

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité/Option : Biochimie Appliquée

Département : Biologie

Thème

Effet de l'huile d'oléastre sur la toxicité des nanoparticules.

Présenté par :

-  BENNOUAR Khawla
-  MENAI Siham
-  MERAH Amira
-  SERIDI Yousra

Devant le jury composé de :

Président :	ZERGUIN.K	MCA	Université de Guelma
Examineur :	YOUNSI. M	MCB	Université de Guelma
Encadrant :	HAMDIKEN.M	MCB	Université de Guelma
Membre invité :	GRARA.N	Pr	Université de Guelma

Juin 2022

REMERCIEMENT

Avant tous, nos plus sincères remerciements à notre Dieu « الله » qui nous a accordé la Puissance et la volonté afin de terminer ce modeste travail.

Nous voudrions exprimer nos remerciements à M^{me} ZERGUIN, Maitre-de conférences à l'université de Guelma, pour l'honneur qu'elle nous a fait d'accepter de présider ce jury.

Nos sincères remerciements vont également à M. YOUNSI, Maître-de conférence à l'université de Guelma, pour avoir accepté d'évaluer et d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadrante M^{me} HAMDIKEN, Maitre-de conférences à l'université de Guelma, pour nous avoir proposé ce thème de recherche et pour nous avoir consacré beaucoup de temps et d'énergie à l'encadrement de ce mémoire, et pour sa disponibilité, et sa confiance.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire de notre faculté, surtout MEHDI, RATIBA et LOUIZA dont l'aide et l'amitié nous ont été un grand soutien moral au cours de ces mois de travail.

Nos sincères remerciements à toutes les personnes qui nous ont aidés lors de l'élaboration de ce mémoire notamment M. BOUDJAHEM, M. GUENIFI, M^{me} GRARA et M^{me} BOUZITOUNA pour leurs disponibilités.

Nous adressons un vif remerciement à l'ensemble du personnel du laboratoire d'anatomie pathologique de l'EPH IBN ZOHR de Guelma, qui malgré leur travail et leur matériel limité ont su nous informer et nous ont très bien accueillies au sein de leur service pendant le mois de notre stage.

En fin, nous tenons à remercier nos parents, pour tout l'amour et le soutien qu'ils nous ont apporté à tous les moments de notre vie. Ils sont toujours été une source de tendresse et un modèle de travail, de sagesse et d'humilité.

Merci à vous tous

DEDICACE

En premier lieu, louange à ALLAH qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de mes études et m'a inspiré les bons pas.

Je dédie cet humble travail ;

A moi-même

A ma famille.

A mes chers enseignants ; M. Stiti, M^{me} Braik et M^{me} Abdaoui.

A toute personne qui m'aime.

A toute personne qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un encouragement.

« Merci »

YOUSRA

DEDICACE

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail, que je dédie ;

*A mon très cher père **Allaoua**, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis.*

*A ma mère **Fatima**, la source de mes efforts, puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.*

*A mon mari **Hicham**, qui m'a toujours encouragé, son soutien m'a permis de réaliser le rêve tant attendu, je prie Dieu le tout puissant de préserver notre attachement mutuel.*

*Et bien sûr à mes frères **Tarek** et **Houssem**, je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible, que Dieu vous accorde la santé et le grand succès.*

*Sans oublié mes petits chéris **Roudaina** et **Alaa Rahman**.*

*A toute ma famille **Bennouar** et **Tazir**.*

*A mes chères amies et mes sœurs **Sara**, **Marwa**, **Nadia**, **Souad** et **Khouloud**.*

*A mes chères partenaires dans ce travail ; **Sihem**, **Yousra** et **Amira**, en souvenirs des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite, bonheur, santé et de prospérité.*

Enfin je le dédie à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous remercie.

DEDICACE

Je voudrais tout d'abord, remercier DIEU de m'avoir donné le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie ;

A ma très chère mère « Fatima el Zahra » pour l'affection, la patience, l'encouragement, qu'elle m'a donné pendant toute ma vie.

A mon mari M. Bader eddine.

A mon fils. Mohamed islem.

A mes adorables frères ; Amine, hakim et Yassine.

A mes agréables sœurs ; Khadidja, Assia, Amina, Sara et Mouna.

A mes partenaires dans ce travail ; Khawla, Amira et Yousra.

A tous ceux qui m'aime.

A tous ceux que j'aime.

SIHAM

DEDICACE

Tout d'abord, Je remercie DIEU le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il m'a donné pour l'achèvement de ce travail.

Je tiens à dédier ce travail ;

A mes chers parents ; ABD EL GHANI et FATIMA, Pour leurs amour, sacrifices, aide et soutien, qui m'ont toujours encouragé tout au long de mes études, sans vous je ne serai jamais là où je suis aujourd'hui, j'espère que vous puisez trouver dans ce travail le fruit de vos labeurs.

A mes frères ; ACHREF, AMDJED et SIRADJE, merci pour vos encouragements, Je vous souhaite le plein de succès et de bonheur.

A mes chers amis lesquelles je considère comme mes sœurs : Chaima, Marwa, Khawla ,Chamama, Nessrin et Djihan.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

AMIRA

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUMES

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les nanoparticules

1. Définitions	6
1.1. Nano	6
1.2. Nanosciences	6
1.3. Nanotechnologies	6
1.4. Nanomatériaux	6
1.5. Nanoparticules	6
2. Sources des nanoparticules	7
2.1. Nanoparticules naturelles	7
2.2. Nanoparticules anthropiques	7
2.2.1. Origine anthropogénique non-intentionnelle	7
2.2.2. Origine anthropogénique intentionnelle	7
3. Types des nanoparticules	7
3.1. Nanoparticules organiques	7
3.1.1. Les polymères	7
3.1.2. Les nanoparticules d'inspiration biologique	8
3.2. Nanoparticules inorganiques	8
3.2.1. Les métaux	8
3.2.2. Les oxydes métalliques	8
4. Propriétés et applications	8
5. Les nanoparticules de dioxyde de silicium	10
6. Les nanoparticules de nickel	10
7. Toxicité des Nanoparticules	11
8. Devenir des nanoparticules dans l'organisme	12
8.1. Absorption	12
8.1.1. Voie respiratoire	12
8.1.2. Voie cutanée	13

8.1.3. Voie digestive	13
8.2. Distribution	14
8.3. Métabolisme et biotransformation	14
8.4. Elimination.....	15

Partie bibliographique

Chapitre 2 : Le stress oxydatif

1. Définition.....	17
2. Radicaux libres	17
3. Types des radicaux libres.....	17
3.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	17
3.2. Espèces réactives azotées	18
4. Sources métaboliques des ERO et ERA	18
4.1. La production intracellulaire	18
4.2. La production extracellulaire.....	19
5. Cibles biologiques des radicaux libres.....	20
5.1. Les lipides.....	20
5.2. Les acides nucléiques	20
5.3. Les protéines	20
5.4. Les sucres	21
6. Systèmes de défenses antioxydants	21
7. Différents types d'antioxydants	22
7.1. Antioxydants enzymatiques.....	22
7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	22
7.1.2. Catalase (CAT)	22
7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)	22
7.2. Antioxydants non enzymatiques	23
7.2.1. Glutathion (GSH).....	23
7.2.2. Acide urique.....	24
7.2.3. Tocophérol (Vitamine E)	24
7.2.4. Caroténoïdes (Vitamine A)	25
7.2.5. Acide ascorbique (Vitamine C)	25
7.2.6. Oligoéléments.....	25
8. Nanoparticules et stress oxydatif	26

Partie bibliographique

Chapitre 3 : L'huile d'oléastre

1. Généralités sur l'oléastre	29
1.1. Définition	29
1.2. Distribution	29
1.3. Facteurs influençant la répartition	30
1.4. Aspect botanique	31
1.4.1. Systématique	31
1.4.2. Description botanique	32
2. L'huile d'oléastre	33
2.1. Extraction	34
2.2. Composition biochimique	34
2.2.1. Fraction saponifiable	34
2.2.2. Fraction insaponifiable	35
2.3. Critères de qualité de l'huile d'oléastre	37
2.3.1. Les caractéristiques organoleptiques (sensorielles)	37
2.3.2. Les caractéristiques physicochimiques	37
2.3.2.1. Caractéristiques physiques	37
2.3.2.1.1. Indice de réfraction	37
2.3.2.1.2. Humidité (Teneur en eau)	38
2.3.2.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	38
2.3.2.1.4. Absorbance aux rayonnements ultraviolets	38
2.3.2.2. Caractéristiques chimiques	38
2.3.2.2.1. Acidité libre	38
2.3.2.2.2. Indice de peroxyde	38
2.3.2.2.3. Indice de saponification	39
2.3.2.2.4. Indice d'iode	39
2.4. Les Pigments colorants	39
2.5. Les composés phénoliques	39
2.5.1. Les polyphénols	39
2.5.2. Les flavonoïdes	40
2.6. Effet de L'huile de l'oléastre sur la santé	40

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel Végétal	43
2. L'analyse organoleptique de l'huile d'oléastre	43
3. L'analyse des caractéristiques physico-chimiques	43

3.1. Détermination des paramètres physiques	43
3.1.1. Indice de réfraction	43
3.1.2. L'humidité H ₂ O	44
3.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	44
3.1.4. Absorbance aux rayonnements ultraviolets.....	45
3.2. Détermination des paramètres chimiques	45
3.2.1. Acidité libre.....	45
3.2.2. Indice de peroxyde.....	47
3.2.3. Indice de saponification	47
3.2.4. Indice d'iode.....	48
4. Détermination de la teneur en Pigments colorants	49
4.1. Détermination de la teneur en chlorophylles	49
4.2. Détermination de la teneur en caroténoïdes	50
5. Etude de l'activité antioxydante	50
5.1. Extraction des composés phénoliques totaux.....	50
5.2. Dosage des polyphénols totaux.....	51
5.3. Dosage des flavonoïdes.....	51
5.4. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	52
6. Etude in vivo de la toxicité des nanoparticules	53
6.1. Nanoparticules étudiées	53
6.2. Préparation des suspensions des nanoparticules.....	54
6.3. Animaux	54
6.4. Traitement des animaux	54
6.5. Prélèvement sanguin	55
6.6. Prélèvement des organes.....	55
6.7. Dosage des paramètres sanguins.....	55
6.7.1. Dosage du cholestérol total	55
6.7.2. Dosage du cholestérol-HDL.....	57
6.7.3. Dosage des Triglycérides	59
6.7.4. Dosage de l'urée.....	60
6.7.5. Dosage de la créatinine	62
6.7.6. Dosage de l'activité d'aspartate amino transférase (ASAT).....	63
6.7.7. Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	64
6.8. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau tissulaire	66
6.8.1. Préparation de l'homogénat.....	66

6.8.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	66
6.8.3. Dosage du glutathion réduit (GSH)	67
6.8.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	67
6.8.5. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).....	68
6.8.6. Dosage de l'activité de la glutathion s-transférase (GST)	69
6.8.7. Dosage des protéines	70
7. Etude histologique	70
7.1. Fixation des organes.....	70
7.2. Préparation des cassettes	71
7.3. Déshydratation des échantillons	71
7.4. L'inclusion et la réalisation des blocs	71
7.5. Coupes des organes	72
7.6. Coloration	72
7.8. Observation au microscope	73
8. Analyse statistique des résultats.....	73

Résultats et discussion

1. Analyse des caractéristiques de l'huile d'oléastre.....	75
1.1. Analyse organoleptique (sensorielle)	75
1.2. Analyse physico-chimique	75
1.2.1. Analyse physique	75
1.2.1.1. Les indices physiques	75
1.2.1.2. L'absorbance dans l'UV	76
1.2.2. Analyse chimique.....	76
1.3. Dosage des pigments colorants (chlorophylles et caroténoïdes).....	77
1.4. Dosage des composés phénoliques	78
1.4.1. Teneur en polyphénols	78
1.4.2. Teneur en flavonoïdes	78
1.4.3. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	78
2. Analyse des paramètres biochimiques.....	79
2.1. Profil lipidique (cholestérol HDL, triglycérides, cholestérol).....	81
2.2. Profil protéique (urée, créatinine).....	83
2.3. Activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL).....	85
2.4. Activité enzymatique de transaminase (l'aspartate aminotransférase ASAT)	86
3. Analyse des paramètres tissulaires	87
3.1. Protéines.....	87

3.2. MDA	91
3.3. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)	95
3.4. Activité enzymatique de la catalase (CAT)	99
3.5. Glutathion réduit (GSH).....	103
3.6. Glutathion-s-transferase (GST)	107
4. Analyse histologique.....	111
4.1. Au niveau du foie	111
4.2. Au niveau du cœur.....	112
4.3. Au niveau des reins.....	112
4.4. Au niveau des testicules.....	112

Discussion

1. Analyse organoleptique.....	117
2. Analyse physico-chimique	117
2.1. Les indices physiques	117
2.2. Les indices chimiques.....	118
2.3. Les Pigments colorants	119
2.4. Dosage des composés phénoliques	120
2.4.1. Teneur en polyphénols	120
2.4.2. Teneur en flavonoïdes	121
2.4.3. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	122
3. Analyse des paramètres biochimiques et tissulaires	122
3.1. Effet des nanoparticules de nickel et de silice sur la variation des paramètres biochimiques	122
3.1.1. Effet sur le profil lipidique	122
3.1.2. Effet sur la fonction hépatique.....	123
3.1.3. Effet sur la fonction rénale	124
3.2. Effet des nanoparticules de nickel et de silice sur la variation des paramètres du stress oxydatif.....	124
3.2.1. MDA	124
3.2.2. Activité enzymatique de la catalase (CAT)	125
3.2.3. Protéines	126
3.2.4. Glutathion réduit (GSH).....	126
3.2.5. Glutathion s-transférase (GST).....	127
3.2.6. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)	128
4. Analyse histologique.....	128

