisé par le cerveau comme source énergétique. Cette glucodépendance cérébrale fait que toute variation importante de la glycémie est susceptible d'entraîner un dysfonctionnement neuronal pouvant aller jusqu'au coma. Le coma hypoglycémique, le plus fréquent en pratique clinique, a une origine métabolique pure (neuroglucopénie) tandis que le coma hyperglycémique est de mécanisme plus complexe et résulte plutôt de troubles osmotiques. Outre les variations aiguës de la glycémie, il est généralement reconnu que les troubles de la glycémie, moins sévères mais présents de façon chronique ou récurrente, peuvent également aboutir à des perturbations du fonctionnement cérébral. **(Radermecker et al., 2008).**

La supplémentation de Sélénium a corrigé ces effets par rapport aux témoins, probablement par l'empêchement de l'interférence des nanoparticules au groupement SSH membranaire et enzymatique causant une amélioration de transport membranaire

✓ **Les protéines**

L'exposition à des nanoparticules d'oxyde de fer à la dose 75 et la dose 150 µg/kg/jour pendant 3 mois chez les lapins *Oryctolagus cuniculus* induit une augmentation de taux des protéines encéphalique en comparaison aux témoins, ces résultats sont en accord avec celles des Redhouane- Salah, 2004 et Rouabhi et al., 2006 qui trouvent qu'il y a une corrélation entre la perturbation du taux des protéines et la toxicité des Xénobiotiques. Cet augmentation est expliqué par l'induction de la synthèse des protéines de stress en rapport avec le phénomène de bioactivation/ biotarnsformation **(Redhouane- Salah, 2004 ; Rouabhi et al., 2006)** .

En raison de leur petite taille, les NPs peuvent facilement atteindre le cerveau et ils sont repris par les cellules du cerveau, telles que les neurones et les cellules gliales. Les mécanismes reconnus de l'absorption des NP comprennent pinocytose. Les nanoparticules peuvent être incapables de se dégrader, et ils peuvent s'accumuler dans les organes en raison de leur taux de dégradation lente. Ils peuvent affecter les enzymes et les protéines et peuvent perturber les processus biologiques dans le corps **(Feng et al., 2015).**

Tandis que l'ajout de Sélénium corrige cet augmentation par rapport aux témoins.

✓ **Les lipides**

La diminution de taux des lipides chez les lapins traités par l'oxyde de fer nanométrique est expliqué par la dégradation des lipides encéphaliques par l'activation de la peroxydation lipidique (**Esterbauer et al., 1992; Ferrat et al., 2003**).

Des études réalisées par **Apopa et al. (2009)** et **Naqvi et al. (2010)**, Confirment que l'exposition a des nanoparticules d'oxyde de fer augmente significativement la production des radicaux libres en une heure.

Les radicaux libres interagissent avec les lipides et les protéines, abondamment présents dans biomembranes, résultant la peroxydation des produits lipidiques associés. Les acides gras polyinsaturés sont soumises à l'oxydation donnant lieu à des hydroperoxydes lipidiques (**Knaapen et al., 2004; Howden et faux, 1996**) et un lipidose légère (**Volkovova et al., 2015**).

IV-2- Effet sur les biomarqueurs non enzymatiques

✓ **Le glutathion (GSH)**

Pour limiter l'accumulation excessive des ERO dans l'organisme, la cellule utilise les antioxydants non enzymatiques parmi lesquels: Le glutathion. La fonction principale de ces derniers est la protection contre la peroxydation lipidique en arrêtant la formation des ROS. Le GSH est très abondant dans le cytoplasme et les mitochondries (**Massaad et Klann, 2011**). Le glutathion constitue le système antioxydant de la première défense grâce à la fonction thiol qui se lie aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant en synergie avec la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et le Catalase (**Morin et al., 2004**).

La diminution de taux de GSH résultant de leur action avec des radicaux libres générés avec les nanoparticules. Les radicaux libres déclenchés par les nanoparticules réduisent le GSH dans sa forme oxydée disulfure de glutathion (GSSG), ainsi contribuant au stress oxydatif, l'apoptose et la sensibilisation à des stimuli oxydants (**Rahman, 2007**).

✓ **Malondialdéhyde**

L'augmentation de taux de MDA indique une peroxydation lipidique qui est suivie par changement des structures membranaires, la production de MDA est parallèle à la peroxydation lipidique (**Zhang et al., 2009**).

Des études réalisés par **Shukla et al., (2011)** et **Turski et Thiele, (2009)** confirment que les métaux pro-oxydants tels que Cu et Fe réagissent avec ces hydroperoxydes lipidiques et endommagent le malondialdéhyde (MDA) et 4-hydroxynonanal qui agissent comme médiateurs de l'inflammation. L'exposition à des nanoparticules d'oxyde de métal de Ti, Cu, Si et Fe ont été rapportés pour induire des lésions tissulaires, réponse au stress cellulaire anormale via peroxydation lipidique.

IV-3- Effet sur les biomarqueurs enzymatiques

✓ **Effet sur l'activité de CAT**

Pour limiter l'accumulation excessive des ERO dans l'organisme, il existe des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques, parmi les systèmes enzymatiques: le CAT qui détruit le H_2O_2 en H_2O (**Stanley et al., 2011; Lun et Holmgrn, 2013**); les ROS déclenchés par les nanoparticules modifient l'activité antioxydante des enzymes antioxydants: la catalase, le glutathion peroxydase (**Stambe et al., 2004**).

D'après nos résultats on observe une augmentation de l'activité des CAT chez les lapins traités par la dose 150 des nanoparticules . Donc ces enzymes sont impliqués dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. En revanche l'activité de CAT au niveau mitochondriale a été inhibé chez les lapins traités par la dose 300 pendant 14 jours, cette inhibition est peut être due à une affection radicalaire de l'enzyme CAT qui aboutit au paralysie de celle-ci.

Une étude réalisé par **Negahdary et al., (2015)**, trouve que les nanoparticules d'argent augmente de manière significative les activités de CAT. Tandis que NPs d'oxyde de zinc et les NPs d'or diminuent de façon significative les activités de CAT en 2 semaines.

✓ **Effet sur l'activité de GST**

Les glutathion transférases (GSTs), également connues sous le nom de glutathion S-transférases) sont des enzymes majeures de détoxification de phase II trouvées principalement dans le cytosol. En plus de leur rôle dans la catalyse, la conjugaison de substrats électrophiles au glutathion (GSH), ces enzymes réalisent également une gamme d'autres fonctions. Ils ont des activités peroxydase et isomérase (**Sheehan et al., 2001**). Ils jouent un rôle important dans la détoxification des Xénobiotiques (**klibet et al., 2009**). Les glutathion-S-transférases jouent un rôle physiologique dans l'initiation de la désintoxication du potentiel Alkylants comprenant des agents pharmacologiquement actifs. Ces enzymes catalysent la réaction de ces composés avec le groupe -SH du glutathion, ce qui neutralise leurs sites électrophiles et rend les produits plus hydrosoluble. On pense que les conjugués de glutathion métabolisé encore par clivage du glutamate et de la glycine résidu, suivie de l'acétylation de l'amine libre résultant de groupe cysteinyle, pour produire le produit final. Les acides mercapturiques, c'est-à-dire S-alkylés dérivés de la N-acétylcystéine, sont ensuite excrétés. Il y a une quantité volumineuse de littérature qui traite de réactions individuelles de glutathion transférase dans des préparations enzymatiques à partir de foie de rat (**Habig et al., 1974**).

D'après nos résultats on observe une augmentation de l'activité de GST au niveau cytosolique donc ces enzymes sont impliqués dans la détoxification. et une diminution au niveau mitochondriale qui peut être due à l'augmentation des radicaux libres au niveau mitochondriale et le ratage des systèmes antioxydants (un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant).

Volkovova et al., 2015, y avait des perturbations à des enzymes antioxydantes après le traitement par les nanoparticules Fe₃O₄ dans le foie des animaux après une semaine d'exposition; avec les modifications les plus sensibles se produisent dans la glutathion transférase (GST).

✓ **Effet sur l'activité de GPx**

Les GPx, enzymes antioxydantes, constituent une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène. La famille des GPx subdivisée en quatre sous familles: la plus abondante chez l'animal

est la GPx cellulaire. Localisée essentiellement dans le cytosol, son rôle est de piéger le H₂O₂ (alors que le H₂O₂ produit dans les peroxysomes est piégé par la catalase localisée dans ces organites). La GPx membranaire (phospholipide hydroperoxyde GPx) a un rôle dans la protection des biomembranes contre la peroxydation lipidique. Il existe également la GPx extracellulaire (plasmatique) et la GPx gastro-intestinale qui, elles aussi, inhibent la production de radicaux libres (**Fournier, 2005**) .

La GPx est capable de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en présence de glutathion (**Stanley et al., 2011; Lun et Holmgrn, 2013**), d'après nos résultats on observe une diminution de l'activité de GPx au niveau des cerveaux des lapins traités par les nanoparticules d'oxyde de fer, on peut expliquer cette diminution par une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement de GSH dans la détoxification du Fe₃O₄ (**Josiane et al., 2007**). Ce résultats sont en accord avec l'étude de **Jeon et al., (2011)**, qui trouve que les nanoparticules d'oxyde de titane inhibe l'activité de GPx et de l'acétylcholine estérase.

Une étude réalisé par **Sebekoval et al., (2014)**, trouve que l'activité de GP_x ou CAT des reins des rats qui reçoit les NPs d'oxyde de fer ne différait pas significativement.

Volkovova et al., (2015), y avait des perturbations des enzymes antioxydantes après le traitement par les nanoparticules Fe₃O₄ dans le foie des animaux après une semaine d'exposition; avec les modifications les plus sensibles se produisent dans la glutathion peroxydase (GPx).

Negahdary et al., (2015), trouve que les nanoparticules d'argent augmente de manière significative l'activité de GPx. Tandis que NPs d'oxyde de zinc et les NPs d'or diminuent de façon significative l'activité de GP_x en 2 semaines.

✓ **Effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur l'activité de l'acétyl choline estérase**

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé présente dans le système nerveux centrale et dans le sang. Les nanoparticules manufacturées peuvent être toxiques par des interactions avec des protéines et des enzymes.

Une étude réalisée par **Wang et al., (2009)** trouve que huit nanoparticules: SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, Al, Cu, Cu-C (cuivre recouvert de carbone), les nanotubes de carbone à parois multiples et des nanotubes de carbone à paroi simple inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase, l'inhibition de l'acétylcholinestérase est principalement provoquée par les ions dissous, mais surtout par adsorption du charbon actif.