4.1. Au niveau du foie	128
4.2. Au niveau du cœur	129
4.3. Au niveau des reins	129
4.4. Au niveau des testicules	130
Conclusion et perspectives	132
Références bibliographiques	135
Annexes	155

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques	7
Figure 2. Utilisation des nanoparticules pour diverses applications	9
Figure 3. Flux de travail impliqué dans l'évaluation de la nano toxicité et de la nano écotoxicité	12
Figure 4. Pénétration des nanoparticules par voie respiratoire.....	13
Figure 5. Pénétration des NPs par voie digestive	14
Figure 6. Cinétique des nanoparticules et processus ADME	15
Figure 7. Stress oxydant	17
Figure 8. Les Sites de production intracellulaire des radicaux libres	19
Figure 9. Génération extracellulaire des radicaux libres	20
Figure 10. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	21
Figure 11. Les réactions impliquant le glutathion	24
Figure 12. La localisation actuelle des populations d'oléastres (olivier sauvage). Les ovales, selon leur taille, indiquent le nombre d'individus par peuplement	30
Figure 13. Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre	33
Figure 14. La forme réduite et non réduite de la molécule du DPPH.	52
Figure 15. Indices de qualité physique de l'huile d'oléastre.	75
Figure 16. Les extinctions spécifiques dans l'UV (K_{270} et K_{232}).	76
Figure 17. Indices de qualité chimique de l'huile d'oléastre.....	77
Figure 18. Pigments colorants (chlorophylles et caroténoïdes).....	77
Figure 19. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes.	78
Figure 20. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique de l'huile d'oléastre.....	79
Figure 21. Concentration sérique du cholestérol chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.	81
Figure 22. Concentration sérique du triglycéride chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.	82

Figure 23. Concentration sérique de l'HDL chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.83

Figure 24. Concentration sérique de l'urée chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.84

Figure 25. Concentration sérique de la créatinine chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.85

Figure 26. Concentration sérique de la PAL chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.86

Figure 27. Concentration sérique de l'ASAT chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.87

Figure 28. Concentration de protéines tissulaires au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....91

Figure 29. Concentration de MDA tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....95

Figure 30. Concentration de SOD tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....99

Figure 31. Concentration de CAT tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....103

Figure 32. Concentration de GSH tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les

rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO ₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....	107
Figure 33. Concentration de GST tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO ₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO ₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.....	111
Figure 34. Coupes histologiques du foie	113
Figure 35. Coupes histologiques du cœur.	114
Figure 36. Coupes histologiques du rein	115
Figure 37. Coupes histologiques du testicule	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les principaux anti-oxydants et leurs modes d'action.....	26
Tableau 2. Les valeurs moyennes des acides gras d'olea oléastre.....	35
Tableau 3. Teneur en antioxydants (mg/Kg d'huile) de l'huile d'oléastre comparée à l'huile d'olive cultivé.....	36
Tableau 4. Teneur en chlorophylles, caroténoïdes et stabilité oxydative entre l'oléastre et la variété chemlali	36
Tableau 5. L'analyse sensorielle de l'huile d'oléastre.	75
Tableau 6. Concentration sérique des paramètres biochimiques (cholestérol, cholestérol HDL, triglycérides, PAL, ASAT, créatinine et urée) chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.	80
Tableau 7. Concentration de protéines hépatiques, pulmonaires, rénales, testiculaires et cardiaques chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.	88
Tableau 8. Concentration de MDA hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.....	92
Tableau 9. Concentration de SOD hépatique, pulmonaire, rénale, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.....	96
Tableau 10. Concentration de CAT hépatique, pulmonaire, rénale, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.....	100
Tableau 11. Concentration de GSH hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire, et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.....	104
Tableau 12. Concentrations de GST hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire, et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.....	108

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
A/Abs	Absorbance
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end products
AGMI	Acides gras mono insaturés
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
ANOVA	Analysis of variance
AST	Aspartate amino transferase
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CO	Groupe carbonyle
CAT	Catalase
CFC	Cubic à face centrée
COI	Règlement de la commission Européenne
CCE	Commission de coopération environnementale
DGKC	Société allemande de chimie clinique
DPPH	2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl
DO	Densité optique
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EOA	Espèces Oxygénés Activée
ERO	Espèces Réactif de l'Oxygène
eNOS	Isoforme endothéliale
GLDH	Glutamate déshydrogénase
GSH	Glutathion réduit
GSH-PX	Glutathion peroxydase
GST	Glutathion s-transférase
GSSG	Glutathion oxydé

GR	Glutathion réductase
GAD	Acide Glutamique Decarboxylase
HDL	Lipoprotéines de densité élevée
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H₂O	Eau
HOCl	Acide hypochlorique
IC50	Concentration inhibitrice de 50 %
INOS	L'isoforme inductible
Ip	Indice de peroxyde
Ir	Indice de réfraction
Is	Indice de saponification
ISO	International Organization for Standardization
Kg	Kilogramme
KOH	Hydroxyde de potassium
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MCV	Maladies cardiovasculaires
MDA	Malondialdéhyde
MDH	Malate déshydrogénase
Mg/mg	Milligramme
ml/ml	Millilitre
NaCl	Chlorure de sodium
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)
NBT	Nitrobleu de tétrazolium
Na₂EDTA	Disodium Éthylènediaminetétraacétique
Na₂S₂O₃	Thiosulfate de sodium
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NH₂-	Groupement amine
NO°	Monoxyde d'azote
NO₂	Dioxyde d'azote
NOS	Nitrique Oxyde Synthase
NPs	Nanoparticules

NPs-Ni	Nanoparticules de nickel
NPs-SiO₂	Nanoparticules de dioxyde de silicium ou de silice
$^1\text{O}_2$	Singulet
$\text{O}_2^{\circ-}$	Radical superoxyde
O_2	Oxygène
OH°	Radical hydroxyle
ONOO^-	Anion peroxydinitrite
ONOOH	Nitroperoxyde
PAL	Activité de la phosphatase alcaline
PEG	Polyethylene glycol
pH	Potentiel d'hydrogène
ppm	Partie par million
RL	Radicaux libres
RO°	Radical alkoxyde
ROO°	Radical peroxyde
RT	Réactif de travail
SCE	Société scandinave de chimie clinique
SOD	Superoxyde dismutase
TRX	Thiorédoxine
TGO	Oxaloacétate de glutamate transférase
UV	Ultraviolet
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité

RESUME

La présente étude consiste à évaluer d'une part les effets toxiques des nanoparticules de Nickel (NPs-Ni) et des nanoparticules de silice (NPs-SiO₂) sur certaines fonctions vitales chez les rats blancs mâles «*Albino Wistar*», et d'autre part, de tester l'effet modulateur de l'huile d'oléastre contre ces effets toxiques induits par ces nanoparticules.

Dans un premier temps, Afin de déterminer le pouvoir antioxydant de l'huile d'oléastre, une étude phytochimique préliminaire a été effectuée, initiée par une analyse quantitative des composés phénoliques et suivie par un test anti-radicalaire. Les résultats obtenus révèlent la présence des taux importants des phénols totaux et des flavonoïdes avec un pouvoir antioxydant élevé contre le radical DPPH.

En outre, nos résultats ont montré que l'administration du NPs-Ni et du NPs-SiO₂ pendant 21 jours a provoquée des altérations graves au niveau de l'organisme, se traduisant par ; des perturbations métaboliques (augmentation de cholestérol, de triglycérides et cholestérol HDL), un effet hépatotoxique (augmentation de TGO et diminution de PAL) et néphrotoxique (augmentation de l'urée et de la créatinine). De plus, nous avons noté que l'utilisation du NP-Ni et du NP-SiO₂ est à l'origine de l'apparition d'un état de stress oxydant, ceci est révélé par une augmentation de la peroxydation lipidique, des perturbations dans les systèmes de défense antioxydants ; taux de glutathion réduit, les activités enzymatiques de la glutathion-S-transférase, la catalase et la superoxyde dismutase tissulaires. Cependant, la supplémentation en l'huile d'oléastre aux rats injectés par les NPs-Ni ou par les NPs-SiO₂ a atténuée certains effets toxiques de ces nanoparticules.

Les résultats histopathologiques ont montré des dommages sévères dans les tissus des reins, du foie, du cœur et des testicules. Les concentrations de NPs-Ni de 50 mg/kg et de NPs-SiO₂ de 100mg/kg ont provoqué ; la congestion vasculaire, la dilatation des tubules rénaux, l'infiltration des cellules inflammatoires, ainsi que l'excrétion des cellules épithéliales du tubule séminifère brut, la disposition désordonnée de ces cellules dans le tube et l'apparition de l'apoptose et de la mort des cellules (nécrose). Tandis que la supplémentation en l'huile d'oléastre aux rats a protégé le tissu hépatique, rénal, cardiaque et testiculaire par la réduction de ces altérations histologiques. Ces résultats étant une réponse à l'injection de nanoparticules de nickel et de silice par voie intrapéritonéale et à l'administration de l'huile d'oléastre par gavage.

En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition au NPs-Ni et au NPs-SiO₂ provoque des perturbations au niveau de l'organisme, qui sont atténuées par l'utilisation de l'huile d'oléastre, à fort potentiel antioxydant pour contracter le stress oxydant induit par ces NPs.

Mots-clés : Nanoparticules ; Nickel ; Silice ; Stress oxydant ; Huile d'oléastre.

ABSTRACT

The present study consists in evaluating the toxic effects of nickel nanoparticles (Ni-NPs) and silica nanoparticles (SiO₂-NPs) on some vital functions in white male "Albino Wistar" rats, and to test the modulating effect of oleaster oil against these toxic effects induced by these nanoparticles.

Firstly, in order to determine the antioxidant power of oleaster oil, a preliminary phytochemical study was carried out, initiated by a quantitative analysis of phenolic compounds and followed by an anti-radical test. The results obtained reveal the presence of high levels of total phenols and flavonoids with a high antioxidant power against the DPPH radical.

Moreover, our results showed that the administration of Ni-NPs and SiO₂-NPs for 21 days caused severe alterations in the organism, resulting in: metabolic disturbances (increase in cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol), hepatotoxic (increase in TGO and decrease in PAL) and nephrotoxic (increase in urea and creatinine) effect. Furthermore, we found that the use of Ni-NP and SiO₂-NP caused the onset of an oxidative stress state, this is revealed by an increase in lipid peroxidation, disruptions in antioxidant defense systems; reduced glutathione levels, glutathione-S-transferase, catalase and tissue superoxide dismutase enzymatic activities. However, oleaster oil supplementation of rats injected with Ni-NPs or SiO₂-NPs attenuated some of the toxic effects of these nanoparticles.

Histopathological results showed severe damage in kidney, liver, heart and testicular tissues. Concentrations of Ni-NPs of 50 mg/kg and SiO₂-NPs of 100mg/kg caused: vascular congestion, dilation of renal tubules, infiltration of inflammatory cells, as well as excretion of epithelial cells from the crude seminiferous tubule, disordered arrangement of these cells in the tubule, and the occurrence of apoptosis and cell death (necrosis). While the supplementation of rats with oleaster oil protected the liver, kidneys, heart and testicular tissues by reducing these histological alterations. These results being a response to intraperitoneal injection of nickel and silica nanoparticles and administration of oleaster oil by gavage.

In conclusion, the present study showed that exposure to Ni-NPs and SiO₂-NPs causes disturbances at the organism level, which are mitigated by the use of oleaster oil, with high antioxidant potential to contract the oxidative stress induced by these NPs.

Key words: Nanoparticles; Nickel; Silica; Oxidative stress; Oil of oleaster.

المخلص

تشمل الدراسة الحالية تقييم التأثيرات السامة لجسيمات النيكال النانوية و جسيمات السيليس النانوية على وظائف حيوية معينة للفئران البيضاء من جنس ذكر ذات الفصيلة (Albino Wistar) و اختبار التأثير الوقائي لزيت الزيتون (الزبوش) ضد التأثيرات السامة التي تسببها هذه الجسيمات النانوية .

من أجل تحديد النشاط المضاد للأكسدة لزيت الزيتون (الزبوش) ' تم إجراء دراسة كيميائية نباتية أولية من خلال التحليل الكمي للمركبات الفيلونية تلتها اختبارات القدرة على أسر الجذور الحرة ' كشفت النتائج التي تم الحصول عليها عن وجود مستويات كبيرة من إجمالي الفينولات و الفلافونويد مع قوة عالية من مضادات الاكسدة ضد جذور DPPH .

من ناحية أخرى ' أظهرت نتائجنا أن المعالجة بجسيمات النيكال النانوية و جسيمات السيليس النانوية لمدة 21 يوما تسببت في تغيرات خطيرة في الجسم مما أدى إلى اضطرابات أيضية (زيادة الكولسترول في الدم , الدهون الثلاثية و الكولسترول الدهني عالي الكثافة HDL) ' تسمم كبدى (زيادة في نشاط ناقلات الأمين TGO و انخفاض في مستوى الفوسفات القلوي) ' تسمم كلوي (زيادة في تركيز نسبة البول و الكرياتينين) .

بالإضافة إلى ذلك ' لاحظنا أن استخدام الجسيمات النانوية من النيكال و السيليس عمل على ظهور حالة الإجهاد التأكسدي و المتمثلة في زيادة مستوى فوق الأكسدة الليبيدية ' و اختلال في أنظمة الدفاع المضادة للأكسدة و ذلك من خلال انخفاض معدل الجلوتاثيون و نشاط بعض الإنزيمات مضادات الأكسدة المتمثلة في (GsT , CAT , SOD) في حين أن المعالجة بزيت الزيتون (الزبوش) للفئران المعاملة بالنيكل أو السيليس أدت إلى تخفيض بعض مؤثراته الخلوية السامة .