✓ **Effet sur l'activité de superoxyde dismutase SOD**

L'activité des enzymes SOD a été diminuée nettement chez les lapins traités par les deux doses des nanoparticules Fe₃O₄, ce qui a induit une paralysie totale dans l'état défensif résultant d'une augmentation de la quantité des ROS et ces résultats étaient en désaccord avec les résultats de **Rouabhi et al. (2008)** et **Rouabhi et al. (2015)**.

IV-4- Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur le gonflement mitochondrial, la perméabilité membranaire et la respiration cellulaire

SPIONs sont distribués à divers organes et tissus tels que le colon, les poumons, la moelle osseuse, le foie, la rate et les vaisseaux lymphatiques (**Fabian et al., 2008**) et le système nerveux centrale (**lei et al., 2013**). La biodistribution finale typique de SPIONs est de 80% -90% dans le foie, 5% à 8% dans la rate et 1% -2% dans la moelle osseuse. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules telles que la taille, la morphologie de surface et la charge de surface, pourrait influencer leurs distributions tissulaires. Après absorption cellulaire, le Fe₃O₄ se trouve couramment dans les endosomes et les lysosomes où ils se décomposent en fer libre, qui est lentement libéré dans le cytoplasme (**Cedervall et al., 2007**).

Les nanoparticules d'oxyde de fer peut vraisemblablement être dégradé en ions de fer dans les lysosomes. Cette «fer libre» peut potentiellement traverser la membrane nucléaire ou mitochondrial et dans ce dernier cas, le fer libre sous la forme d'ions ferreux (Fe⁺²) peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène produit par les mitochondries et produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs et des ions ferriques (Fe⁺³) par la réaction de Fenton. Les radicaux hydroxyle OH[•] générée pourrait indirectement endommager les protéines et le malondialdéhyde (**Singha et al., 2010**).

En plus de la réaction de Fenton, des dommages structurels aux ATP mitochondries générant par la surcharge en fer, pourrait donner lieu à un

dysfonctionnement des mitochondries tels que la modification de potentiel membranaire, libération du cytochrome C, la production et découplage de la phosphorylation oxydative (**Hiura et al., 2000; Upadhyay et al., 2003**).

Des études réalisés par **Wang et al., 2008**, trouve que les nanoparticules d'oxyde de titane altèrent les fonctions mitochondriale de cerveau des souris et des rat.

Le gonflement a été évalué par l'augmentation de l'absorbance à 540 nm. Dans la présente étude les NPs a déclenché le gonflement des mitochondries en fonction de temps et il est dépendant de la dose.

Des études réalisés par **Li et al., 2012**, suggèrent que les nanoparticules d'oxyde de zinc induite la perméabilité mitochondrial aux protons cette perméabilité peut être due à l'augmentation de la conductance K⁺ de membrane interne, conduisant l'acidification intracellulaire, déclenchant le gonflement mitochondrial, causant des dommages énergétique mitochondriaux et même conduire à la mort cellulaire apoptotique.

Les nanoparticules ZnO ont augmenté la production de ROS dans les mitochondries et amélioré l'initiation de la peroxydation lipidique, En raison de la production des ERO, les Nps de ZnO augmentent la perméabilité de la membrane interne et altérer la chaîne respiratoire, ou le cycle de l'acide tricarboxylique conduisant ainsi à la dissipation l'énergie, le stress oxydatif et même l'apoptose (**Li et al., 2012**).

Il est généralement admis que la libération de cytochrome C mitochondrial dans l'espace intermembranaire à cytosol est l'un des facteurs apoptotique. Pour confirmer que ZnO induit l'apoptose, la libération du cytochrome c a été détectée. dans l'absence de ZnO, seule une petite quantité de cytochrome c est libérée par les mitochondries, probablement à cause des dommages mécaniques dans le processus d'isolement. Dans les conditions expérimentales, une grande quantité du cytochrome c a été libéré de l'organite indépendant de concentrations des nanoparticules ZnO (**Li et al., 2012**).

IV-5- Effet sur les paramètres d'apoptose et d'inflammation

Caspase-3 est une protéine caspase qui interagit avec caspase-8 et caspase-9. Il est codé par le gène CASP3. Les orthologues CASP3 ont été identifiés dans les mammifères pour lesquels des données complètes sur le génome sont disponibles. La protéine CASP3 est un membre de la protéine cystéine- La protéase de l'acide aspartique (caspase) (**Rouabhi et al., 2006; Alnemri et al., 1996**). L'activation des caspases joue un rôle essentiel dans la phase d'apoptose cellulaire. Les caspases existent comme proenzymes inactifs qui subissent un traitement protéolytique ont servi des résidus aspartiques pour produire deux sous-unités. Cette protéine clive et active les caspases 6 et 7; et la protéine elle-même est traitée et activée par les caspases 8, 9 et 10. C'est la caspase prédominante impliquée dans le clivage de la protéine amyloïde-bêta 4A précurseur, qui est associé à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer.

La caspase-3 est activée dans la cellule apoptotique à la fois par pathologies extrinsèque (ligand de mort) et intrinsèque (mitochondriale) (**Salvesen, 2002 ; Ghavami et al., 2009**). L'activité caspase tue les cellules indistinctement (**Boatright et Salvesen, 2003**). Un niveau croissant de ROS induit une élévation significative du niveau de caspase-3 qui a induit un état apoptotique dans les neurones, ce résultat est confirmé par la quantité de TNF- α qui stimule l'activation de caspase-3 et la voie apoptotique, ceci est confirmé par le travail de **Zhao et al., (2001)** et **Utaiincharoen et al., (2000)**. TNF- α avec TNFR qui stimulent et activent NF- κ B par L'inhibition d'une protéine: I κ B α , qui se lie normalement à NF- κ B et inhibe sa translocation, et phosphorylée par IKK et ensuite dégradée, libérant NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription hétérodimère qui transocaiser au noyau et médiation de la transcription d'une vaste gamme des protéines impliquées dans la réponse pro-apoptotique. Un état de stress oxydatif élevé suivi d'une apoptose confirmée par un gonflement mitochondrial élevé et la perméabilité, qui nous font penser à la diffusion du cytochrome B sur le cytoplasme neuronal en raison de la perméabilité élevée, suivie par impact des NP Fe₃O₄ sur le cortex cérébral d' *Oryctolagus cuniculus*, ces résultats sont En concordance avec les résultats de **Yang et al., (2006)** et **Zhang et al.,(2011)**. Cette inflammation et la mort cellulaire conduit à la maladie neurodégénérative comme Alzheimer.

IV-6-Effet protecteur de Sélénium

Le Se joue un rôle fondamental en tant que cofacteur biologique de la glutathion peroxydase dans la lutte contre les radicaux libres. Le Sélénium, le glutathion GSH et la vitamine E sont capables de piéger et de neutraliser la plupart des radicaux libres et leurs effets toxiques. Chez l'homme, le Se sous forme de sélénocystéine constitue le site actif de la glutathion peroxydase. C'est pour l'instant le seul rôle indiscutable attribuable au Se chez l'homme, cependant seulement 33 % à 40 % du Se est sous forme glutathion peroxydase. Divers travaux ont suggéré le rôle des dérivés activés de l'oxygène (les radicaux libres) dans de nombreux processus pathologiques notamment l'athérogenèse et la cancérogenèse, et l'effet préventif éventuel de composés antioxydants tels que le sélénium contre la production des radicaux libres responsable d'attaques au niveau de structures essentielles comme l'ADN et les membranes cellulaires. (**Duvoid, 1999**). Une étude réalisé par Banni et *al.*, 2011, trouve que l'administration de Se et s'inverser la toxicité induite par Cd dans le foie et l'ovaire (**Banni et al., 2011**).

Conclusions et perspectives

Conclusion Générale et perspectives

Les nanoparticules (NPs) mesurent entre 1 et 100 nm. Leur taille nanométrique leur confère des propriétés nouvelles particulièrement intéressantes pour les industriels et les scientifiques.

Les nanoparticules d'oxyde de fer, dont leur forte réactivité et leur propension à diffuser à travers les membranes biologiques du fait de leur très petite taille, elles pourraient ainsi arriver jusqu'à le système nerveux central et occasionner un dysfonctionnement des composants cellulaires majeurs.

Le présent travail, que nous avons mené est consacré à l'étude de l'effet des nanoparticules d'oxyde de fer à des doses croissantes pendant des périodes de traitement différentes sur les métabolites encéphaliques tels que les glucides, les lipides et les protéines, sur les paramètres de stress oxydant soit non enzymatiques tels que le GSH et le MDA et enzymatiques (GPx, GST, CAT, SOD et caspase-3), et sur l'activité de L'acétylcholine-estérase aux niveau cytosolique et mitochondriale chez les lapins de la race *Oryctolagus cuniculus*. Notre objectif était de savoir si la supplémentation du sélénium sous la forme de sélénite de sodium a un effet protecteur contre les effets néfastes des nanoparticules.

A la lumière de nos résultats obtenus on peut conclure que:

-l'administration des nanoparticules d'oxyde de fer par voie orale chez les lapins *Oryctolagus cuniculus* induit une perturbation au niveau des métabolites encéphaliques, par une augmentation des taux des glucides et des protéines, et une diminution de taux des lipides par rapport au lot témoin, tandis que l'addition de Sélénium corrige ces changements.

-une meilleure caractérisation de la neurotoxicité des nanoparticules à travers le dosage de GSH, MDA, GPx, CAT, GST aux niveau de cerveau et de cervelet qui est expliqué par une déplétion du système de détoxification à glutathion, une augmentation de l'activité de GST, de CAT et une diminution de l'activité de GPx et de l'acétylcholine-estérase, aussi une augmentation du marqueur de peroxydation lipidique (MDA). Au contraire, l'ajout de sélénium corrige ses remaniements.

Les nanoparticules aussi peuvent agir au niveau des organites subcellulaire tels que les mitochondries de cortex cérébral et de cervelet, Elles induisent une augmentation de taux de MDA, une diminution de taux de GSH et de l'activité de GPx, un gonflement et une grande perméabilité mitochondriale. Ces pathologies mitochondriales sont corrigées par l'addition de sélénium.

-une meilleure caractérisation de la neurotoxicité des nanoparticules d'oxyde de fer à courte durée au niveau mitochondriale qui est expliquée par une diminution de taux de GSH, une diminution de taux des MDA, et de l'activité de quelques enzymes : GST, GPx, CAT et SOD.

Aussi on a remarqué une augmentation de TNF- α et l'activité de caspase-3. Un gonflement mitochondriale, une perméabilité mitochondriale et une diminution de respiration cellulaire sont mieux envisageables.

Enfin, on peut confirmer que les nanoparticules d'oxyde de fer ont des effets toxiques au niveau encéphalique, à raison de leurs effets sur la fonction métabolique, sur les paramètres biochimiques et enzymatiques, notant que le traitement par le sélénium corrige les effets néfastes des NPs. Ceci est expliqué par le pouvoir antioxydant de sélénium à réduire le stress oxydant.

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

-l'étude de la génotoxicité des nanoparticules

-L'étude histopathologique.

-la quantification des cytochromes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Amadoules N. 1990.** Organes thoraciques du lapin domestique, Anatomie descriptive et topographique. Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, l'Université Dakar.
- Aoun H., Marghadi A. 2013.** Effets de vitamines E et D sur l'hématotoxicité par le cadmium chez les lapin.
- Alnemri E. S. et al. 1996.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Apopa P.L, ong QianY., ong ShaoR. GuoN.L., Schwegler-Berry D, PacurariI, Dale Porter M., ShiX, VallyathanV., incent Castranova V. et Flynn D.C. 2009.** Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and Fibre Toxicology*, 6:1.
- Aruojaa V., Dubourguiera H.C., Kasemets K., KahruA. 2009.** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *science of the total environment* 407, 1461–1468.

B

- Banni M., Chouchene L., Said K., Kerkeni A. et Messaoudi I. 2011.** Mechanisms underlying the protective effect of zinc and selenium against cadmium-induced oxidative stress in zebrafish *Danio rerio*. *Biometals* 24:981–992.
- Begley D.J. 1996.** The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system; *Pharm.Pharmacol.* 48, pp: 136-146.
- Berry, C.C., Wells, S., Charles, S., Aitchison, G. et Curtis, A.S.C. 2003.** Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25): 4551-4557.

-**Berry C.C., Wells S., Charles S., Aitchiso, G. et Curtis A.S.C., 2004** (b). Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, 25(23): 5405-5413.

-**Boatright K. M. et Salvesen G. S. 2003**. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 725-731

-**Boczkowski J., Lanone S. 2010**. Nanoparticules : une prévention est-elle possible ? *Revue française d'allergologie* 50, 214–216.

-**Burch W.M. 2002**. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans; 106, pp: 141-142.

-**Bradford M. 1976**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding, *Anal. Biochem* 72, pp: 248-254.

-**Bradley T., Lightpool T. et Mayer G. 2009**. comprendre le comportement de NAC oiseaux, reptiles et petits mammifères, Masson, pp: 30-40.

C

-**Cakmak E.T. et Horst. 1991**. Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*); *Physiologia plantarum*; 83, pp: 463-468.

-**Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K.A. et Linse S. 2007**. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 2050.

-**Chomoucka J., Drbohlavova J., Huskab D., Adam V., Kizek R., Hubaleka J. 2010**. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering, *Pharmacological Research* 62, 144–149.

-**Chuto G., Chaumet-Riffaud P. 2010**. Les nanoparticules, *Médecine Nucléaire* 34 (2010) 370–376.

D

-**De Lorenzo A.J.D. 1970.** The olfactory neuron and blood-brain barrier, In taste and smell in vertebrates, pp: 151-176.

-**Debbage P. et Jaschke W. 2008.** Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors, Histochem Cell Biol 130: 845–875.

-**Draper H.H. et Hadley. 1990.** Molandialdehyde determination as index of lipid peroxydation. Meth.Enzymol.186,241-431.

-**Drogoul C., Gadoud R. et Jussiou R.. 2004.** nutrition et alimentation des animaux d'élevage; Ed: Educagri; pp: 50-52.

-**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Robers P.A. et Smah F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances; Analytical Chemistry 28, pp:350-356.

-**Duvoid I. 1999.** Le Sélénium, un élément essentiel parfois redoutable ou le rapport bénéfique/risque du sélénium. Rapport de recherche bibliographique. Ecole Nationale Supérieure Sciences de l'Information et des Bibliothèques Université des Claude Bernard Lyon I.

E

-**Elder A., Gelein R., Silva V., Feikert T., Opanashuk L., Carter J., Potter R., Maynard A., Ito Y., Finkelstein J. et Oberdorster G. 2006.** Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system; Environ. Health Perspect.; 114; PP: 1172-1178.

-**Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Featherstone R.M. 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

-**Florin P., François-Xavier L., Frédéric D.. 2008.** Nanoparticules : structures, utilisations et effets sur la santé, Presse Med 37: 1431–1437.

-**Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. et Jungens G. 1992.** The role of lipid peroxydation and antioxydants in oxydative modification of LDL. *Free radic. Biol. Med.* Pp 13,341.

F

-**Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W. et Ravenzwaay V.B. 2008.** Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats , *Arch. Toxicol.*, 82, 151.

-**Feng X., Chen A., Zhang Y., Wang J., Shao L., Wei L. 2015.** Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles *International Journal of Nanomedicine*:10, 4321–4340

-**Ferrat L., Pergent martini C. et Roméo M. 2003.** Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality : application to sea grasses. *Aquatic. Toxicol.* 65: 187-207.

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

G

-**Ghasemian E., Naghoni A. , Tabaraie B., Tabaraie T. 2012.** In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry andagar dilution method, *Journal de MycologieMédicale* 22, 322—328.

-**Ghavami S. et al. 2009.**Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 46, 497-510

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

-**Greco F., Courbie B., Rose J., Orsière T., Sari-Minodier I., Bottero J- Y., Auffan M., Perrin J. 2014.** Toxicity of nanoparticles on reproduction, *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 43, 49–55.

H

-**Habig W.H., Pbst M.J. et Jacobi W.B. 1974.** The first enzymatic step in mercapturic acid formation; J.Biol. Chem. 249, 7130-7139.

-**Halliwell B. et Chirico S. 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. The American journal of clinical nutrition. 57,715-724.

-**Hiura T.S., Li N., Kaplan R., Horwitz M., Seagrave J.C., Nel A.E. 2000.** The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. J Immunol; 165: 2703-2711.

-**Howden P.J. et Faux S.P. 1996.** Fibre induced lipid peroxidation leads to DNA adduct formation in *Salmonella typhimurium* TA104 and rat lung fibroblasts, Carcinogenesis, vol. 17, no. 3, 413-419.

-**Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T. and Schlager, J.J. 2005.** In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro, 19(7): 975.

IETJ

-**INRS, fiche toxicologique n° 150, Sélénium et composés minéraux, Paris. 2011.** 10 pages.

-**Jaeschke H. 1995.** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 209, 104-111.

- **Jain Marco T. K. , Torres M. , SahooS. K. , Leslie-Pelecky D. , Labhasetwar V. 2005.** Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents . *Diandra Leslie-Pelecky Publications*. Paper 2.

-**Jeon Y.M., Park S.K. et Lee M.Y. 2011.** Toxicoproteomic identification of TiO₂ nanoparticle-induced protein expression changes in mouse brain. Anim Cells Syst 15(2):107-114.

-**Josiane A., Nathalie A., Roussel A.M., Sandrine B., Daniel R., Pilar G., Alain F. et Serge H. 2007.** Relationships between selenium, lipids, iron status and hormonal therapy in women of the SU.V1.M.AX cohort. *Journal of traces elements in medicine and biology* 21 S1. 66-69.

K.

-**Kakkar, P., Das, B. et Viswanathan, P. 1984.** A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 21, 130-132

-**knaapen A.M., Borm P.J.A., Albrecht C. et Schins R.P.F. 2004.** Inhaled particles and lung cancer, part A : mechanisms ; *International Journal of Cancer*, vol. 109, no. 6, 799-809.

-**Kramer H.J., Gonick H. C. et Lu E. 1986.** In vitro inhibition of $Na^+ -K^+$ ATP-ase by trace metals; relation to renal and cardiovascular damage; *Nephron* 44, 329-336.

-**Kristal B.; Park B. et Yu B.P. 1996.** 4-Hydroxyhexenal Is a Potent Inducer of the Mitochondrial Permeability Transition, *Journal of Biological Chemistry, The Journal of Biological Chemistry.* 271, 6033-6038.

L.

-**Lacava L.M., Lacava Z.G.M., Azevedo R.B., Chaves S.B., Garcia V.A.P., Silva, O., Pelegrini F., Buske N., Gansau C., Da Silva M.F. et Morais P.C. 2002.** Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252: 367.

- **Lanone S. et Boczkowski J. 2010.** Les sources de nanoparticules, *Revue française d'allergologie* 50, 211–213.

-**Leonard S. S., Sabolsky E.M., etNurkiewiczT.R. 2015.** Intravenous and Gastric Cerium Dioxide Nanoparticle Exposure Disrupts MicrovascularSmooth Muscle Signalin, *Toxicological Sciences* 144(1), 77–89.

-**Lei L., Ling-Ling J., Yun Z., et Gang L. 2013.** Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Researchstrategies and implications for nanomedicine; *Chin. Phys. B* Vol. 22, No. 12 ,127503.

-**Li J.H., Liu X.R., Zhang Y., Tian F.F., Zhao J.Y., Yu Q.L.Y., Jiang F.L. et Lium Y. 2012.** Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. *Toxicol. Res.*, 1, 137.

-**Lebas F. 2006.** La Biologie du lapin.

-**Lissot G. 1974.** l'élevage moderne du lapin: familial, commercial, industriel, et 94 consultations utiles. Paris, pp: 31-36

-**Lobert J.L.R. 1832.** Traité de oiseaux de basse-cour et du lapin domestique. Ed Audot libraire-éditeur; pp: 227-230.

-**Lu J. et Holmgrn A. 2013.** The thioredoxin antioxidant system; *Free Radic. Biol. Med.* Doi: 10.1016. 66 (2014) 75–87.

M

-**Maafa H., Merzouk K. 2015.** La neurotoxicité induite par les nanoparticules manufacturées chez un bio indicateur de pollution : *Helix aspersa*. Mémoire de Master en Sciences Biologiques.

-**Massaad C.A. et Klann E. 2011.** Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memery; *Antioxid. Redox Signal*; 14; 2013-2054.

-**Manke A, Wang L. et Rojanasakul1 Y. 2013 .** Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. Volume 2013, Article ID 942916, 15 pages.

-**Meunier S. 2014.** Etude in VIVO du Ciblage Diagnostique et Thérapeutique des Tumeurs Endocrines du Pancréas chez la Souris SwissNude Par Des Nanoparticules d'Oxyde de FER Supermagnétiques Vectorisées par un Analogue de la Gastrine (MG-

IONP-DY647), Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

-Miquel-Jeanjean C. M., Crépel F., Raufast V., Payre B., Datas L, Bessou-Touya S., Duplan H et Minarchick V. C. 2012. Penetration Study of Formulated Nanosized Titanium Dioxide in Models of Damaged and Sun-Irradiated Skins, *Photochemistry and Photobiology* Volume 88, Issue 6, 1513–1521.