أظهرت النتائج المرضية النسيجية تلفا شديدا في أنسجة الكلى ' الكبد ' القلب و الخصيتين . تسببت تراكيز جسيمات النيكال النانوية البالغة 50 مجم/كجم و جسيمات السيليس النانوية البالغة 100 مجم/كجم في احتقان الأوعية الدموية ' و تمدد الأنابيب الكلوية ' و تسلل الخلايا الالتهابية ' بالإضافة إلى إفراز الخلايا الظهارية من الأنابيب المنوية الإجمالية والترتيب المضطرب من هذه الخلايا في الأنبوب مع حدوث موت للخلايا (النخر) ' في حين أن مكملات زيت الزيتون (الزبوش) قامت بحماية أنسجة الكبد ' الكلى ' القلب و الخصيتين للفئران عن طريق الحد من هذه الاضطرابات النسيجية . هذه النتائج هي استجابة لحقن جزيئات النيكال و السيليس النانوية عن طريق الصفاق (داخله) و تناول القسري لزيت الزيتون (الزبوش) للتعاقب مع الإجهاد التأكسدي الناجم عن هذه الجسيمات النانوية .

الكلمات المفتاحية : الجسيمات النانوية ' النيكال ' السيليس ' الإجهاد التأكسدي ' زيت الزيتون (الزبوش) .

INTRODUCTION

Introduction

Le développement rapide de la nanotechnologie a conduit à une augmentation du nombre de produits manufacturés contenant des matériaux à l'échelle nanométrique. Parmi les membres les plus importants de cette classe de matériaux, on note celles des nanoparticules de dioxyde de silicium ou silice et des nanoparticules de Nickel, qui ont trouvés avec nombreuses applications dans divers domaines tels que : la biomédecine, l'alimentaire (agents épaississants, additifs alimentaires), les produits cosmétiques ou pharmacologiques (lotions solaires), électronique, textile, les industries chimiques etc impliquant une exposition humaine pendant la production ou l'utilisation (**Napierska et al., 2010 ; Nafisi et Hägg, 2014**).

La nanoparticule métallique de nickel (NP-Ni) s'accumule dans l'organisme et provoque des effets toxiques à court et/ou à long terme. Elle peut affecter le système nerveux et les fonctions rénales, hépatiques et respiratoires (**Harber et al., 2000**). La nature de leur toxicité peut varier en fonction de la forme sous laquelle ils pénètrent dans l'organisme (métal lui-même, vapeur, dérivés inorganiques ou organiques, hydro-ou liposoluble...etc.). Le nickel se présente sous des formes chimiques différentes, mais il ne pénètre efficacement dans les cellules que sous la forme cationique bivalente (Ni^{2+}) ou sous forme de chlorure ou de sulfate de nickel. Il peut provoquer des lésions directes sur tous les composants cellulaires : peroxydation des lipides, protéines et des acides nucléiques, dues aux attaques des radicaux libres générés par le nickel (**Audrey et al., 2015**). Avec ces radicaux ou indirectement en produisant des peptides comme le glutathion (**Lou et al., 2013**). De nombreuses études rapportent une production massive d'espèces oxydantes et l'inhibition des activités des enzymes antioxydantes principales due à la cytotoxicité de Ni dans la cellule ce qui peut favoriser une mort cellulaire excessive ou une évolution tumorale (**Laib et Zeribit, 2019**). Les effets oxydatifs de ces nanoparticules métalliques peuvent être réduits par les antioxydants endogènes et exogènes puissants protégeant le corps contre les attaques des radicaux libres (**Hattiwale et al., 2013**).

Cependant, la nanoparticule de silice (NP-SiO₂) est biocompatible donc se déplace dans les tissus sans être détruite par les macrophages, en plus elle possède une luminescence qui lui est propre lorsqu'elle est en présence d'un rayonnement infrarouge, elle est donc détectable et identifiable. Ces deux qualités sont primordiales en médecine pour être utilisées comme vecteurs de médicaments, dans la thérapie génique et l'imagerie moléculaire. (**Goodman et al., 2008**).

Par ailleurs, les interactions des nanoparticules avec les systèmes biologiques, et leur toxicité potentielle, sont actuellement mal comprises. Le risque sanitaire associé reste donc difficile à évaluer. Cependant, une attention particulière doit être portée à la toxicité des nanoparticules, car celles de la silice (NPs-SiO₂) sont parmi les cinq nanomatériaux les plus couramment utilisés, répertoriés dans les produits de consommation nanotechnologiques par le Woodrow Wilson International Center for Scholars (**Hansen et al., 2008**).

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes et les huiles végétales qui sont considérées comme source énorme de multiples substances douées d'activités antioxydantes et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

Dans ce cadre, la présente étude s'est intéressée, à l'effet de l'huile d'oléastre qui est utilisée notamment en pharmacologie en raison de la présence de composés phytochimiques abondants. Ainsi sa forte teneur en acide oléique, connu comme étant capable de diminuer les taux de cholestérol total et de cholestérol-LDL, qui serait associée à une baisse des maladies cardiovasculaires (**Kirsty et al., 2000**). De même les composés mineurs de l'huile comme les phytosterols, les caroténoïdes, les tocophérols et les phénols hydrophiles (**Perez-Jimenez, 2005**) ont un effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (MCV) et protègent contre l'oxydation cellulaire par les radicaux libres (**Huang et al., 2008**).

En ce qui concerne l'huile de l'oléastre très peu d'informations sur sa composition et ses effets pharmacologiques potentiels sont connues ; trop peu de gens peuvent prétendre savoir que l'oléastre donne une huile appréciée notamment en pharmacologie (**Boualem, 2009**) mais jusqu'à présent mis à part quelques indications thérapeutiques avancées par quelques paysans algériens parmi lesquelles on peut citer: élimination du mauvais cholestérol, les affections broncho-pulmonaires, rhumatisme et arthrose; les vertus supposées de cette huile ne sont pas connues.

C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail qui a pour objectif d'étudier d'une part les effets toxiques de la nanoparticule de silice et de la nanoparticule de nickel sur certaines fonctions vitales et sur le stress oxydant chez le rat, et d'autre part, de tester l'effet modulateur de l'huile d'oléastre contre la toxicité de ces nanoparticules.

Afin de présenter l'étude menée dans ce domaine, nous allons dans un premier temps rappeler l'état des connaissances bibliographiques sur les nanoparticules de silice et de nickel,

le stress oxydatif et l'huile d'oléastre. L'étude expérimentale utilisant comme support animal le rat blanc male de la souche « *Albino Wistar* ». Notre investigation a comporté deux parties :

La première partie présente une étude physicochimique de l'huile d'oléastre pour avoir quelques informations concernant sa qualité chimique et son activité antioxydante in vitro.

La deuxième partie expérimentale, consiste à évaluer l'effet modulateur de l'huile vis-à-vis les effets toxiques et le stress oxydant induits par les nanoparticules de silice et de nickel in vivo au niveau de certains organes.

L'influence des différents traitements ont été analysés par :

- ✓ L'évaluation de certains paramètres biochimiques.
- ✓ L'exploration du profil du stress oxydant hépatique, rénal, pulmonaire, testiculaire et cardiaque : MDA, GSH, GSH-T, SOD et CAT.
- ✓ L'étude histologique de quatre organes cibles (Foie, cœur, reins et testicules).

Et enfin, nous discuterons l'ensemble de résultats obtenus dans cette étude, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Les nanoparticules

1. Définitions

1.1. Nano

Le terme « nano » est utilisé en référence à l'échelle du nanomètre, et plus largement pour les dimensions nettement submicroniques. Aux très petites échelles, de nouveaux phénomènes apparaissent (**Pascale et al., 2004**).

1.2. Nanosciences

Concernent plus précisément l'étude des phénomènes observés dans des objets, des structures, des systèmes dont la taille est de quelques nanomètres dans au moins une des dimensions de l'espace et dont les propriétés découlent spécifiquement de cette taille nanométrique (c'est-à-dire qu'elles sont différentes de celles d'un objet, d'un système ou d'une structure, similaire de taille plus importante) (**Alain, 2008**).

1.3. Nanotechnologies

Sont à la fois un ensemble d'outils, d'instruments, de techniques qui permettent aux nanosciences de progresser en offrant des moyens d'étudier, manipulé, fabriqué, mesurer, les objets nanométriques. Ce sont aussi les applications issues des nanosciences, à l'instar des nanomatériaux ou des nano composants (**Alain, 2008**).

1.4. Nanomatériaux

Un nanomatériau est un matériau possédant des propriétés particulières à cause de sa structure nanométrique. Cette structure est habituellement issue de la nanotechnologie (**Djighboub, 2010**).

1.5. Nanoparticules

On appelle nanoparticule une particule de taille comprise entre 1 et 100 nm. Les matériaux de cette taille confèrent souvent des propriétés physiques et chimiques uniques et nouvelles, non rencontrées avec les matériaux de plus grande taille. Les nanoparticules trouvent des applications dans de nombreux domaines allant du biomédical à la cosmétique en passant par la catalyse (**Lakhal, 2016**) (Figure 1).

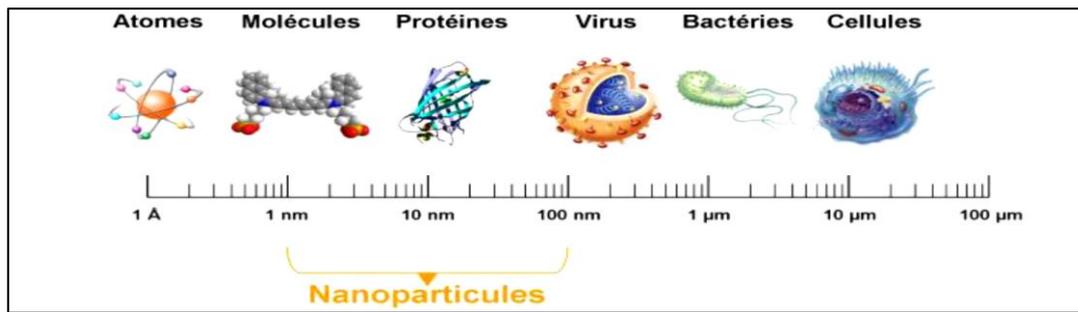


Figure 1. Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques (Tomalia, 2004).

2. Sources des nanoparticules

2.1. Nanoparticules naturelles

Ils sont produits par différents phénomènes dont la condensation de gaz dans l'atmosphère, mais aussi l'activité volcanique, les feux, les marées, l'érosion (Djaalali et Gouasmia, 2018).

2.2. Nanoparticules anthropiques

2.2.1. Origine anthropogénique non-intentionnelle

Ou appelée aussi accidentelles issues des procédés chauds tels que le soudage des métaux ou encore la combustion des moteurs (Pailleux, 2012).

2.2.2. Origine anthropogénique intentionnelle

Qui sont directement manufacturés par l'homme sous forme de nanomatériaux (Pailleux, 2012).

3. Types des nanoparticules

3.1. Nanoparticules organiques

3.1.1. Les polymères

De nombreux polymères organiques sont produits dans des dimensions nanométriques. En citons le chlorure de polyvinyle, le polystyrène ou encore le latex. Réduits à l'échelle nanométrique, ces composés peuvent être, dans certaines conditions, solubilisés ou modifiés chimiquement. Plusieurs de ces polymères organiques sont à même d'être préparés sous forme de nano-fils (Guitto, 2014).

3.1.2. Les nanoparticules d'inspiration biologique

Les nanoparticules d'inspiration biologique sont très diversifiées mais regroupent normalement des structures dans lesquelles une substance biologique est encapsulée, emprisonnée ou absorbée à la surface. Ces structures, largement étudiées dans le domaine médical et pharmacologique (**Hansen, 2009**).

3.2. Nanoparticules inorganiques

3.2.1. Les métaux

A majorité des métaux ont été ou peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Parmi ceux-ci, les nanoparticules d'or sont particulièrement étudiées. Leurs propriétés uniques permettent d'envisager une série d'applications, notamment comme marqueur optique pour le diagnostic médical ou comme agent de traitement contre le cancer (**Boukhallout et Touati, 2016**).

3.2.2. Les oxydes métalliques

Plusieurs oxydes métalliques de dimension nanométrique ont été créés mais les plus courants, car produits à grande échelle, sont probablement la silice, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc. Ils sont utilisés principalement dans la synthèse des plastiques et du caoutchouc en tant qu'agents actifs et d'additifs (SiO_2), des crèmes solaires (TiO_2 , ZnO) et de pigments pour la peinture (TiO_2). Différents oxydes métalliques sont apparus sous formes variées : nanotubes, nano-tiges, nano-flocons, etc (**Boukhallout et Touati, 2016**).

4. Propriétés et applications

Les nanoparticules métalliques représentent l'essentiel des nanomatériaux utilisés. Celles-ci présentent en effet des propriétés uniques et avantageuses par rapport aux matériaux macroscopiques de même nature. Ainsi, leur taille leur confère tout d'abord une réactivité supérieure (**Poole et Owens, 2003**).

Les propriétés mécaniques de certaines nanoparticules permettent également d'améliorer la résistance des matériaux, tandis que d'autres possèdent des propriétés électriques permettant de modifier la conductivité de matériaux isolants (cas des nanotubes de carbone).

Les propriétés optiques de particules de TiO_2 ou ZnO , dont les dimensions sont inférieures aux longueurs d'ondes du visible (transparence) mais qui absorbent dans les UV, sont largement employées dans la fabrication de verres, produits cosmétiques, crèmes solaires, ou en tant que

colorants pour les dentifrices ou les peintures. Plusieurs nanoparticules métalliques sont également utilisées en tant que colorants, additifs ou conservateurs dans les produits alimentaires.

Enfin, certaines nanoparticules présentent aussi des propriétés magnétiques (oxydes de fer), catalytiques, ou d'inflammabilité qui trouvent également des applications variées (AFSSET, 2010).

Les nanoparticules possèdent de nombreuses propriétés qui peuvent donc conduire à un large domaine d'applications industrielles ; Les nanoparticules métalliques occupent une place de plus en plus importante, tant dans les procédés industriels que dans la recherche biomédicale. Néanmoins, les données sur leur toxicité potentielle pour les organismes vivants restent insuffisantes, notamment à l'échelle moléculaire (Pailleux, 2012) (Figure 2).

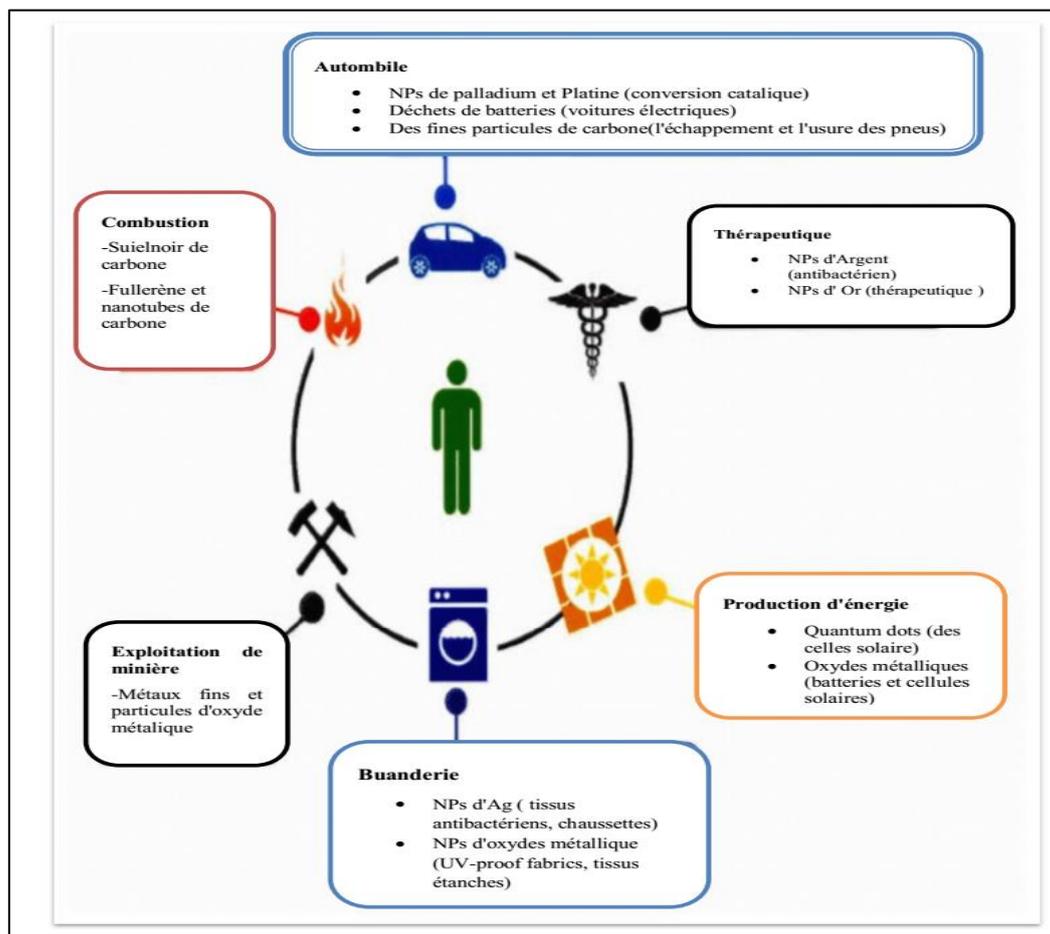


Figure 2. Utilisation des nanoparticules pour diverses applications (Domingos et al., 2009).

5. Les nanoparticules de dioxyde de silicium

Le dioxyde de silicium est le composé chimique de formule SiO_2 , c'est un minéral très abondant dans l'écorce terrestre (55% en masse) (**Chettah. 2014**).

Elle existe à l'état libre sous forme cristalline ou amorphe et à l'état combiné sous forme de silicates. Outre son occurrence naturelle, ce minéral très dur, blanc ou transparent peut également être d'origine industrielle (**Ricaud. 2007**).

Selon les méthodes de synthèse, elle peut se présenter sous des formes très variées (comme les fibres, les sols, les gels, les particules...) qui permettent l'accès à un grand nombre d'applications. On la retrouve en tant que matériaux de structure pour améliorer les propriétés mécaniques, en tant que support de catalyseurs, comme agent de séparation en chromatographie ou encore comme matériau fonctionnalisé lorsque les silanols de surface réagissent avec une molécule donnée en particulier pour des applications biologiques (**Chettah. 2014**).

La silice peut se trouver sous trois formes allotropiques (même composition chimique, mais avec des arrangements atomiques différents) : cristalline (ordre cristallographique à longue distance), vitreuse (ordre à courte distance) et amorphe (absence d'ordre). La structure obtenue par oxydation thermique est la silice vitreuse. Elle est amorphe dans le cas d'un mauvais contrôle de la croissance de l'oxyde (**Chettah. 2014**).

L'unité structurelle de base de la silice est un atome de silicium entouré de quatre atomes d'oxygène constituant les sommets d'un tétraèdre (**Chettah. 2014**).

6. Les nanoparticules de nickel

Le Nickel est un métal blanc brillant de numéro et de masse atomique respectivement 28 et 58.7, il est classé parmi les métaux de transition qui fait partie du groupe des métaux non-ferreux. Le Nickel sous forme d'ions, se présente essentiellement sous degré d'oxydation +2. Il peut se présenter au degré +3 et très exceptionnellement au degré +4. Au degré d'oxydation +2, le Nickel donne d'une manière générale des composés de couleur verte (**Wang et al.,2008**).

Le nickel est un métal de transition voisin du fer et de cobalt, de couleur gris clair, légèrement jaunâtre sous sa forme pure. Il est ferromagnétique, avec un point de Curie de 353°C . Il est résistant à la corrosion aux températures ordinaires et s'allie facilement avec

d'autres métaux, d'où son usage majeur pour les aciers inoxydables très largement utilisés et divers alliages. Le nickel absorbe facilement l'hydrogène et a des propriétés catalytiques.

C'est un allergisant cutané pour environ 12% de la population (bracelets de montre, Bijoux fantaisie...) (Wang *et al.*,2008).

7. Toxicité des Nanoparticules

Afin de mieux répondre aux interrogations soulevées par l'utilisation croissante des nanomatériaux, la nano toxicologie se développée parallèlement aux nanotechnologies, et vise à en étudier les risques éventuels sur l'environnement et la sante.

Ainsi, dans le domaine de la recherche, l'évolution croissante des nanotechnologies est associée à la fois à une augmentation du nombre de journaux spécialisés sur le « nano-monde », et à une augmentation du nombre de publications de nano toxicologie, domaine qui n'existait pas il y a encore dix ans. Ainsi, les données sur la toxicité potentielle des nanoparticules vis-à-vis des systèmes biologiques ne cessent de s'accroître.

Cependant, si la nanotoxicologie générale prend de plus en plus d'ampleur, la nanoecotoxicologie se développée beaucoup moins rapidement, et peu de données concernant encore l'impact des nanoparticules manufacturées sur l'environnement et les écosystèmes (Kahru et Savolainen, 2010) (Figure 3).

Des recherches approfondies sont en cours pour évaluer la nano toxicité de différents nanomatériaux dans diverses expositions et de définir les facteurs de risque (Bettazzi et Palchetti, 2019). Pour ce là, les nanoparticules constituent un problème toxicologique émergent indiscutable (Massea et Boudéne, 2008).

Les études de nanotoxicité sont disponibles à ce jour, on utilise des modèles cellulaires in vitro, qui sont constitués par une grande variété de lignées continues diploïdes ou de cellules primaires, parmi lesquelles des cellules nerveuses, pulmonaires, hépatiques, sanguines, épithéliales ou endothéliales, phagocytaires, ou encore cancéreuses. Certaines études sont aussi menées sur des microorganismes (E.coli...), ou des levures (S.cerevisiae) (Triboulet, 2013).

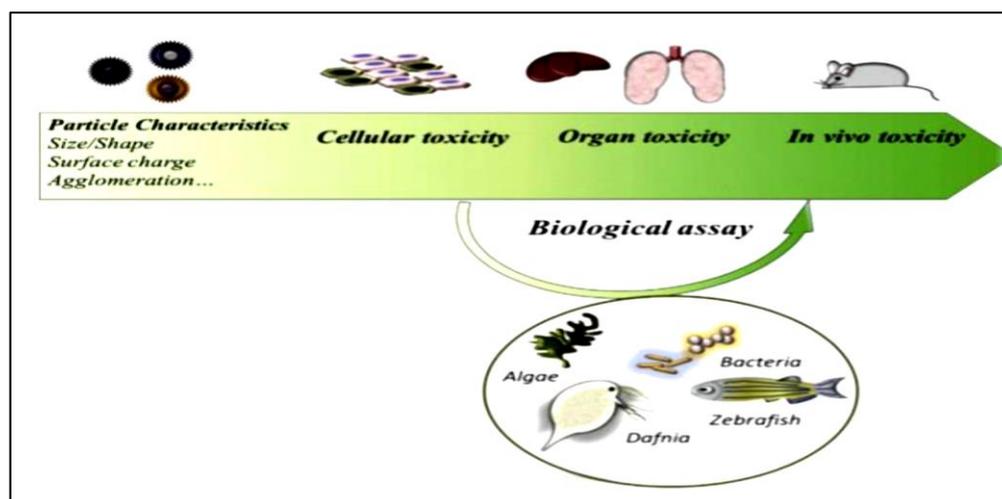


Figure 3. Flux de travail impliqué dans l'évaluation de la nano toxicité et de la nano écotoxicité (Bettazzi, Palchetti ,2019).

8. Devenir des nanoparticules dans l'organisme

Afin de mettre en évidence une éventuelle toxicité des nanoparticules, il est nécessaire de déterminer le devenir de ces éléments dans l'organisme, c'est-à-dire leur cinétique qui regroupe l'ensemble du processus **ADME** (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) (Guitou, 2014). Grâce à leur petite taille, les nanoparticules sont capables de passer les barrières biologiques et physiques et ainsi diffuser ou se distribuer dans tout l'organisme (Pailleux, 2012). Dans un premier temps ces substances (médicament ou toxique) sont absorbées. Cela correspond à son passage dans la circulation sanguine. Elle est ensuite distribuée aux différents organes et peut subir un métabolisme (ou biotransformation) au niveau du foie. Enfin elle peut être éliminée par voie rénale, biliaire ou fécale (Guitou, 2014).

En peut détaillais ces processus comme suit :

8.1. Absorption

Il est considéré classiquement que les nanoparticules peuvent rentrer au contact direct avec l'organisme par trois voies essentielles : respiratoire, cutanée, et digestive (Boczkowski et Lanone, 2010).

8.1.1. Voie respiratoire

C'est la voie de pénétration la plus fréquente en milieu de travail (Prosie et al, 2008). Elles se déposent en fonction de leur granulométrie à des niveaux différents des voies respiratoires (Rapport du Comité de la Prévention et de la Précaution, 2020). Lorsqu'elles arrivent dans

le système respiratoire, elles ne sont pas arrêtées comme d'autres particules plus fines au niveau des bronches ; au contraire, du fait de leur taille, elles peuvent pénétrer profondément dans les alvéoles pulmonaires pour y provoquer des inflammations. Elles peuvent également franchir la barrière pulmonaire et atteindre le système circulatoire (**Association santé environnement France, 2017**) (Figure 4).

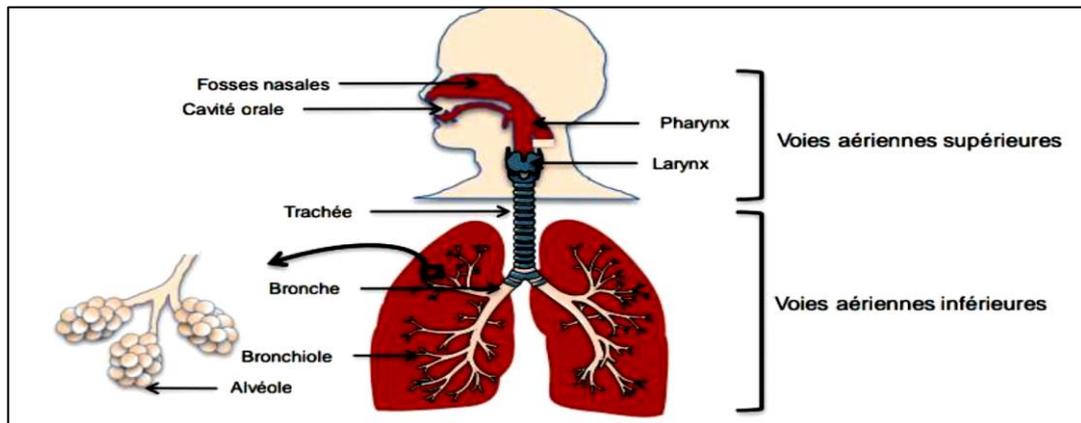


Figure 4. Pénétration des nanoparticules par voie respiratoire (**Andujar, 2016**)

8.1.2. Voie cutanée

Le nombre de produits contenant des nanoparticules pouvant entrer en contact avec la peau est en augmentation (crèmes solaires, produits cosmétiques, textiles, etc.). La peau est constituée une barrière importante dans la protection de l'organisme. Elle se compose de trois épaisseurs : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Pujalté,2011**).

L'exposition aux nanoparticules par voie cutanée est probablement faible en raison du temps long de dépôt sur les surfaces. Les principales nanoparticules susceptibles de pénétrer par voie cutanée sont l'argent utilisé pour le textile, le dioxyde de titane pour les crèmes solaires et l'aluminium dans les déodorants (**Pailleux, 2012**).