-Monteiro J., Oliveira P., Moreno A. et Jurado A. 2008. *Chemosphere* , 72, 1347–1354. Cité par Li J.H., Liu X.R., Zhang Y., Tian F.F., Zhao J.Y., Yu Q.L.Y., Jiang F.L. et Lium Y.; 2012; Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. *Toxicol. Res.*, 1, 137.

-Morin D., Zini R., Tillemont S. P. et 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

N

-Naqvi S., Samim M., Abdin M., Jalees A.F., Maitra A.N., Prashant C.K. et Dinda A. K. 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress; *International Journal of Nanomedicine*: 5 983–989

-Negahdary M., Chelongar R., Zadeh S.K., and Ajdary M. 2015. The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in in vivo condition *Adv Biomed Res.* 2015; 4: 69.

O

-Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W. et Cox C. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain; *Inhal. Toxicol.*, 16, 437-445.

-Ouhayoun J. et Cheriet S. 1983. Valorisation comparée d'aliments à niveaux protéiques différents par des lapins sélectionnés sur la vitesse de croissance et par des lapins provenant d'élevages traditionnels; Ann.Zootech. 32 (3), 257-276.

P

-Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., et Jahnen-Dechent W. 2007. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, small 3, No. 11, 1941 – 1949.

-Pereira-Garcia M., Miranda Parca R., Braun Chaves S., Paulino Silva L., Djalma Santos A., Guerrero Marques Lacava Z., Cesar Morais P. et Azevedo, R.B. 2005. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with DMSA. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293(1): 277-282.

-Pisanic Ii, T.R., Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Finones, R.R. et Jin, S. 2007. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. Biomaterials, 28(16): 2572.

-Poissonnet S. 2004. Principales maladies du lapin, du cobaye, du chinchilla, du hamster et du rat de compagnie, thèse de doctorat vétérinaire à école nationale vétérinaire d'Alfort.

-Pon L. A. et Schon E. A. 2007. Mitochondria, Academic Press,. Cité par Li J.H., Liu X.R., Zhang Y., Tian F.F., Zhao J.Y., Yu Q.L.Y., Jiang F.L. et Lium Y.; 2012;Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. Toxicol. Res., 1, 137.

-Quinton J.F. 2003. Atlas des nouveaux animaux de compagnie, Ed Masson ps: 57-69, 78.

-Quinton J.F. 2009. Atlas des nouveaux animaux de compagnie, Ed Masson pp: 43-44.

-Radermecker R.P. , Philips J.C., Jandrain B.J., Paquot N. , Lefèbvre P.J. , Scheen A.J. 2008 . Le cerveau, un organe gluco-dépendant, Effets délétères de l'hypoglycémie et de l'hyperglycémie. Rev Med Liege; 63 : 5-6 : 280-286.

-Radi F. Beckman J.S Busch K.N et Freeman B.A. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulhydryls .the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide .J.Biol.Chem. 266, 4244-4250.

-Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxydants, and cofactors, Clinical Interventions in Aging, vol. 02, no. 02, 219-236.

-Redhouane- Salah S. 2004. Effets des rejets métalliques des acières du complexe sidérurgique d'Elhadjar d'annaba sur un modèle cellulaire marin: *tetra selmis suecica* ; Science et technologie; 121-124.

-Ricchelli F., Gobbo S., Moreno G. and Salet C. 1999. Biochemistry, 38, 9295–9300. Cité par Li J.H., Liu X.R., Zhang Y., Tian F.F., Zhao J.Y., Yu Q.L.Y., Jiang F.L. et Lium Y.; 2012;Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. Toxicol. Res., 1, 137.

-Rouabhi R., Djebbar- Berrabbah H. et Djabar M.R. 2006. Toxic effet of pesticide, dislubenzuron on fresh water microinvertibrate (*Tetrahymena Pyriformis*). Chin.J.Appel.environ.biol. 12 : 514-517.

-Rouabhi R., Gasmi S., Boussekine S. et Kebieche M. 2015. Hepatic Oxidative Stress Induced by Zinc and Opposite Effect of Selenium in *Oryctolagus cuniculus*. J. Environ. Anal. Toxicol. 5, 289.

-Rouabhi R., Djebbar-Berrebbah H. & Djebbar M. R. 2008. Impact of Flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development *in ovo*. J. Cell Anim. Biol. 2, 87-91.

-Rouabhi R., Djebbar-Berrebbah H. and Djebbar M. R. 2006. Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Macroinvertibrate (*Tetrahymena pyriformis*). Chinese J. Appl. Environ. Biol. 12, 514-517.

- Sadeghiani N., Barbosa L.S., Silva L.P., Azevedo R.B., Morais P.C. et Lacava Z.G.M. 2005.** Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289: 466.
- Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, et al. 2010.** Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *ToxicolSci* 115(1):156–66.
- Sahoo S.K., Parveen S., Panda J.J. 2007.** The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3, 20–31.
- Salvesen G. S. 2002.** Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.* 9, 3-5 .
- Sanjenbam P., Gopal J.V., Kannabiran K. 2014.** Anticandidal activity of silver nanoparticlessynthesized using *Streptomyces sp.*VITPK1, *Journal de MycologieMédicale* 24, 211—219.
- Sauzedde F., ElaõÈssari A., Pichot C. 1999.** Hydrophilic magnetic polymer latexes. 1. Adsorption of magnetic iron oxide nanoparticles onto various cationic latexes *Colloid,PolymSci* 277:846-855 .
- Sebekova K., Dusinska M., Klenovics K.S., Kollarova R., Boor P., Kebis A.et al. 2014.** Comprehensive assessment of nephrotoxicity of intravenously administered sodium-oleate-coated ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in rats *Nanotoxicology*, 8(2):142–157.
- Sharma H.S., Sharma A. 2007.** Nanoparticles aggravate heat stress induced cognitive deficits, blood-brain barrier disruption, edema formation and brain pathology; *Prog. Brain Res.*; 162, 245-273.

-Sheehan D., Meade G., Foley V.-M. et Dowd C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non mammalian members of an ancient enzyme superfamily . *Biochem. J.* 360, 1-16

-Shukla R.K., Sharma V., Pandey A.K., Singh S., Sultana S. et Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 01, 231-241.

-Silva R. M., Anderson D. S., Franzi L. M., Peake J. L., Edwards P. C., Van Winkle S., et Pinkerton K. E. 2015. Pulmonary Effects of Silver Nanoparticle Size, Coating, and Dose over Time upon Intratracheal Instillation, *Toxicological Sciences* , 144(1), 151–162

-Singha N., Jenkinsa G.J.S. , Asadib R. et Doak S.H. 2010. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1: 5358, 53-58.

-Song B., Zhang Y.L., Liu J., Feng X.L., Zhou T. et Shao L.Q. 2016. Neurotoxicity of Metallic Nanoparticles the Cascades of Oxidative Stress?, *Nanoscale Research Letters* 11:291, DOI 10.1186/s11671-016-1508-4

-Stambe C., Atkins R.C., Tesch G.H., Masaki T. Schreiner G.F. et Nikolic-Paterson D.J. 2004. The role of 38alpha mitogenactivated protein kinase activation in renal fibrosis, *Journal of American Society of Nephrology*, vol. 15, no 02, : 370-379.

-Stanley B.A., Sivakumaran V., Shi S., Mcdonald I., Liyod D., Watson W.H., Aon M.A. et Paocci N. 2011. Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H₂O₂ emission from isolated heart mitochondria; *J.Biol.Chem.*; 286, 33669-33677.

T

-Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P. et Heyder J. 2001. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats; *Environ. Health Perspect.* 109, 547-551.

-Tallkvist J., Henriksson J. Argy R. et Tjalve H. 1998. Transport and subcellular distribution of nickel in the olfactory system of pikes and rats. *Toxicol. Sci.*; 43, 196-203.

- Thorek D.L.J., Chen A.K., Czupryna J. et Tsourkas A. 2006. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging , *Biomedical Engineering Society*

-Turski M.L. et Thiele D.J. 2009. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 02, 717-721.

V

-Upadhyay D., Panduri V., Ghio A., Kamp D.W. 2003. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 180-187.

-Utainsincharoen P., Tanghawornchaikul N., Ubol S., Chaisuriya P. and Sirisinha S. 2000. TNF-alpha induces caspase 3 (CPP 32) dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 31(Suppl. 1), 167-170.

V

-Volkovova K., Handy R.D., Staruchova M., Tulinska J., Kebis A., Pribojova J., Ulicna O., Kucharska J., Dusinska M. 2015. Health effects of selected nanoparticles in vivo: liver function and hepatotoxicity following intravenous injection of titanium dioxide and Na-oleate-coated iron oxide nanoparticles in rodents. *Nanotoxicology.* 2015 May;9 Suppl 1:95-105.

W

-Wang X., Yang L., Chen Z., Shin D. M. 2008. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging, *CA Cancer J Clin*;58:97–110

-Wang Z., Zhao J., Li F., Gao D., Xing B. 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, Volume 77, Issue 1, 67–73.

-Wang J.X., Chen C.Y., Liu Y., Jiao F., Li W., Lao F. et al. 2008. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett* 183(1-3):72–80.

-Weckbreker G. et Cory J.G. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro; *Cancer letters*; 40, 257-264.

-Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J.N., Bacri, J.C. and Gazeau, F. 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6): 1001.

Z

-Yang S., Thor A. D., Edgerton S. and Yang X. 2006. Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF- α induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 1987-1997.

-Zhang G. et al. 2011. Hydroxycamptothecin-Loaded Fe₃O₄ Nanoparticles Induce Human Lung Cancer Cell Apoptosis through Caspase-8 Pathway Activation and Disrupt Tight Junctions. *Cancer Sci.* 102, 1216-1222.

-Zhang S.P., Liu X.Z., Lu H., Mei L., et Liu Z.P. 2009. Lipid peroxidation and ultrastructural modifications in brain after perinatal exposure to lead and/or cadmium in rat. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22: 423-429.

-Zhao X. et al. 2001. TNF- α stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* 64, 121-131.

-Zhua M.T., Fenga W. Y., Wanga B., Wang T.Ch., Guc Y.Q., Wang M., Wang Y., Ouyanga H., Zhaoa Y.L., ChaiaZ.F. 2008. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats, *Toxicology xxx, xxx–xxx* presse.