8.1.3. Voie digestive

La voie digestive représente une importante voie d'entrée des NPs dans l'organisme via l'ingestion de produits alimentaires, l'eau et de médicaments contenant éventuellement des NPs (**Pujalté, 2011**).

Les nanoparticules peuvent pénétrer de deux façons différentes à l'intérieur du tube digestif (Figure 5). Soit par :

✚ **Ingestion involontaire** : qui peut avoir lieu lorsque le mucus du système respiratoire contient des NPs (Pailleux, 2012).

✚ **Lors de l'inhalation** : une partie des NPs remontant vers le carrefour aéro-digestif, par un mouvement micellaire, peut être ingérée. A ce jour pourtant, peu d'études se sont intéressées à cette voie et les quantités de NPs retrouvées dans l'organisme après ingestion portent à débat (Pujalté, 2011).

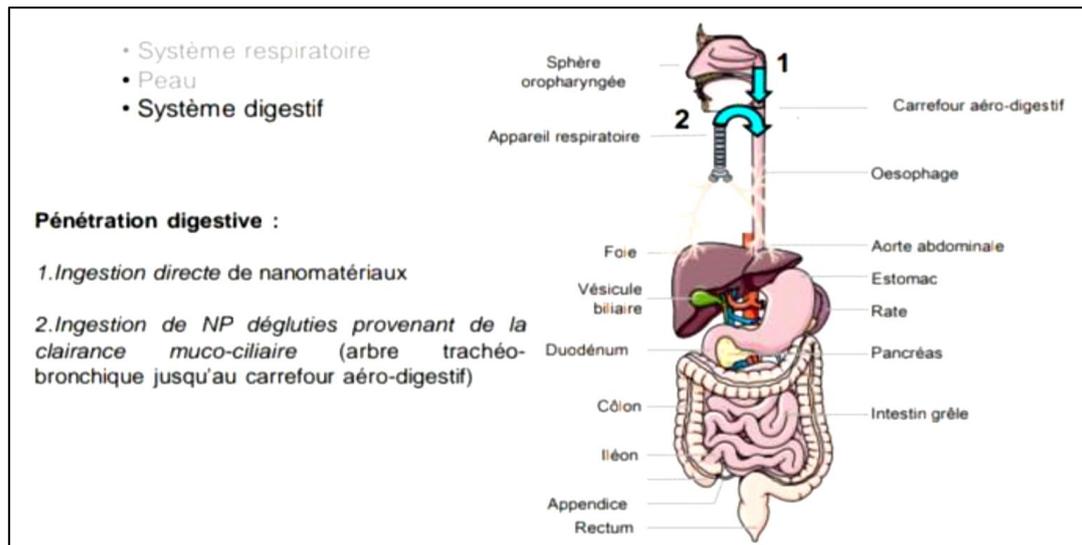


Figure 5. Pénétration des NPs par voie digestive (Andujar, 2016)

8.2. Distribution

La deuxième étape de la cinétique est la distribution de ces nanoparticules aux différents tissus ou organes (foie, rate, cœur, cerveau). A travers le phénomène de la translocation les particules insolubles ou peu solubles, déposées dans la circulation générale, elles peuvent interagir avec les protéines plasmatiques, les facteurs de coagulation, les globules blancs ou les globules rouges (Guitou, 2014).

8.3. Métabolisme et biotransformation

Peu de résultats sont disponibles à ce jour sur le métabolisme concernant les nanoparticules absorbées au niveau du système gastro-intestinal qui rejoignent le foie (organe de métabolisation) par la veine porte (Guitou, 2014).

Selon les recherches institutionnelles de l'IRSST il n'existe pas des données sur la biotransformation des NPs « organiques, inorganiques et à base de carbone » mais les NPs sphériques telle que les fullerènes peut diminuer l'activité enzymatique hépatique du glutathion

(glutathion -S-transférase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) *in-vitro* chez l'humain (foie provenant d'une autopsie), les souris et les rats (Ostiguy *et al*, 2006).

8.4. Elimination

L'élimination des NPs n'est pas comme les composés xénobiotiques (étrangers à l'organisme) traditionnels. On peut néanmoins distinguer deux voies d'élimination (Figure 6) :

✚ **L'élimination chimique** : c'est-à-dire la dissolution des nanoparticules dans des fluides biologiques (Association santé environnement France, 2017).

Cependant, soit par voie rénale ou biliaire pour les nanoparticules ayant gagné la circulation générale (Guitou, 2014).

✚ **L'élimination physique** : qui consiste au transport des nanoparticules vers d'autres sites de l'organisme (Association santé environnement France, 2017). Notamment, par leur « porte d'entrée » si celles-ci ne sont pas absorbées (escalator mucociliaire pour la voie pulmonaire) (Guitou, 2014).

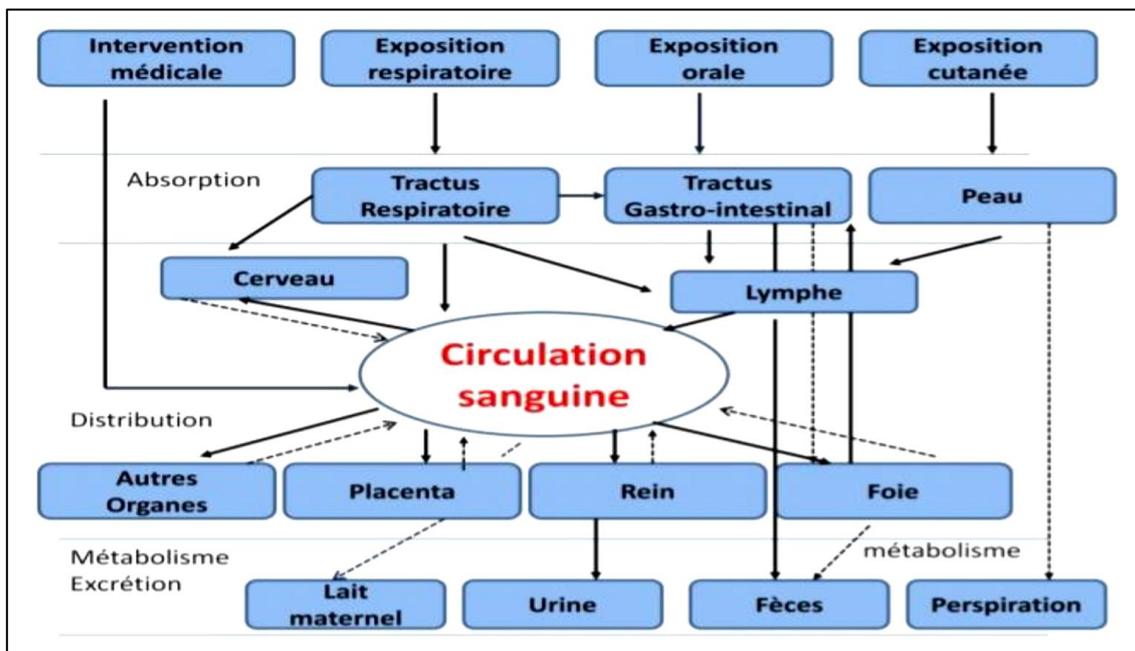


Figure 6. Cinétique des nanoparticules et processus ADME (Guitou, 2014).

Chapitre 2

Le stress oxydatif

1. Définition

Un stress oxydant (Figure 7) est défini comme un ensemble de perturbations de l'équilibre naturel existant entre les espèces pro- et anti- oxydantes, le déséquilibre se faisant en faveur des composés pro-oxydants, ce qui peut conduire à des lésions cellulaires (Kelly, 2003). On évalue le plus souvent le stress oxydatif en mesurant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites dans des conditions données.

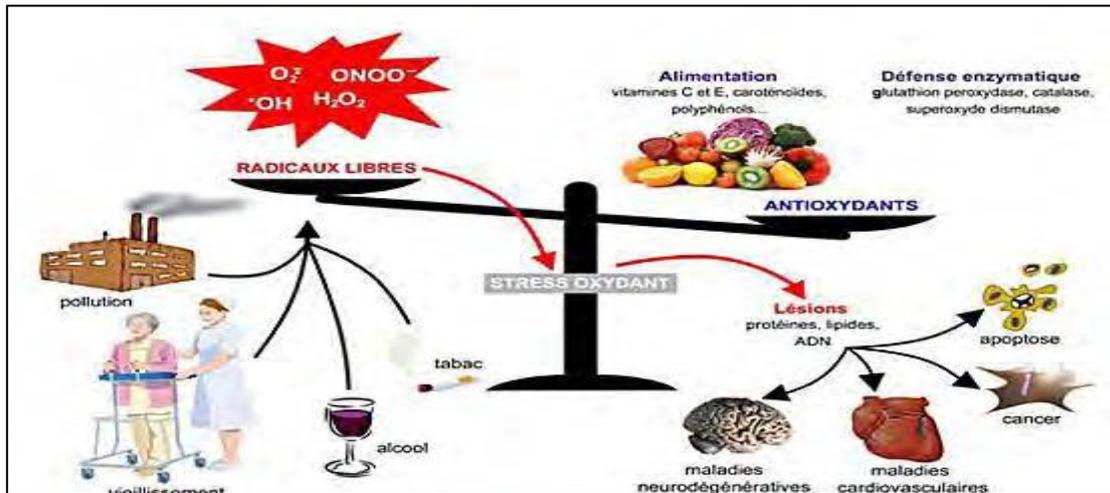


Figure 7. Stress oxydant (Durackova, 2008)

2. Radicaux libres

Ce sont des espèces chimiques instables avec un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs orbitales externes.

Les radicaux libres sont synthétisés en contenu dans la cellule à partir de réactions avec l'oxygène. Ils sont très réactifs car ils cherchent un électron afin de ré-apparier leur électron unique, cette instabilité chimique fait que ces molécules ont la possibilité de réagir avec des structures de la cellule en causant des lésions cellulaires irréversibles (Krötz *et al.*, 2004 ; Bayr, 2005).

3. Types des radicaux libres

Il existe deux types de radicaux libres : espèces réactives de l'oxygène et espèces réactives de l'azote.

3.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont des dérivés de l'oxygène dont certains électrons sont dans un état énergétique

excité et très réactif. Elles représentent la classe la plus importante d'espèces réactives produites dans les organismes vivants et la principale cause de stress oxydatif dans ces derniers (**valko et al., 2007**).

Ce sont soit des espèces active radicalaires de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyde (OH^{\cdot}), les peroxydes (ROO^{\cdot}), ou les alkoxydes (RO^{\cdot}), soit des espèces actives non radicalaire de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou l'ozone (O_3). Les premières dérivent de l'oxygène par les réductions monoélectroniques, alors que les dernières dérivent de l'O et peuvent être des précurseurs de radicaux. (**Noguchi, 2002 ; Krieger, 2005**).

3.2. Espèces réactives azotées

Il s'agit du monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et du peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$). Le monoxyde d'azote est formé de manière endogène au cours du métabolisme de l'arginine par les "nitric oxide synthases" (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L'isoforme inducible iNOS de l'enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, et produire de grandes quantités de monoxyde nitrique par rapport aux faibles quantités générées par l'isoforme endothéliale (eNOS) (**Rao, 2004**).

4. Sources métaboliques des ERO et ERA

4.1. La production intracellulaire

La production des ERO dans les cellules des mammifères provient de différentes origines (Figure 8) principalement d'origine enzymatique. Les oxydases (NADPH oxydase) constituent un "point d'entrée" en produisant l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dont dérivent d'autres ERO. La NOS qui produit de l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) indépendamment de ($O_2^{\cdot-}$) et constitue un autre "point d'entrée" (**Sertejn et al., 2002**). La myéloperoxydase (MPO) produit (HOCl) qui renforce la production des ERO (**Sertejn et al., 2003**). Il existe d'autres enzymes qui sont également des sources de production des radicaux libres comme, les déshydrogénases, oxygénases, cyclo- et les lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase.

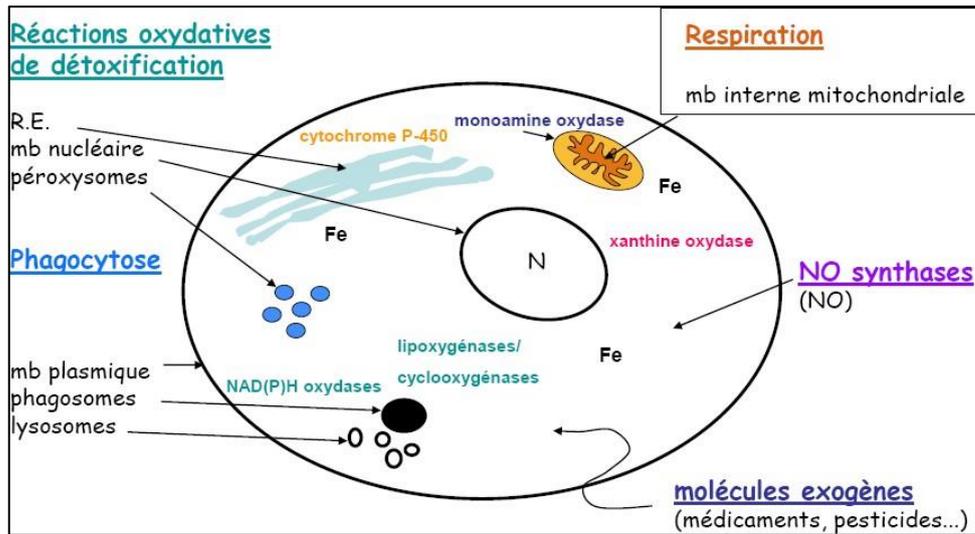


Figure 8. Les Sites de production intracellulaire des radicaux libres (Serteyn *et al.*, 2003)

De même, les radicaux libres sont générés *in vivo* par divers systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages). Des radicaux libres sont également produits sous l'influence de certains facteurs endogènes, notamment le stress mental ou thermique (Ansari, 1997 ; Valko *et al.*, 2006).

4.2. La production extracellulaire

Certains facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également responsables d'une élévation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Les facteurs environnementaux, y compris les agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent être directement ou indirectement associés à la production de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes).

Une exposition durable au soleil, donc aux rayons UV induit la synthèse de $O^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , 1O_2 et d' H_2O_2 l'intermédiaire de l'agent photo sensibilisants (Figure 9) ; (Martinez-Cayuela, 1995 ; Chen *et al.*, 2012).

Le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels), ainsi qu'une alimentation (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la génération de radicaux libres (Figure 9). Une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) ou des situations cliniques (chirurgie, tansplantation) (Mena *et al.*, 2009).

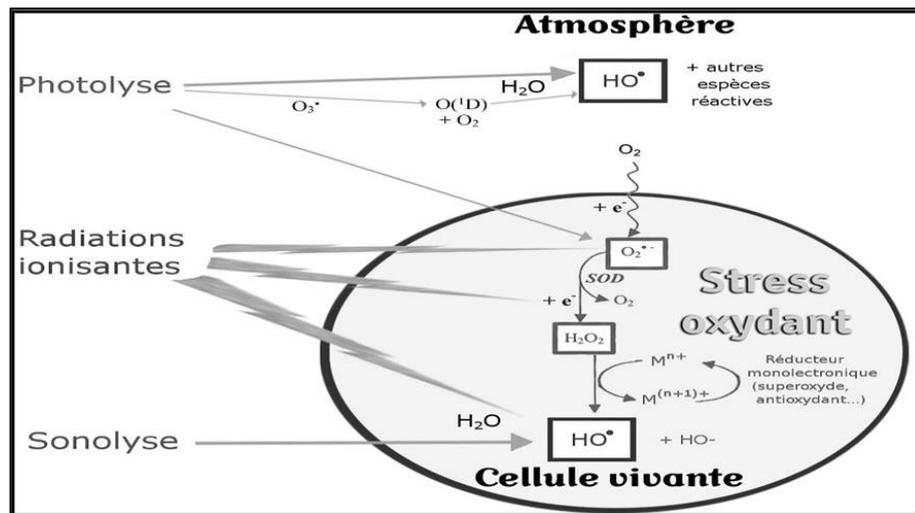


Figure 9. Génération extracellulaire des radicaux libres (Mena *et al.*, 2009).

5. Cibles biologiques des radicaux libres

Les entités oxydantes étant très réactives, elles réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cibles les lipides, les acides nucléiques, les protéines et les sucres (Beckman et Ames, 1998).

5.1. Les lipides

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses doubles liaisons, comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapenténoïque. Les réactions radicalaires sont à l'origine de la peroxydation lipidique qui se traduit *in vitro* par le rancissement. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell et Gutteridge, 1989).

5.2. Les acides nucléiques

Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types : l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, d'adduits intra-caténaux, des cassures des brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).

5.3. Les protéines

Les protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition (Stadtman, 1990). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonfont et

al.,2001).

Tous les acides aminés peuvent être oxydés ; ainsi la méthionine peut se transformer en méthionine sulfoxyde et la tyrosine en nitrotyrosine (Tratner,2003).

5.4. Les sucres

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des anions superoxydes (OH^\cdot), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde (Wolff et al.,1989) formant un dérivé de produit de glycation avancée (AGE, Advanced Glycation End product).

6. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 10). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

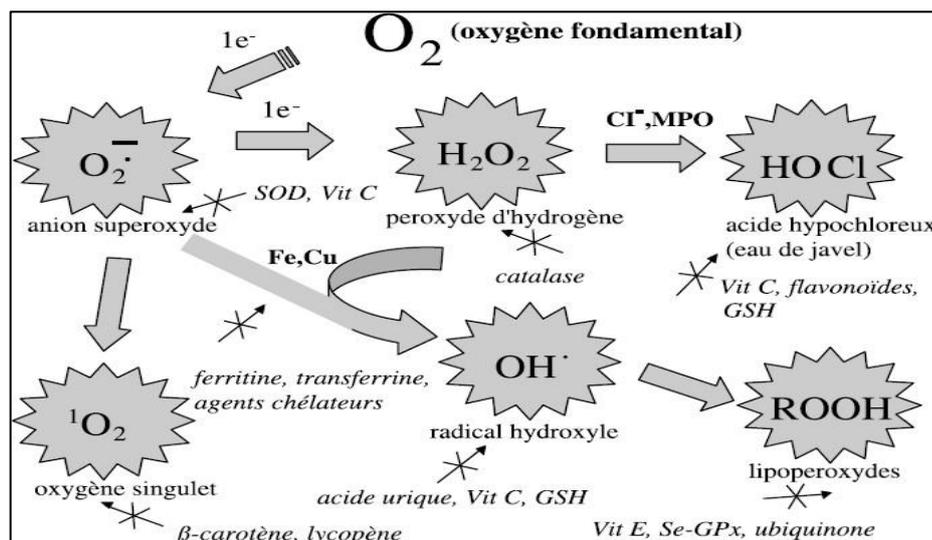


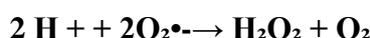
Figure 10. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Milbury et Richer *et al.*, 2008).

7. Différents types d'antioxydants

7.1. Antioxydants enzymatiques

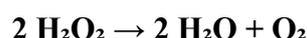
7.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est l'une des plus importantes enzymes (Tableau 1) cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydant « anti- $O_2^{\bullet -}$ » la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale. La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ en dioxygène H_2O_2 et selon la formule (Afonso *et al.*, 2007).



7.1.2. Catalase (CAT)

La catalase (CAT) est une enzyme (Tableau 1) héminique, permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène (Goudable et Favier, 1997).



La réaction catalysée par cette enzyme commence lorsque la liaison (O-O) du peroxyde d'hydrogène subit une coupure par l'atome de fer, en créant une molécule H_2O et un groupement $Fe(IV)=O$ fer-oxygène très oxydant. Celui-ci peut ensuite oxyder une nouvelle molécule de peroxyde d'hydrogène pour donner du dioxygène.

7.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une sélénoprotéine ayant fonction d'enzyme (Tableau 1), formée de quatre sous-unités identiques (homotétramère) contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine (Raman et Berry, 2011). Contrairement à un grand nombre de peroxydases, elles ne sont pas hémiques.

La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en oxydant deux molécules de glutathion GSH réduites en glutathion oxydé (GSSG). Elle assure plus largement la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment de type ROOH, en alcools (ROH) (Halliwell et Gutteridge, 2008 ; Raman et Berry, 2011).



7.1.4. Glutathion S-transférase

Glutathion S-transférase est une famille des enzymes (Tableau 1) multifactorielles présentes chez tous les organismes (**Renuka et al., 2003**). La glutathion-S-transférase (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhihua et al., 2004**).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit :



7.1.5. Thiorédoxine réductase

Cette enzyme (Tableau 1) est capable de catalyser la réduction de nombreux substrats, mais dépend du NADPH comme donneur d'électrons, qui sont d'abord transférés au groupe FAD fixé à la protéine, donnés ensuite au groupe dithiol N-terminal d'une sous-unité puis alors au groupe sélényl-sulfide de l'autre sous-unité qui réduit enfin à son tour la thiorédoxine (**Raman et Berry, 2011**).



7.1.6. Glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase (GSSG-Red) régénère le glutathion réduit à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme cofacteur (**Deaton et al., 2003**), est localisée avec la glutathion peroxydase, elle se trouve dans le cytosol et les mitochondries (**Butterfield et al., 2002**).

7.2. Antioxydants non enzymatiques

7.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Packer et al., 1997 ; Power and Lennon, 1999**). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) (Figure 11) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Ji et al., 1992**).

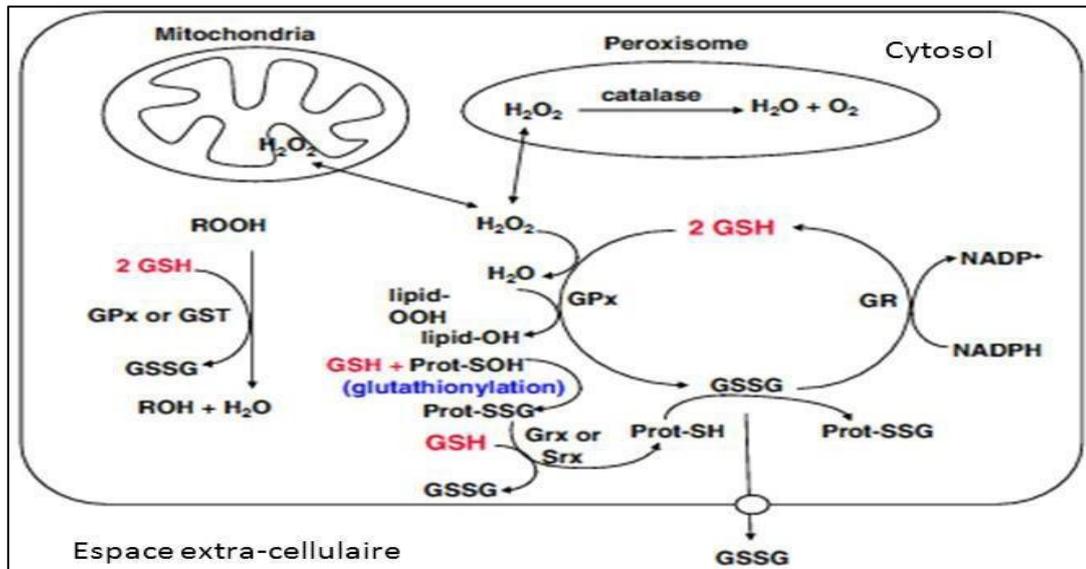


Figure 11. Les réactions impliquant le glutathion (Lu, 2013)

7.2.2. Acide urique

L'acide urique est le produit de dégradation des composés puriques comme la xanthine et l'hypoxanthine (Villasante *et al.*, 2010).

L'ion urate est la forme anionique d'acide urique. Il réagit avec plusieurs espèces réactives aux potentialités oxydantes assez fortes tels que ROO^\bullet , HO^\bullet , $ONOO^-$, NO_2^\bullet et l'oxygène singulet. Cette réactivité donne naissance au radical urate relativement stable et très bien réduit par l'acide ascorbique (vitamine C), intégrant bien l'urate au sein de la défense anti-oxydante (Halliwell et Gutteridge, 2008).

7.2.3. Tocophérol (Vitamine E)

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2 (Singh *et al.*, 2005).

7.2.4. Caroténoïdes (Vitamine A)

Les caroténoïdes (Tableau 1) sont une classe de pigment naturels présents principalement dans les plantes et les fruits et qui ont typiquement 40 atomes de carbone et plusieurs doubles liaisons conjuguées (Qian *et al.*, 2012) ils sont synthétisés par les plantes et de nombreux microorganismes (Bai *et al.* 2016). Parmi les caroténoïdes, le β -carotène possède l'activité pro vitaminique la plus élevée. Il pourrait donc constituer un bon élément pour l'incorporation dans les aliments fonctionnels (Boon *et al.*, 2010).

7.2.5. Acide ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique ou vitamine C (Tableau 1) est un antioxydant omniprésent dans les plantes. Il joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et le métabolisme cellulaire (foyer *et al.*, 1994). Il est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydantes. La vitamine C est synthétisée à partir de D-glucose et agit comme un réducteur dans le cytosol et les chloroplastes (Chen et Gallie, 2004 ; Foyer et Noctor, 2005). Elle se lie avec le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux de tocophérol pour donner de l'acide monodéhydroascorbique (MDHA) ou de l'acide déhydroascorbique (DHA).

De plus, elle exerce son action antioxydante en synergie avec le bêta- carotène, le sélénium et le zinc pour piéger l'excédent de radicaux libres présents dans l'organisme, ainsi elle permet de régénérer la vitamine E pour limiter la peroxydation lipidique. (Haleng *et al.*, 2007).

7.2.6. Oligoéléments

À concentration physiologique, les oligoéléments comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le sélénium (Se), jouent un rôle important en tant que cofacteurs enzymatiques, indispensables au bon fonctionnement des enzymes exerçant un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif. À titre d'exemple, le cuivre, le zinc et le manganèse sont des cofacteurs de la SOD (Cu/ Zn-SOD, Mn-SOD), le sélénium présent dans le site actif de l'enzyme GSH-GPx jouerait également un rôle primordial dans la lutte contre les radicaux libres, (Cartes *et al.*, 2005) comme il intervient aussi dans l'activité de différentes sélénoprotéines (Steinbrenner et Sies, 2009).

Tableau 1. Les principaux anti-oxydants et leurs modes d'action (Powers et Jackson, 2008).

Catégorie d'antioxydants	Nom	Modes d'action principaux
Enzymatiques	SOD	Piège $O_2^{\cdot-}$
	GPX	Inactive H_2O_2 et ROOH
	CAT	Inactive H_2O_2
Non enzymatiques liposolubles	Vit E	Piège $O_2^{\cdot-}$ et $\cdot OH$, lutte contre lipoperoxydation (piège $ROO\cdot$)
	Caroténoïdes	Inactivent $1O_2$ piègent $ROO\cdot$
Non enzymatiques hydrosolubles	Vit C	Piège certaines ERON, recycle vit E
	GSH	Cofacteur de GPX, protection des protéines thiols par s-glutathioxylation
	Acide urique	Piège certaines ERON (donne e^-)
	Bilirubine	Inactive H_2O_2 , lutte contre lipoperoxydation (piège $ROO\cdot$)
	Acide α -lipoïque	Piège certaines ERON, chélate métaux libres, recycle vit E et vit C
	Métaux de transition	Cofacteurs de SOD (Cu, Zn, Mn),(Se) et CAT (Fe)
	Protéines de transport	Chélatent les métaux de transition libres
	Flavonoïdes	Luttent contre lipoperoxydation, piègent $\cdot OH$, NO_3^- , $HClO$

8. Nanoparticules et stress oxydatif

Le stress oxydant peut-être dû à des facteurs exogènes, tels que l'exposition à des radiations ou des agents cancérigènes, le tabagisme, la prise de certains médicaments ou d'alcool, la présence d'agents infectieux, mais aussi de polluants atmosphériques, ou de particules

(Forman, H.J., and Torres, M., 2002).