Annexe :

Production scientifique et communications:

Publication internationales

- **Taib Chahinez**^{1*}, Rouabhi Rachid, Gasmi Salim, Bakhouché L., Zarai G., Toualbia N., Salmi A., Henine S., Chenikher H., Boussekine S., Kebieche M., Aouimeur M. & Djabri B. 2016. Toxicity of Fe₃O₄ Nanoparticles on Oxidative Stress Status, Stromal Enzymes and Mitochondrial Respiration and Swelling of *Oryctolagus cuniculus* Brain Cortex. Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 8(5), 349-355.
- Henine Sara, rouabhi Rachid, Gasmi S., Amrouche Aml, Abid Anna, Salmi Aya, **Taib C.**, et al. 2016. oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 8(5), 161-167.
- Salmi Aya, Rouabhi R., toualbia N., Chenikher H., **Taib C.** et Gasmi S. 2017. Subcellular study of the cadmium selenidenanoparticules toxicity on a terrestrial bioindicator modèle *Hélix aspersa*. Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 9(2), 135-140.

Communications internationales

- **Taib Chahinez**, Rouabhi Rachid, Toualbia N., Gasmi S., Salmi A. et Chenikher H., Effet des nanoparticules Fe₃O₄ sur les mitochondries de cerveau chez les lapins *Oryctolagus cuniculus*. Association tunisienne des sciences biologiques, mars 2017.

Communication nationales

- **Taib Chahinez**, Rouabhi Rachid, Henine S., Gasmi S., Toualbia N., Salmi A. et Chenikhar H. Effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur les marqueurs biologiques chez les lapins *Oryctolagus*

cuniculus. Journées nationales de biotechnologie Mostaganem, Avril 2017.

- **Taib Chahinez** , rouabhi Rachid, toualbia N., Salmi A., Gasmi S., Chenikhar H., Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer sur le cerveau des lapins *Oryctolagus cuniculus*. Séminaire nationale santé et stress oxydant, Tébessa, Novembre 2016.

Tableau 1: Taux des métabolites encéphaliques chez les lapins témoins et traités après 90 jours.

Taux des métabolites	Témoin	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se
Glucides de cerveau (µg/ml)	10.128± 0.892134519	10.3164± 0.831779298	10.4608± 0.718344764	10.1632± 0.440421616	10.2176± 0.772205154
Glucides de cervelet (µg/ml)	8.432± 0.347977011	9.3664± 0.284782022	10.6992± 0.397657139	8.5472± 0.609093753	8.62± 0.145942454
Lipides de cerveau (µg/µl)	186.816± 1.436551426	174.2± 13.0784709	156.336± 3.089414184 P 0.000	182.248± 1.907752605	165.856± 1.923455224
Lipides de cervelet (µg/µl)	191.208± 1.632519525	167.492± 3.406687541	158.736± 1.632568528 P 0.000	186.88± 1.877445072	186.77± 1.615821772
Protéines de cerveau (mg/ml)	1.9908± 0.033708233	2.16452± 0.046135745	2.27196± 0.088677917	2.09368± 0.046002141	2.12794± 0.04809447
Protéines de cervelet (mg/ml)	1.93138± 0.033313616	2.1028± 0.074926364	2.20112± 0.071201243	1.96566± 0.036136934	2.03424± 0.082435387

Tableau 02: Taux des paramètres de stress oxydant non enzymatiques après traitement pendant 90 jours.

Taux des paramètres non enzymatiques	Témoin	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se
GSH de cerveau (µmole/mg prot)	9.04E-06± 1.32944E-07	8.08E-06± 7.95459E-08	7.30E-06± 3.77695E-08	8.47E-06± 4.32955E-08	8.35E-06± 6.00859E-08
GSH de cervelet (µmole/mg prot)	9.21E-06± 1.16041E-07	8.27E-06± 5.39622E-08	7.53E-06± 2.54336E-08	8.93E-06± 7.14693E-08	8.67E-06± 7.2531E-08
GSH mitochondrial de cerveau (µmole/mg prot)	6.1064E-06± 2.16226E-08	4.61109E-06± 1.90397E-08	2.87655E-06± 2.88546E-08	6.09593E-06± 1.02068E-08	6.07788E-06± 1.65402E-08
GSH mitochondrial de cervelet (µmole/mg prot)	6.12445E-06± 3.04263E-08	4.56685E-06± 2.48145E-08	2.96851E-06± 4.94324E-08	6.09069E-06± 7.53314E-09	6.08952E-06± 9.1107E-09
Taux des MDA de cervelet (µmole/mg prot)	13.60222701 ± 0.668133029	15.67963221 ± 0.589305687	17.18537592 ± 0.792552939	13.94648724 ± 0.93152776	14.54777106 ±1.01642126 1
Taux des MDA de cerveau (µmole/mg prot)	12.64919468 ±0.92793770 9	13.77830507 ± 0.73844919	15.98520264 ± 1.860097066	13.00608831 ± 0.98714093	13.54695588 ± 0.678911118
Taux des MDA mitochondriale de cerveau (µmole/mg prot)	58.215± 1.31004	61.8± 7.65123	68.85± 4.651421	59.1± 8.703121	60.45± 8.110012
Taux des MDA mitochondriale de cervelet (µmole/mg prot)	34.98± 3.65125431	37.59± 3.6612410	43.63± 1.301241	37.02± 4.491254	37.19± 3.742514

Tableau 03: activité enzymatique de GST, CAT, GPx et AChE cytosoliques après traitement pendant 90 jours.

paramètres enzymatiques	Témoin	Dose 75 $\mu\text{g/kg/jour}$ (Fe_3O_4)	Dose 150 $\mu\text{g/kg/jour}$ (Fe_3O_4)	Dose 75 $\mu\text{g/kg/jour}$ (Fe_3O_4) + Se	Dose 150 $\mu\text{g/kg/jour}$ (Fe_3O_4) + Se
GST de cerveau (mmole/min/mg des protéines)	0.001225921 ± 0.000109575	0.001423526 ± 0.00025065	0.001825441 ± 0.000278229	0.001264952 ± 0.000179163	0.001315841 ± 0.00014482
GST de cervelet (mmole/min/mg des protéines)	0.00138709 ± 0.000111659	0.001487103 $\pm 2.72592\text{E-}05$	0.001770833 $\pm 8.16676\text{E-}05$	0.001459396 ± 0.000124219	0.001569171 ± 0.000307012
CAT de cerveau ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	0.047487437 ± 0.022707091	0.050943396 ± 0.00814448	0.068303571 ± 0.009932409	0.048803828 ± 0.006004737	0.055188679 ± 0.009558436
CAT de cervelet ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	0.09120603 ± 0.015401621	0.101179245 ± 0.00814448	0.113839286 ± 0.014006585	0.092583732 ± 0.012788418	0.096933962 ± 0.004746371
GPx de cervelet ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	0.196924438 ± 0.004980935	0.184602348 ± 0.001045155	0.16678333 ± 0.060426168	0.190737824 ± 0.007253419	0.188684442 ± 0.001218787
GPx de cerveau ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	0.227624065 ± 0.028296836	0.219709618 ± 0.026567833	0.210356731 ± 0.016319101	0.218937403 ± 0.026109175	0.220221126 ± 0.026837925
AChE de cerveau ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	7.09559E-07 $\pm 4.21112\text{E-}08$	4.76471E-07 $\pm 3.61717\text{E-}08$	0.000000475 $\pm 2.24235\text{E-}08$	6.07353E-07 $\pm 1.98666\text{E-}08$	5.58824E-07 $\pm 3.60219\text{E-}08$
AChE de cervelet ($\mu\text{mole/min/mg}$ des protéines)	5.84559E-07 $\pm 8.09826\text{E-}08$	4.66176E-07 $\pm 2.47173\text{E-}08$	4.45588E-07 $\pm 8.38364\text{E-}09$	5.05882E-07 $\pm 3.17967\text{E-}08$	4.55882E-07 $\pm 1.1626\text{E-}08$

Tableau 04: activité enzymatique de Gpx mitochondriale et les tailles des mitochondries après traitement pendant 90 jours.

paramètres enzymatiques et tailles des mitochondries	Témoin	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 75 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se	Dose 150 µg/kg/jour (Fe₃O₄) + Se
GPx mitochondriale de cerveau (µmole/min/mg des protéines)	0.25244898± 0.003873732	0.190333952± 0.00139979	0.143487941± 0.003674687	0.248608534± 0.001699133	0.244007421± 0.012048768
GPx mitochondriale de cervelet (µmole/min/mg des protéines)	±0.0209462 0.002370851	0.00929499± 0.002944739	0.0080705± 0.003052075	0.01376623± 0.004378931	0.013056 0.004937645±
DO proportionnelle aux tailles des mitochondries de cerveau	0.18192± 0.00113666	0.19382± 0.00269852	0.22356± 0.01739491	0.19314± 0.0029177	0.18076± 0.00390038
DO proportionnelle aux tailles des mitochondries de cervelet	0.17684± 0.00452416	0.18352± 0.00310274	0.20984± 0.01208938	0.17698± 0.0023658	0.18186± 0.00564163

Tableau 05: effet des nanoparticules d'oxyde de fer sur les paramètres enzymatiques et non enzymatiques sur le cortex cérébrale des lapins après traitement pendant 14 jours.