En effet, la plupart des travaux sur la toxicité des nanoparticules mettent en évidence une relation entre l'exposition aux nanomatériaux et la production de ROS, particulièrement dans le cas des NPs métalliques, notamment du fait de leur nature chimique (**Park et al., 2008 ; Karlsson et al., 2008 ; Sharma et al., 2011**).

Les métaux qu'ils comportent peuvent en effet interférer avec les métaux intracellulaires et troubler leur homéostasie (**Kao et al., 2012**). Des études suggèrent en outre que ces perturbations seraient en partie dues à la dissolution partielle des NPs en ions métalliques (**Xia et al., 2008 ; Song et al., 2010**). Néanmoins, si les ions ont leur propre toxicité sont effectivement capables de produire des ROS au niveau cellulaire, ils n'expliquent pas toujours la toxicité des stress oxydatif et nanoparticules (**Midander et al., 2009 ; Shaw and Handy, R.D., 2011**).

Chapitre 3

L'huile d'oléastre

1. Généralités sur l'oléastre

1.1. Définition

L'oléastre est un arbre appartenant à la famille des oléacées dont la matière de base est l'oléine (Sidi Mammam, 2012). C'est un arbre très rameux et épineux à branches quadrangulaires et à feuilles très petites (Beddiar et al., 2007). Cette espèce est bien adaptée aux conditions de stress hydrique, par conséquent elle est utilisée comme porte greffe et dans le reboisement des zones arides et semi-arides (Caravaca et al., 2002). L'oléastre est présent sous deux formes non distinguables morphologiquement, soit indigène soit dérivant de descendants ensauvagés d'oliviers ou « féral » (Besnard et Bervillé, 2000).

1.2. Distribution

L'olivier (*Olea europaea subsp europaea var europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (Lavee, 2013).

L'olivier est originaire des régions tropicales et chaudes, en particulier les zones côtières de la Méditerranée orientale, du Liban, parties maritimes de l'Asie Mineure, et le Nord de l'Iran, jusqu'à l'extrémité sud de la mer Caspienne (FAO/WHO, 2003).

Les divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) (Breton et al., 2008). Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts natales de la Méditerranée où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux (Lumaret et al., 2004).

Selon Chevalier (1948), L'*Olea europea var. oleaster* proviendrait de noyaux perdus ou d'arbres cultivés antérieurement puis abandonnés, donnant des populations d'individus qui retournent à l'état sauvage. En effet cet auteur appuie son hypothèse sur le fait qu'il existe des formes très différentes d'*Olea europea var. oleaster* dans les forêts des régions où l'on cultive depuis longtemps l'olivier (Algérie, Tunisie, Maroc, Syrie, etc....).

L'*Olea euromediterranea oleaster* ou *Olea oleaster* Hoffm et Link ou *Olea sylvestris* MILL, plus communément dénommé en Afrique du Nord Oléastre. Ces formes spontanées sont

répandues notamment en Espagne, au Portugal, en Afrique du Nord, en Sicile, en Crimée, au Caucase, en Arménie et en Syrie (**Breton et al., 2006**).

L'origine de l'olivier à partir de l'oléastre ne fait plus de doute à l'est comme à l'ouest de la mer Méditerranée (Figure 12). Cependant, la diversité de l'oléastre et de l'olivier est maximale à l'ouest.

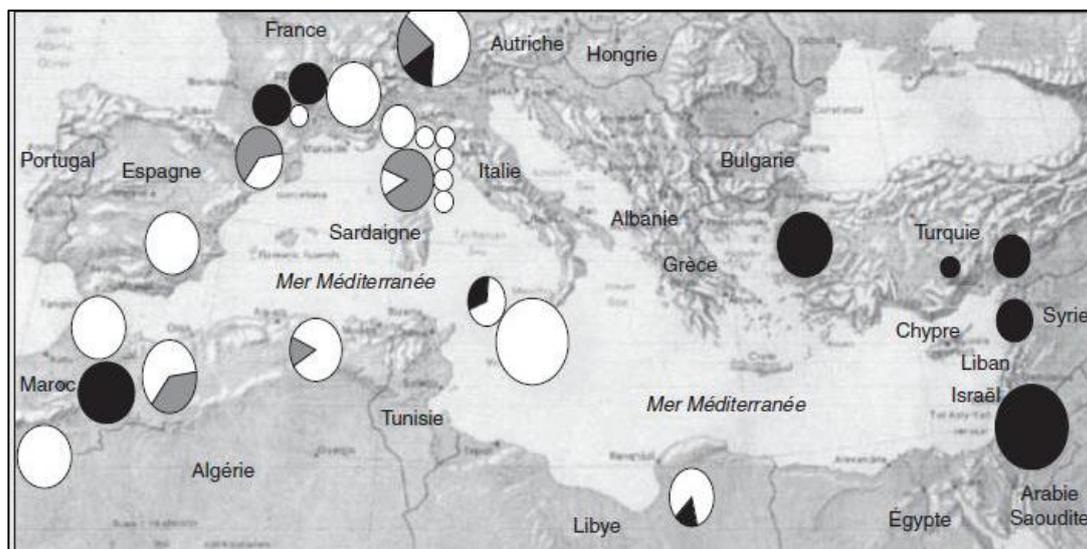


Figure 12. La localisation actuelle des populations d'oléastres (olivier sauvage). Les ovales, selon leur taille, indiquent le nombre d'individus par peuplement (**Breton et al., 2006**).

Il existe en Algérie, un arbuste nommé « Oléastre » très intéressant dans le domaine sanitaire et en l'état actuel des choses, personne ne peut affirmer si nos oléastres appartiennent aux populations férale, c'est-à-dire, des oléastres issus d'oliviers ayant été cultivés ou aux vraies populations sauvages. Il en est de même de l'huile d'oléastre (**Sidi Mammar, 2012**).

1.3. Facteurs influençant la répartition

Méditerranéen par définition, l'olivier a besoin de lumière et de chaleur, mais d'autres critères doivent être respectés pour son épanouissement, le climat et le sol (**Gherib Asma, 2015**).

L'olivier pousse en zone semi-aride à climat tempéré, sur des sols bien drainés avec un pH au-dessous de 8,5, et sont raisonnablement tolérants aux sols légèrement salins. Ils montrent une rusticité au froid et une tolérance aux températures aussi basses que $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Doveri et Baldoni, 2007**).

1.4. Aspect botanique

1.4.1. Systématique

➤ **Taxonomie du genre *olea* : (Cronquist, 1981)**

▪ **Embranchement** : *Magnoliophyta*.

▪ **Sous embranchement** : *Magnoliophytina*.

▪ **Classe** : *Magnoliopsida*.

▪ **Sous classe** : *Asteridae*.

▪ **Ordre** : *Scrophulariales*.

▪ **Famille** : *Oleaceae*.

▪ **Genre** : *Olea* L.

▪ **Espèces** : *Olea europaea* L.

▪ **Sous-espèces** :

▪ *Olea europaea* L. ssp. *Sativa* Hoffm et Link (= *O. europaea* L. ssp. *Europaea*).

▪ *Olea europaea* L. ssp. *Oleaster* Hoffm et Link (= *O. europaea* L. ssp. *sylvestris* Miller).

➤ **Noms vernaculaires**

L'oléastre (olivier sauvage) :

✓ *Azzemmour*, désigné sous cette appellation en Kabylie et dans le haut Atlas au Maroc (Boudribila, 2004).

✓ Arabe : zebbouj, berbère : Azemmour (Jacques-Meunié, 1982).

✓ Arabe. : zenbotidje, berbère : Tazebboujt (De Candolle, 1883).

✓ L'olivier greffé : arabe : zitoun, berbère : Tazemmourt (De Candolle, 1883).

1.4.2. Description botanique

✓ Oléastre

L'olivier sauvage est un arbrisseau toujours vert et vivace qui croît spontanément dans les bois méditerranéens. Ses rameaux sont épineux et de section presque carrée.

✓ Feuilles

Les feuilles sont simples, ovales, persistantes et opposées ; elles sont blanches argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure. Elles sont plus petites que celles de l'olivier cultivé.

✓ Fleurs

Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétales, sont réunies en grappes dressées. Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (**Bruneton, 1999 et Ghedira, 2008**).

✓ Fruits

Ses fruits sont également plus petits, avec une faible épaisseur de pulpe, et ils donnent donc peu d'huile. De par sa faible hauteur, les fruits de l'oléastre sont facilement consommés par les animaux : la dissémination des noyaux est zoochore (**Comte, 1990**), (Figure 13).

L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille avec moins de mésocarpe, une faible teneur en huile et par un stade juvénile long (**Terral et Arnold-Simard, 1996**). Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts natales de la Méditerranée, où le pollen peut être distribuer par le vent et les oiseaux (**Lumaret et al., 2004**).

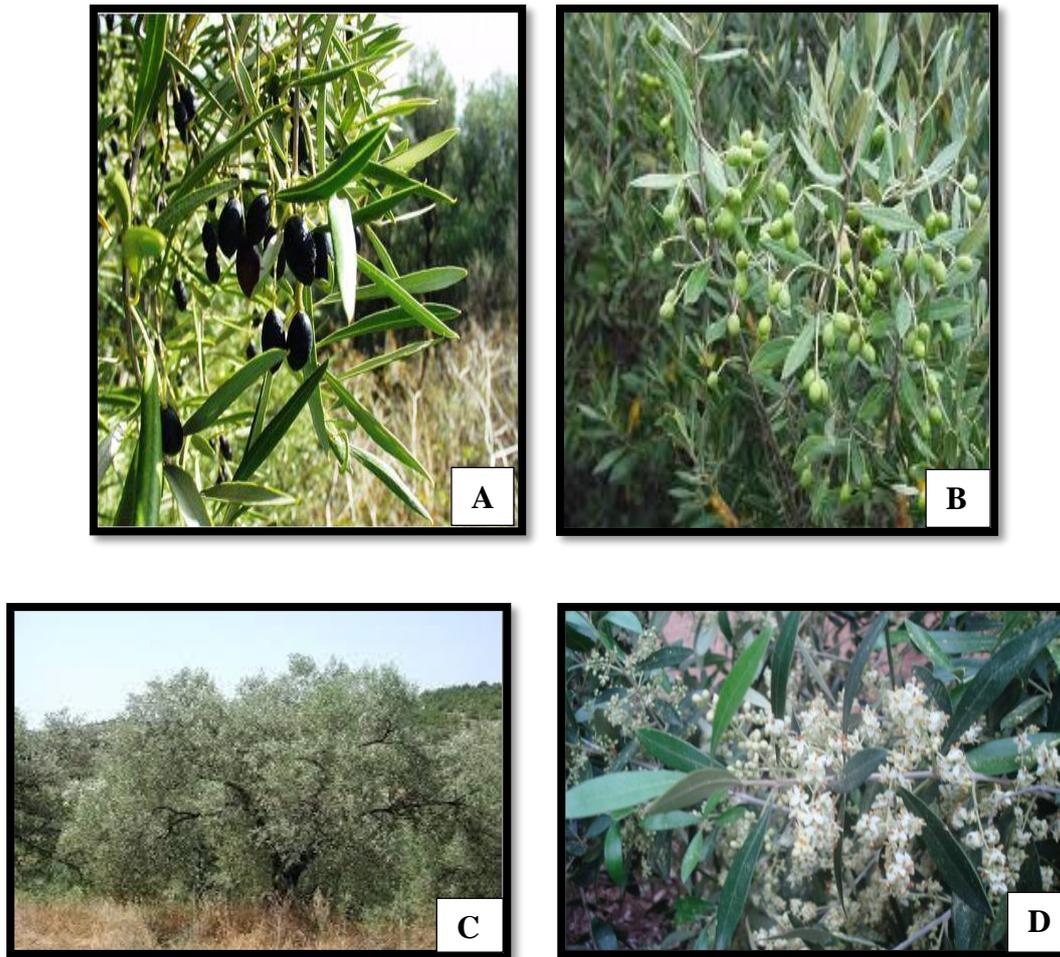


Figure 13. Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre

(A): Fruits murs, (B) : Fruits verts, (C) : inflorescence, (D) : Arbre (Photos prise aux mois d'Avril, Septembre, Novembre 2012) (Gherib Asma, 2015).

2. L'huile d'oléastre

L'huile d'oléastre est une huile très fluide et fine, son indice de viscosité est très inférieur à celui de l'huile d'olive cultivé. Et cette fluidité la rend très volatile et pénétrante lors des massages (Sidi Mammar, 2012).

Sa dualité mâle-femelle existe dans toutes les espèces, les genres et les sortes. Il existe donc un oléastre mâle et un oléastre femelle dont le mélange des fruits « drupes » nous permet d'obtenir cette huile aux vertus plurielles.

L'huile d'oléastre n'est pas une huile de consommation comme l'huile d'olive que l'on utilise dans divers domaines. Elle reste toutefois comestible. Son utilisation concerne exclusivement la thérapie (Sidi Mammar, 2012).

2.1. Extraction

Actuellement en Algérie seule la méthode artisanale est utilisée pour l'extraction de l'huile de l'oléastre. Cette méthode consiste à écraser le fruit entier entre deux pierres puis malaxer manuellement dans le but de faire sortir l'huile des cellules. Cette pâte est mise dans une terrine où on lui ajoute de l'eau bouillante, après mélange, on enlève les résidus (tourteau) et le liquide obtenu est porté à ébullition (environ 10 min). L'huile surnage est récupérée à l'aide d'une louche. Mais en général, l'extraction de l'huile remonte à des temps immémoriaux (**Djeziri, 2012**).