	Témoïn	Dose 200 µg/kg/jour (Fe₃O₄)	Dose 300 µg/kg/jour (Fe₃O₄)
MDA mitochondriale de cortex (µmole /mg des protéines)	60.73666667± 5.026400966	66.45± 1.535903643	84.56666667± 4.559678351
GSH mitochondriale de cortex (µmole/mg des protéines)	0.0000065± 0.000001	0.000006± 0.0000008	0.0000032± 0.0000004
Activité de GPx mitochondriale de cortex (µmole/min/mg des protéines)	0.241833333± 0.025646962	0.214733333± 0.014266978	0.157333333± 0.015667376
Activité de CAT mitochondriale de cortex cérébrale (µmole/min/mg des prot)	0.078± 0.01	0.081± 0.011	0.022± 0.005
Activité de GST de cortex cérébrale (µmole/min/mg des prot)	90.03701667± 0.108968811	60.12± 0.110634533	54.025± 0.113798067
SOD corticale (U/min)	7.421833333± 0.018808686	5.806± 0.03044339	4.010833333± 0.021460817
TNF-α (pg/ml)	20.50166667± 0.259416011	50.13833333± 0.251588288	53.21833333± 0.310059134
Caspase-3 (DO à 405nm)	0.080033333± 0.000979115	0.125133333± 0.000656252	0.186533333± 0.002302752
Taille des mitochondries de cortex cérébral	0.1801 ± 0.014939344	0.258183333 ± 0.011863122	0.314666667± 0.012055815

Toxicity of Fe₃O₄ Nanoparticles on Oxidative Stress Status, Stromal Enzymes and Mitochondrial Respiration and Swelling of *Oryctolagus cuniculus* Brain Cortex

Taib Chahinez¹, Rouabhi Rachid¹, Gasmi Salim¹, Bakhouche Lamia¹, Zarai Ghozala¹, Toualbia Nadjiba¹, Salmi Aya¹, Henine Sara¹, Chenikher Hajer¹, Boussekine Samira¹, Kebieche Mohamed², Aouimeur Mariem³ & Djabri Belgacem¹

Keywords: Fe₃O₄, *Oryctolagus cuniculus*, Neurotoxicity, Mitochondrial swelling, Oxidative stress, Respiration, Nervous system, TNF- α , Caspase-3

¹Applied Biology department, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria

²Laboratory of pharmacology and phytochemistry, University of Jijel, Algeria

³Molecular and cellular biology department, Eloued University, 39000, Algeria

Correspondence and requests for materials should be addressed to R. Rouabhi (r_rouabhi@yahoo.fr)

Received 25 September 2016 / Received in revised form 1 November 2016

Accepted 7 November 2016

DOI 10.1007/s13530-016-0296-7

©The Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science and Springer 2016

pISSN : 2005-9752 / eISSN : 2233-7784

Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 8(5), 349-355, 2016

Introduction

Iron oxide nanoparticles are very interesting; they are used in cell labeling¹, drug targeting², gene delivery³, biosensors, hyperthermia therapy and as contrast agents in magnetic resonance imaging⁴⁻⁶. However, their biological reactivity can be enhanced and can lead to potential toxic interactions. Thus, (Zhu *et al.*, 2010)⁷ demonstrated that superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) generate injuries in endothelial cells and might play a key role in downstream cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension and myocardial infarction. Owing to their ultra-fine sizes, ION can elicit a spectrum of tissue responses including cell activation, generation of reactive oxygen species (ROS), and cell death^{8,9}. Remyaa *et al.* (2014)¹⁰ found that iron oxide NPs affected hematology and ionic-regulation and gill K⁺/Na⁺ ATPase activity; all this leads us to think about the effect of nanoparticles on nervous system as a possible target to their toxicity.

Neurodegenerative diseases are very dominant illnesses; it is linked directly to the environment quality. The most common form of cell death in neurodegeneration is through the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway. This pathway controls the activation of caspase-9 by regulating the release of cytochrome c from the mitochondrial intermembrane space (IMS)¹¹. There is strong evidence that mitochondrial dysfunction and oxidative stress play a causal role in neurodegenerative disease pathogenesis, including in four of the more well-known diseases Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, and Amyotrophic lateral sclerosis¹².

Based on these findings, we hypothesized that Fe₃O₄-NPs induced neurotoxicity. Therefore, the aim of this work was to investigate the potential toxicity effect of Fe₃O₄-NPs in rabbit and to show the link between molecular mechanisms in terms of oxidative stress and apoptotic mediators.

Abstract

Fe₃O₄ nanoparticles are the most widely used metal oxide nanoparticles especially, in biomedical applications. Although, nanoparticles can enter to the different organs, little is known so far on the neurotoxic potential and oxidative stress of Fe₃O₄. Here the understanding of the effect of Fe₃O₄ nanoparticles on the general Redox state of rabbit brain and the effect on mitochondrial swelling and respiration were assessed. Fe₃O₄ resulted in increase of brain markers, lipid peroxidation, protein and ROS formation. Mitochondrial enzymes and swelling were elevated with decreased respiration level. Caspase 3 activity and TNF- α level were also increased. Finally, our study suggested that the mitochondrial disease and dysfunction with elevated oxidative stress in rabbit brain treated with 200 and 300 μ g/kg *per Os* is the original of neurotoxicity and maybe the original cause of neurodegenerative disease.

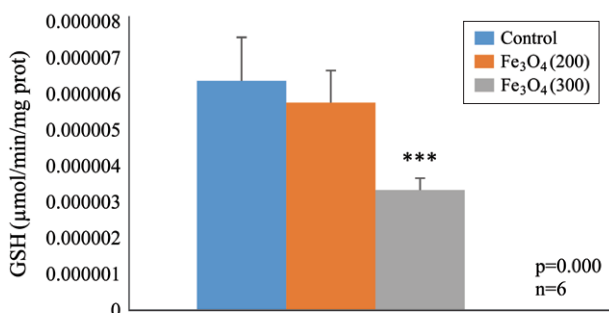


Figure 1. Variation of stromal GSH (µM/mg prot.) in the control and treated rabbits brain cortex after 14 days of treatment ($p < 0.01$).

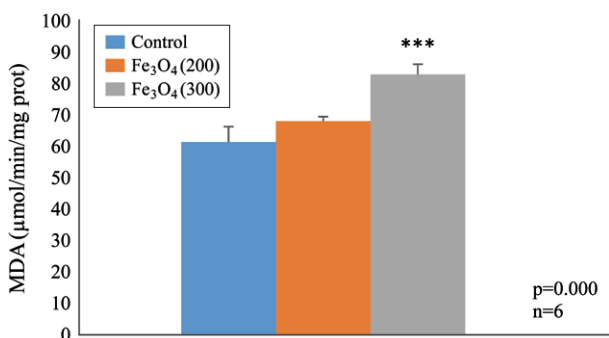


Figure 2. Variation of stromal MDA (µM/mg) level in brain cortex after 14 days of treatment with 200 and 300 µg/kg of Fe₃O₄-NPs ($p < 0.001$).

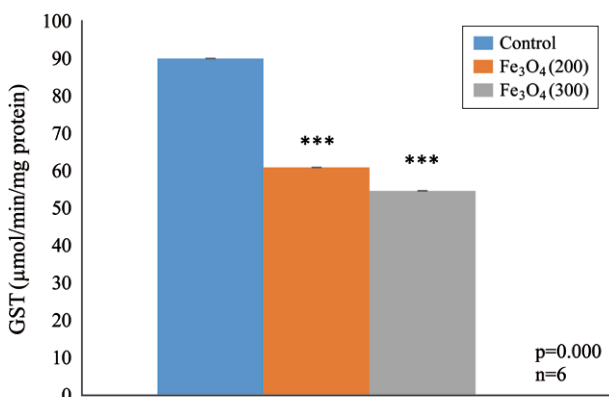


Figure 3. Effect of Fe₃O₄-NPs on the variation of stromal GST (µM/mg) after 14 days of per os administration ($p < 0.01$).

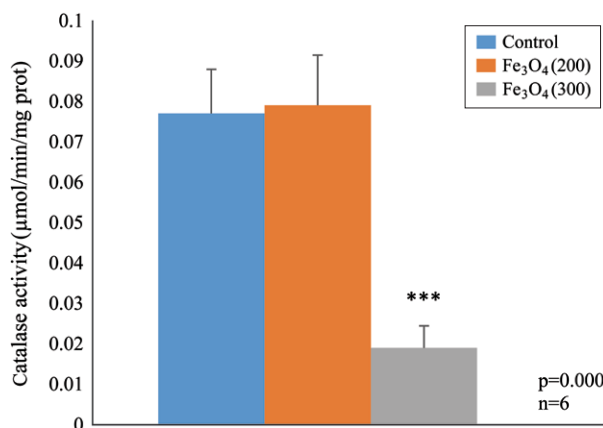


Figure 4. Effect of Fe₃O₄-NPs on the variation of stromal CAT (µM/mg) after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

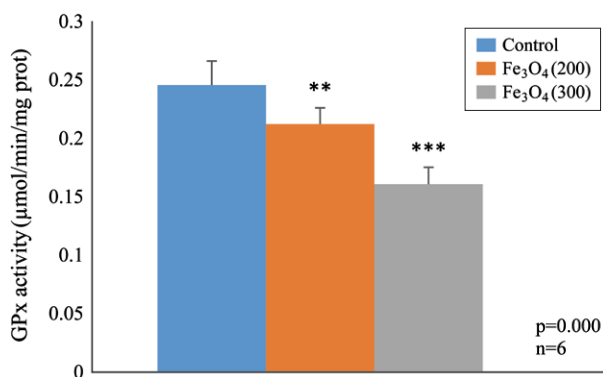


Figure 5. Effect of Fe₃O₄-NPs treatments on the variation of stromal GPx (µM/mg) after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

cant ($p \leq 0.01$) decrease of the glutathione content in the brain cortex mitochondria (0.055 ± 0.0001 and 0.035 ± 0.0001 µM/mg) compared to the control group (0.09 ± 0.002 µM/mg) (Figure 1).

The Figure 2 shows the impact of Fe₃O₄-NPs in two doses 200 and 300 µg/kg/day on the lipidic peroxidation in brain cortex cells by the estimation of the MDA level. These two doses cause a very significant ($p < 0.001$) increase in MDA level (83.05 ± 0.9 µM/mg) and (68.11 ± 0.5 µM/mg) against (61.49 ± 0.9 µM/mg) in controls.

Assessment of Stromal Oxidative Stress Enzymes

Treatment by 200 and 300 µg/kg/day of Fe₃O₄-NPs causes a high significant decrease in enzymatic activity of GST, CAT and GPx and SOD respectively, according to the group control (Figures 3, 4, 5 and 6).

Results

Assessment of GSH and MDA

Treatment of rabbits with 200 and 300 µg/kg/day of the Fe₃O₄-NPs during 14 days, results a highly signifi-

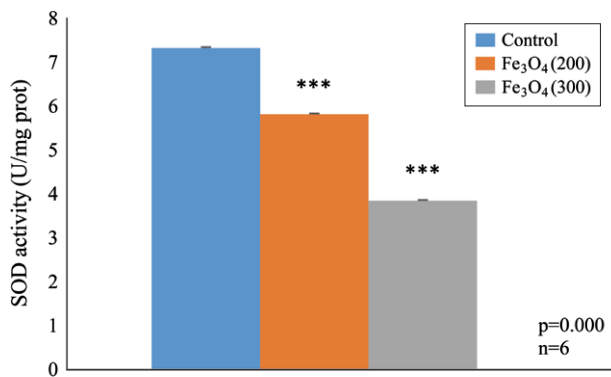


Figure 6. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on stromal superoxide dismutase (SOD) activity (U/mg prot) after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

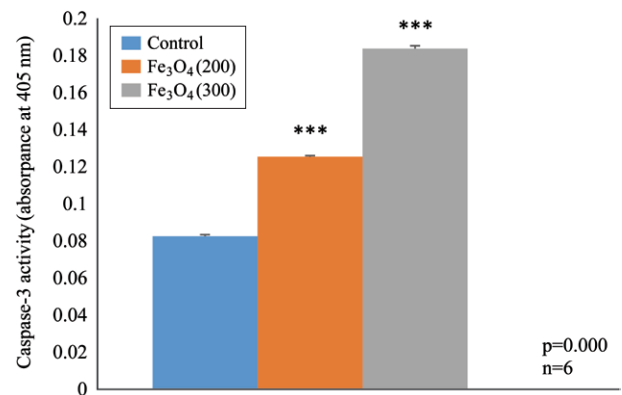


Figure 8. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on brain cortical caspase-3 activity (OD at 405 nm) after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

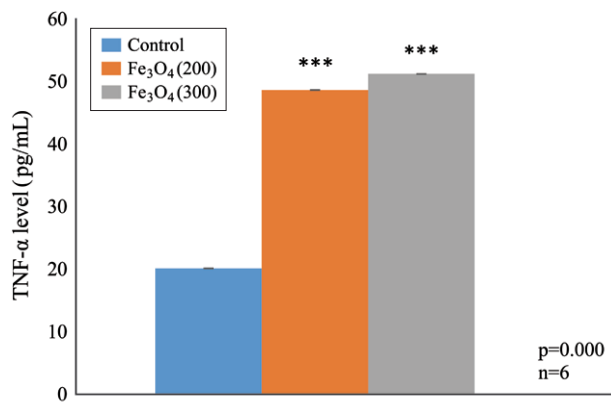


Figure 7. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on brain cortical TNF-α level (pg/mL) after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

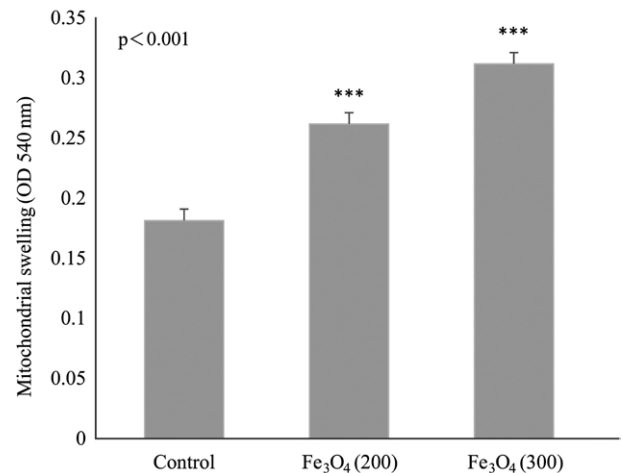


Figure 9. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on brain cortex mitochondria swelling at OD = 540 nm after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

Effect of Fe₃O₄-NPs on TNF-α, Caspase-3 of Brain Cortex

Impact of Fe₃O₄-NPs on TNF-α and caspase-3 of brain cortex homogenates is shown in the Figures 7 and 8, it is clear that the two doses of iron nanoparticle increase the level of these biomarkers significantly ($p < 0.01$).

Mitochondrial Assays

Effects of Fe₃O₄-NPs on brain cortex mitochondrial swelling, permeability and respiration are shown in the Figures 9, 10 and 11 it is clear that the two doses of iron nanoparticle increase the mitochondrial swelling by the increase of its permeability significantly ($p < 0.01$).

Mitochondrial Respiration was also influenced in dose-dependence manner; it shows a clear decrease of this parameter (Figure 11).

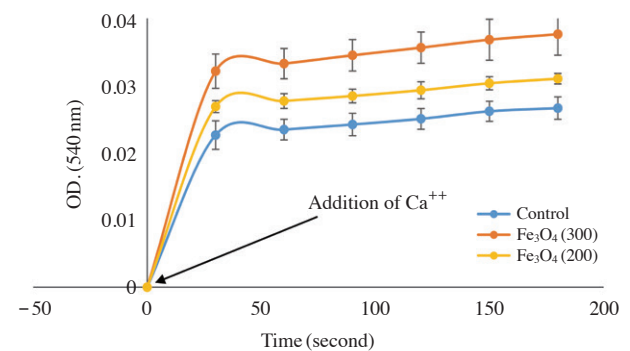


Figure 10. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on brain cortex mitochondria permeability after 14 days of per os administration ($p < 0.001$).

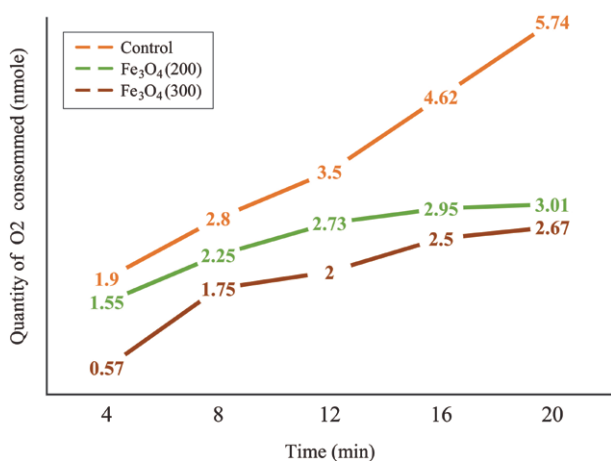


Figure 11. Effect of Fe₃O₄ at 200 and 300 µg/kg on brain cortex mitochondria respiration (nmoles) after 14 days of *per os* administration ($p < 0.001$).

Mitochondrial Swelling

See the Figure 9.

Mitochondrial Permeability

See the Figure 10.

Mitochondrial Respiration

See the Figure 11.

Discussion and Conclusions

Iron oxide nanoparticles are very interesting; they are used in cell labeling¹, drug targeting², gene delivery³, biosensors, hyperthermia therapy and as contrast agents in magnetic resonance imaging⁴⁻⁶. However, their biological reactivity can be enhanced and can lead to potential toxic interactions. In this study, the administration *per-os* of two doses (200 and 300 µg/kg) of Fe₃O₄-NPs to the male rabbits caused very large perturbation on enzymatic, redox state and mitochondrial parameters.

Treatment by these two doses decreased significantly the amount of stromal GSH concordant to the results of^{13,14} and increased the MDA level according to the controls, this due by the increased utilization of GSH to scavenge the ROS and by consequence increase the oxidative stress and increase the MDA level by the enhancement of lipid degradation, these results are in concord with the results of¹⁵ Rouabhi *et al.* (2015). Garcia *et al.* (2011)¹⁶ found that the Iron oxide nanoparticles inhibit the development of some laboratory test models by the influence on general metabolism

including the β-oxidation. In this work, stromal GST, CAT, GPx and SOD enzymes activities were significantly decreased in the rabbits treated by the two doses of Fe₃O₄-NPs, which induced a total paralyze in the defensive state resulting an increased amount of ROS and these results was in discordance with the results of Rouabhi *et al.* (2008)¹⁷ and Rouabhi *et al.* (2015)¹⁵. A gradual increasing of the ROS amount can induce a mitochondrial disturbance translated by the increase of the swelling and permeability. Lakroun *et al.* (2014)¹⁸ found that the END induced a mitochondrial swelling and an increased oxidative stress state.

Caspase-3 is a caspase protein that interacts with caspase-8 and caspase-9. It is encoded by the *CASP3* gene. *CASP3* orthologs have been identified in numerous mammals for which complete genome data are available. The *CASP3* protein is a member of the cysteine-aspartic acid protease (caspase) family^{19,20}. Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis. Caspases exist as inactive proenzymes that undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce two subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme. This protein cleaves and activates caspases 6 and 7; and the protein itself is processed and activated by caspases 8, 9, and 10. It is the predominant caspase involved in the cleavage of amyloid-beta 4A precursor protein, which is associated with neuronal death in Alzheimer's disease. Caspase-3 is activated in the apoptotic cell both by extrinsic (death ligand) and intrinsic (mitochondrial) pathways^{21,22}. The zymogen feature of caspase-3 is necessary because if unregulated, caspase activity would kill cells indiscriminately²³.

Increasing level of ROS induces a significant elevation of caspase-3 level which induced an apoptotic state in neurons, this results is confirmed by the elevated amount of TNF-α that stimulate the activation of caspase-3 and the apoptotic pathway, this is confirmed by the work of Zhao *et al.* (2001)²⁴ and Utaisincharoen *et al.* (2000)²⁵.

TNF-α with TNFR stimulate and activate NF-κB by the inhibition of a protein, IκBα, that normally binds to NF-κB and inhibits its translocation, is phosphorylated by IKK and subsequently degraded, releasing NF-κB. NF-κB is a heterodimeric transcription factor that translocate to the nucleus and mediates the transcription of a vast array of proteins involved in inflammatory response and pro-apoptotic. Our results confirmed that the treatment by 200 and 300 µg/kg of Fe₃O₄-NPs induce an elevated oxidative stress state followed by an apoptosis confirmed by a high mitochondrial swelling and permeability, that make us thought about the exo-diffusion of the cytochrome B to the neuronal cytoplasm because of the high permeability, following by the ex-

ecution of the apoptotic phenomenon, these results are in concord with the results of Yang *et al.* (2006)²⁶ and Zhang *et al.* (2011)²⁷. This inflammation and cell death conducted to the neurodegenerative disease like Alzheimer.

Fe₃O₄ with two doses and 14 days of treatment caused a decrease in the mitochondrial respiration probably by the direct effect on the mitochondria that confirm our results about the swelling and the permeability increase. The dysfunction of mitochondria results a decrease amount of oxygen a substrate of monoxygenases and influence directly on the activity of oxidative stress enzymes this finding is in concordance with those of Baratli *et al.* (2014)²⁸.

In conclusion: IONPs are very used in biomedical field, this work showed a toxic effect of these nanoparticles on mitochondrial enzymes of brain cortex and induced many effects conducting to the death of cells (neurons) and cause a neurodegenerative disease as Alzheimer.

Materials and Methods

Chemicals

Fe₃O₄-NPs nanopowder (< 50 nm average particle size, characterized by TEM), bovine serum albumin (BSA), Bradford reagent, collagenase type I, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) and Fetal bovine sera (FBS), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), dimethyl sulphoxide (DMSO), 5,50-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) [DTNB, (Ellman's reagent)], ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), 20,70-dichlorofluorescein diacetate, glacial acetic acid, trichloroacetic acid (TCA), hydrogen peroxide (H₂O₂), N-ethylmaleimide (NEM), nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt (NADH), nitro blue tetrazolium chloride (NBT), phenazine 116 methosulphate (PMT), potassium dihydrogen phosphate 117 (KH₂PO₄), reduced glutathione (GSH) and thiobarbituric acid (TBA), were provided from toxicology laboratory, Tebessa University, Algeria.

Animals

Male rabbits strain *Oryctolagus cuniculus* body weight 1.5-1.9 kg was used in this study. They have been housed individually in stainless metal cages during an adaptation period of 14 days in a controlled temperature/humidity/photoperiod room (22 ± 2°C; 50%; 12 h dark/light cycle). The feeding of rabbits was based on specific artificial diet for rabbits, and they accessed water freely.

Treatment Protocol

Rabbits were divided in 03 lots of 06 individuals each: Controls (no treatments), treated with Fe₃O₄-NPs at 200 µg/kg/day, treated with Fe₃O₄-NPs at 300 µg/kg/day. All treatments are per os (p. o.) way, for 14 days and carried out with conformity to the international guidelines for the care and use of laboratory animals.

After 14 days of treatment, the rabbits were sacrificed and the brains were picked up, (liver and kidney were recovered, weighed and preserved for other assays) and mitochondrial extraction were proceeding. Some biochemical metabolites (proteins, carbohydrates and fats), and some parameters of oxidative stress in the brain cortex mitochondria (GSH, GPx, CAT, MDA, GST, SOD) was investigated crowned by the estimation of swelling and respiration parameters.

Assay of Antioxidant Enzymes

For this study, SOD activity was measured by following the method of Kakkar *et al.* (1984)²⁹. Briefly, cell lysate containing 5 mg protein was mixed with 0.52 M sodium pyrophosphate buffer, PMS (186 IM), NBT (300 IM). The reaction was started by the addition of NADH. The absorbance of the chromogen formed was measured at 560 nm. The enzymatic activity of GPx was measured by the method of Flohe and Günzler (1984)³⁰, using H₂O₂ as substrate. The spectrophotometric assay of catalase (CAT) activity was performed according to the method of Cakmak and Horst (1991)³¹. The decrease of absorbance is recorded for three minutes by a spectrophotometer at a wavelength of 240 nm and an extinction coefficient $\epsilon = 39400 \text{ L} \cdot \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. The activity of glutathione S-transferase (GST) was determined according to the method of Habig *et al.* (1974)³². It is based on the conjugation reaction between GST and a substrate, the CDNB (1-Chloro2, 4 dinitrobenzene) as a cofactor of glutathione (GST), the conjugation results in the formation of a new molecule: 1-S-glutathionyl 2-4 Di nitrobenzene to measure the activity of GST.

Assay of Glutathione and Lipid Peroxidation

Glutathione (GSH) level was determined according to the method of Weckbeker and Cory (1988)³³. This assay is based on measuring the absorbance of the 2-nitro-5-mercapturic. The latter results from the reduction of the acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (reagent Elleman) by groups (-SH) of glutathione. Once prepared, must undergo homogenate deproteinization (by 0.25% sulfosalicylic acid) to protect the SH-groups of glutathione.

MDA can be detected by a colorimetric reaction with thiobarbituric acid (TBA). Detecting MDA after degradation of polyunsaturated fatty acids 3 or 4 Double per-

oxidized bonds. This is a highly sensitive method for determining lipid peroxidation *in vitro*. The assay of MDA is carried out according to the method of Esterbauer *et al.* (1992)³⁴.

TNF- α Level Quantification

Determination of Tumor necrosis factor- α (TNF- α) level in rabbit brain cortex homogenates was performed using commercial kit (Rabbit TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit from MyBioSource, USA) This ELISA kit uses Sandwich-ELISA as the method. The micro ELISA plate provided in this kit has been pre-coated with an antibody specific to Rabbit TNF- α . Standards or samples are added to the appropriate micro ELISA plate wells and bound by the specific antibody. Then a biotinylated detection antibody specific for Rabbit TNF- α and Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate is added to each micro plate well successively and incubated. Free components are washed away. The substrate solution is added to each well. Only those wells that contain Rabbit TNF- α , biotinylated detection antibody and Avidin-HRP conjugate will appear blue in color. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of a sulphuric acid solution and the color turns yellow. The optical density (OD) is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm \pm 2 nm. The OD value is proportional to the concentration of Rabbit TNF- α in pg/mL. You can calculate the concentration of Rabbit TNF- α in the samples by comparing the OD of the samples to the standard curve.

Assay of Caspase-3 Activity Level

Determination of caspases-3 activity in rabbit brain cortex was performed using commercial kit (Caspase 3 Assay Kit (Colorimetric) (ab39401)) from Abcam tech according to manufacturer guidelines.

Extraction of Mitochondria

All operations were carried on ice. A piece of brain tissue was placed into buffer A containing 50 mM Tris, 1 mM EGTA, 70 mM Sucrose, 210 mM Mannitol, pH 7.40 at +4°C. Tissues were finely minced with scissors, placed in buffer A and homogenized with a Potter-Elvehjem. 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 standard³⁵. Mitochondria were kept on ice and used within 4 h.

Mitochondrial Respiration and Swelling Assay

According to the method of Krystal *et al.* (1996)³⁶, 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 520 nm wavelength for 3 minutes and each 30 second.

Respiration was estimated using an Oxygraph (Hansatech) according to the method described by Rouabhi *et al.* (2006, 2009)^{19,37}.

Statistical Analysis

The numerical and graphical results are presented as mean \pm 6 standard error (SE). The significance of the Difference between two treatment groups was verified by the Student's t-test. The degree of statistical significance was set at a level of $p < 0.05$. Statistical calculations were carried out using Minitab 17.1 statistical package and the Excel 16.0 (Microsoft, Inc.).

Acknowledgements

First, my thanks are addressed to DGRDT of Algeria and Prof. Said Fekra the rector of Tebessa university for their support. This work was achieved in the laboratory of toxicology at applied biology department, Tebessa university which I address my gratitude to all personals; my appreciation goes also to the personals of Sfax biotechnology center, Tunisia for the help in TNF- α and caspases quantification.

References

1. Chen, C. L. *et al.* New Nano-sized Iron Oxide Particle with High Sensitivity for Cellular Magnetic Resonance Imaging. *Mol. Imag. Biol.* **13**, 825-839 (2010).
2. Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E. & Lye, S. Nanomedicine: Magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia - new chances for cancer therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **53**, 839-845 (2005).
3. McBain, S. C., Yiu, H. H. P. & Dobson, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine*. **3**, 169-180 (2008).
4. Puppi, J. *et al.* Use of a Clinically Approved Iron Oxide MRI Contrast Agent to Label Human Hepatocytes. *Cell Transplant.* **20**, 963-975 (2011).
5. Rumenapp, C., Gleich, B. & Haase, A. Magnetic Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging and Diagnostics. *Pharm. Res.* **29**, 1165-1179 (2012).
6. Cochran, D. B. *et al.* Suppressing iron oxide nanoparticle toxicity by vascular targeted antioxidant polymer nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 9615-9622 (2013).

7. Zhu, M. T. *et al.* Oxidative stress and apoptosis induced by iron oxide nanoparticles in cultured human umbilical endothelial cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 8584-8590 (2010).
8. Wilson, M. R., Lightbody, J. H., Donaldson, K., Sales, J. & Stone, V. Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **184**, 172-179 (2002).
9. Zhu, M. T. *et al.* Endothelial dysfunction and inflammation induced by iron oxide nanoparticle exposure: risk factors for early atherosclerosis. *Toxicol. Lett.* **203**, 162-171 (2011).
10. Remyaa, A. S. *et al.* Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, iono-regulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity. *J. King Saud Univ. Sci.* **27**, 151-160 (2015).
11. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **31**, 91-123 (2008).
12. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nat.* **443**, 787-795 (2006).
13. Ashley, R. M. *et al.* Oxidative Stress and Dermal Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles *in Vitro*. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 461-476 (2013).
14. Henine, S. *et al.* Oxidative stress status, caspase-3, stromal enzymes and mitochondrial respiration and swelling of *Paramecium caudatum* in responding to the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **8**, 161-167 (2016).
15. 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.* **5**, 289 (2015).
16. García, A. *et al.* Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination* **269**, 136-141 (2011).
17. Rouabhi, R., Djebbar-Berrebah, H. & Djebbar, M. R. Impact of Flufenoxuron, an IGR pesticide on *Gallus domesticus* embryonic development *in ovo*. *J. Cell Anim. Biol.* **2**, 87-91 (2008).
18. Lakroun, Z. *et al.* Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in Rat. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 7776-7781 (2014).
19. Rouabhi, R., Djebbar-Berrebah, H. & Djebbar, M. R. Toxic Effect of a Pesticide, Diflubenzuron on Freshwater Macroinvertebrate (*Tetrahymena pyriformis*). *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* **12**, 514-517 (2006).
20. Alnemri, E. S. *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171 (1996).
21. Salvesen, G. S. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ.* **9**, 3-5 (2002).
22. Ghavami, S. *et al.* Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* **46**, 497-510 (2009).
23. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 725-731 (2003).
24. Zhao, X. *et al.* TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* **64**, 121-131 (2001).
25. Utaisincharoen, P., Tangthawornchaikul, N., Ubol, S., Chaisuriya, P. & Sirisinha, S. TNF-alpha induces caspase 3 (CPP 32) dependent apoptosis in human cholangiocarcinoma cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **31**(Suppl. 1), 167-170 (2000).
26. Yang, S., Thor, A. D., Edgerton, S. & Yang, X. Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis* **11**, 1987-1997 (2006).
27. Zhang, G. *et al.* Hydroxycamptothecin-Loaded Fe₃O₄ Nanoparticles Induce Human Lung Cancer Cell Apoptosis through Caspase-8 Pathway Activation and Disrupt Tight Junctions. *Cancer Sci.* **102**, 1216-1222 (2011).
28. Baratli, Y. *et al.* Age Modulates Fe₃O₄ Nanoparticles Liver Toxicity: Dose-Dependent Decrease in Mitochondrial Respiratory Chain Complexes Activities and Coupling in Middle-Aged as Compared to Young Rats. *BioMed Res. Int.* DOI:10.1155/2014/474081 (2014).
29. Kakkar, P., Das, B. & Viswanathan, P. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.* **21**, 130-132 (1984).
30. Flohe, L. & Gunzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-121 (1984).
31. 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.* **83**, 463-468 (1991).
32. Habig, H., Pabst, M. J. & Jokoby, W. B. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).
33. Weckbker, G. & Cory, J. G. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.* **40**, 257-264 (1988).
34. Esterbaer, H., Gebicki, J., Puhl, H. & Jungens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 341 (1992).
35. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
36. Kristal, B. S., Park, B. K. & Yu, B. P. 4-hydroxynonéal est un puissant inducteur de la transition de perméabilité mitochondriale. *J. Biol. Chem.* **271**, 6033-6038 (1996).
37. Rouabhi, R., Djebbar, H. & Djebbar, M. R. Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* **1**, 74-80 (2009).