Mais en général, l'extraction de l'huile remonte à des temps immémoriaux. A l'instar du mode d'obtention de l'huile d'olive dans les huileries, l'huile d'oléastre est extraite de la même façon sauf que la particularité réside dans le mélange de drupes mâles et de drupes femelles. Sans respect de cette rigueur du mélange entre drupes mâles et drupes femelles, les expériences antérieures ont obtenu une huile ordinaire, amère et sans aucun effet bénéfique sur la santé (**Sidi Mammar, 2012**).

2.2. Composition biochimique

A l'égal de toutes les huiles végétales, l'huile d'oléastre est composée d'une fraction saponifiable (les triglycérides) et d'une fraction insaponifiable (les constituants mineurs).

2.2.1. Fraction saponifiable

La fraction saponifiable, ou glycéridique, représente 99 % de *olea oléastre*. Elle est constituée principalement de triglycérides constitués de glycérol et d'acide gras.

1- Les acides gras

La composition des acides gras montre que l'**acide oléique** représente 74,38% de l'huile *d'olea oléastre*. C'est l'acide gras majoritaire, il est mono insaturé et de type oméga 9.

Le second acide gras rencontré dans l'huile *d'olea oléastre* est l'**acide palmitique** il est présent à 9,55%. C'est un excellent aliment énergétique mais sa consommation augmenterait le risque de maladie cardiovasculaire.

Le troisième acide gras rencontré dans l'huile *d'olea oléastre* est l'**acide linoléique** présent à 8,70%. Ces trois acides gras composent donc à eux seuls plus de 90% des acides gras de l'huile d'oléastre.

Parmi les acides gras minoritaires, l'acide stéarique est de 2,69%, et l'acide vaccénique avec une proportion de 2,53%, c'est le produit intermédiaire qui se forme lors de la transformation des acides gras insaturés en acides gras saturés (**Bendimerad,2011**) (Tableau 2).

Tableau 2. Les valeurs moyennes des acides gras d'olea oléastre (**Bendimerad,2011**).

Acides gras	Teneurs en % d'huile
Acide palmitique C16 :0	9,55 ± 0,46
Acide palmitoléique C16 :1n-7	0,71 ± 0,03
Acide stéarique C18 :0	2,69 ± 0,19
Acide oléique C18 :1n-9	74,38 ± 0,62
Acide vaccénique C18 :1n-7	2,53 ± 0,14
Acide linoléique C18 :2n-6	8,70 ± 0,08
Acide α -linoléique C18 :3n-3	0,85 ± 0,02
Acide arachidique C20 :0	0,28 ± 0,03
Acide gondoïque C20 :1n-9	0,27 ± 0,03
Acide linoléique = oléique acide	8,55

2- Les triglycérides

Dans l'huile d'oléastre, les acides gras insaturés sont majoritairement estérifiés en position 2 du glycérol, alors que les acides gras saturés se retrouvent préférentiellement sur les positions alcools externes du glycérol. Quant à l'acide oléique (AGMI), il se distribue équitablement entre les trois positions du glycérol, en privilégiant la position 2 (**Graille, 2003**).

Les huiles d'oléastes sont constituées d'une vingtaine de triglycérides dont trois sont majoritaires : OOO (trioléine, entre 40 et 60 %), POO (palmyldioléine, entre 10 et 20 %), LOO (linoléyldioléine, entre 10 et 20 %) (Avec O=acide oléique ; L=acide linoléique ; P=acide palmitique) (**Rayan, 1998 et Ollivier, 2005**).

2.2.2. Fraction insaponifiable

L'oléastre s'avère intéressant parce qu'il produit une huile de bonne qualité en termes de composés mineurs comparée à l'huile d'olive (**Tableau 3**). Ces composés mineurs (alcools, composés polyphénoliques, chlorophylle, caroténoïdes, stérols, tocophérols et flavonoïdes) contribuent à la qualité organoleptique et à la valeur nutritive ; ce qui peut distinguer la qualité des huiles d'olive provenant de différentes régions de production (**Doveri et Baldoni, 2007**).

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g/kg), représentée par actéosides, hydroxytyrosol, tyrosol et les acides phénolpropioniques ainsi que d'autres composés réputés être des agents anticancéreux (par exemple le squalène et les terpénoïdes) (Owen *et al.*, 2004). L'huile d'olive vierge est la seule huile contenant des quantités notables de substances phénoliques naturelles (Tableau 3). Ces composés sont responsables du goût si particulier, à la fois amer et fruité, et contribuent pour une grande partie à la stabilité de l'huile, en augmentant sa résistance à l'autoxydation (Boskou, 1996, Gutiérrez *et al.*, 2001).

Tableau 3. Teneur en antioxydants (mg/Kg d'huile) de l'huile d'oléastre comparée à l'huile d'olive cultivé (Dabbou *et al.*, 2011).

Antioxydants	L'huile d'olive cultivé	Oléastre
α tocophérols	279,56 \pm 1,51	312,95 \pm 2,67
Chlorophylles	4,69 \pm 0,16	10,00 \pm 0,25
Carotènes	1,64 \pm 0,03	3,92 \pm 0,03
3,4-DHPEA-EA	272,53 \pm 1,90	309,08 \pm 0,87
Phénols totaux	825,42 \pm 30,12	832,95 \pm 12,69

✓ L'huile d'oléastre en contient en moyenne 300 mg/Kg. Des 8 types de vitamine E, elle contient principalement la plus efficace : la molécule α -tocophérol.

✓ D'après les résultats trouvés par Baccouri *et al.*, on observe que l'huile issues de cinq variétés d'oléastres est plus riche en composés mineurs que la chemlali, variété cultivée (Tableau 4).

Tableau 4. Teneur en chlorophylles, caroténoïdes et stabilité oxydative entre l'oléastre et la variété chemlali (Baccouri *et al.*, 2007)

	M de 5 variétés d'oléastres	Chemlali
Chlorophylles (mg/Kg)	3.24	2.2
Caroténoïdes (mg/Kg)	2.63	1.51
Stabilité oxydative (h)	47.27	23.8

2.3. Critères de qualité de l'huile d'oléastre

La qualité est définie comme étant « la combinaison des attributs ou des caractéristiques d'un produit qui ont une signification en déterminant le degré d'acceptabilité de ce produit par l'utilisateur 11 » (**Gould, 1992**).

Selon la norme du **COI** et le **règlement de la Commission Européenne**. Les critères de qualité de l'huile d'olive englobent des caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques. Ils permettent la classification commerciale des huiles d'olive.

2.3.1. Les caractéristiques organoleptiques (sensorielles)

Seule une analyse sensorielle par un jury de dégustateurs compétents permet d'apprécier ces critères de manière objective. Pour cela cette analyse est complémentaire aux analyses physico-chimiques, et qui ne concerne que le domaine des huiles vierges. Elle permet de juger à la fois de l'état des olives avant trituration (olives gelées, olives chômées par dégradation anaérobie, olives moisies) et du vieillissement de l'huile (huile oxydée à caractère rance, huile à défaut de lies par fermentation des dépôts) (**Brigitte et Véronique, 2014**).

En effet, les composés volatiles qui se développent au cours du procédé de fabrication de l'huile puis pendant son stockage sont capables de modifier l'odeur et la saveur de l'huile. Pour cela une analyse sensorielle codifiée et détaillée a été développée par le **(C.O.I)**.

Les attributs sensoriels d'une huile ont été classés en deux catégories : les attributs positifs (amer, fruité et piquant) et les attributs négatifs (chômé/lies, moisi/humide, vineux/vinaigré ou acide/aigre, métallique, rance et Olives gelées) qui ne doivent pas être présents dans l'huile d'olive extra vierge.

2.3.2. Les caractéristiques physicochimiques

2.3.2.1. Caractéristiques physiques

2.3.2.1.1. Indice de réfraction

C'est le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance, à température constante (20°C pour les corps gras complètement liquides à cette température : cas de l'huile d'olives) (**JO. N° 65, 2012**).

2.3.2.1.2. Humidité (Teneur en eau)

L'humidité est la quantité d'eau contenue dans un échantillon quelconque et qui disparaît sous l'effet du chauffage (ISO-662, 1998).

2.3.2.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminera à partir de la quantité d'ions d'hydrogène libre contenu dans l'huile d'olive (Ouksel et Nouri, 2021).

2.3.2.1.4. Absorbance aux rayonnements ultraviolets

L'examen spectrophotométrique dans l'ultraviolet peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse, sur son état de conservation, et sur Les modifications dues aux processus technologiques.

L'oxydation d'une huile aboutit à une dégradation en chaîne des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique sous l'effet de différents facteurs exogènes et endogènes initiateurs, accélérateurs ou retardateurs, conduisant des produits oxydés volatils ou non, citons ; les hydro peroxydes linoléiques qui absorbent la lumière au voisinage de 232nm. Si l'oxydation se poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation, en particulier des dicétones et des cétones insaturées qui absorbent la lumière vers 270 nm (Tanouti *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Caractéristiques chimiques

2.3.2.2.1. Acidité libre

L'acidité libre est un indicateur qui permet d'évaluer l'altération de la matière grasse, consécutive à de mauvais traitements ou à une mauvaise conservation. Elle est exprimée en pourcentage (%) d'acide oléique et mesurée par la quantité de potasse nécessaire à la neutralisation des acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras (Bouhadira, 2011).

2.3.2.2.2. Indice de peroxyde

Ce paramètre est exprimé généralement en milliéquivalent d'oxygène par kg d'huile, cet indice sert à évaluer l'état de conservation d'une matière grasse au cours du stockage, la quantité de peroxydes présents dans l'huile et les premiers niveaux d'oxydation de l'huile par l'oxygène (Tanouti *et al.*, 2010 ; et Bouchenak *et al.*, 2018). Il indique également la détérioration de certains composants d'intérêt nutritionnel tels que la vitamine E (Herrera et Dueñas, 2008).

2.3.2.2.3. Indice de saponification

Cet indice est d'une grande utilité dans l'industrie des savons. Il renseigne sur la longueur des chaînes d'acides gras que renferme le corps gras (**Kouidri ,2008**).

2.3.2.2.4. Indice d'iode

L'indice d'iode est la mesure de degré d'insaturation d'une matière grasse en déterminant le nombre d'iode (gramme). Se fixe sur les doubles liaisons présentes dans 100g de lipides (**Addou ,2017**).

2.4. Les Pigments colorants

La couleur d'une huile vierge est le résultat des tonalités vert et jaune dues à la présence des chlorophylles et des caroténoïdes (**Hammouni, 2018**).

- **Les chlorophylles** : Les chlorophylles sont les pigments les plus abondants dans la nature. Ils sont responsables de la nuance verdâtre de l'huile dont les taux varient en dépend des facteurs génétiques et du stade de maturation des fruits (**Baccouri et al., 2008**). Elles jouent un rôle important dans l'activité oxydante du produit, due à leur nature anti - oxydante dans l'obscurité et pro - oxydante dans la lumière. Une faible teneur en chlorophylle permet de diminuer les risques d'oxydation des différentes huiles (**Minguez et al., 1991**).

- **Les caroténoïdes** : Les carotènes sont des substances naturelles impliquées dans les mécanismes d'oxydation de l'huile, leur présence en quantités suffisantes dans ce produit retarde le phénomène de la photo oxydation et préserve les paramètres de sa qualité au cours du stockage (**Lazzez et al., 2006**).

2.5. Les composés phénoliques

2.5.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999; Lugasi et al., 2003**).

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al., 2003**).

Les principales classes de composants phénoliques sont : les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young., 1999 ; Tapiero et al., 2002**). Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2.5.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al., 2006**). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (**Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999**). Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (**Harborne et Williams, 2000**).

2.6. Effet de L'huile de l'oléastre sur la santé

L'huile de l'oléastre est caractérisée par sa composition en acides gras dont le principal acide gras est l'acide oléique. La consommation en acide oléique a un intérêt indiscutable dans la médecine préventive (maladies cardiovasculaires, pathologies digestives et hépatobiliaires, l'ostéoporose) (**Jacotot, 1996**).

L'acide oléique est préventif contre le développement d'athérome et augmente la résistance à l'oxydation. Les niveaux accrus en LDL sont des facteurs importants dans l'artériosclérose, en facilitant le transport du cholestérol (deux tiers du cholestérol plasmatique) vers les artères. Par contre, les HDL sont antiathérogéniques, elles transportent le cholestérol vers le foie pour être métabolisé et excrété ou réutilisé (**Huang et Sumpio, 2008**).

Les constituants mineurs de l'huile d'olive ont aussi un effet protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (MCV). Les principaux antioxydants présents dans les olives sont les caroténoïdes et les composés polyphénoliques. Les polyphénols primaires sont l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et l'alpha tocophérol. Ce dernier, connu comme la forme active de la vitamine E, est hautement résistant à l'oxydation, et donc protège le corps humain contre les radicaux libres et la peroxydation lipidique (**Huang et Sumpio, 2008**).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel Végétal

Cette étude a été réalisée sur un échantillon d'huile issue des fruits de l'oléastre ou l'olivier sauvage connu sous le nom vernaculaire « **Zebbouj** ». Les fruits ont été récoltés en pleine maturité le mois de Décembre 2021, de la région Ain Zitouna (commune Houari Boumédiène) de la wilaya de Guelma. L'extraction de l'huile de l'oléastre a été réalisée par une méthode traditionnelle artisanale.

2. L'analyse organoleptique de l'huile d'oléastre

L'évaluation des caractéristiques organoleptiques de notre échantillon d'huile d'oléastre a été réalisé à notre université, au laboratoire de biologie végétale, par cinq volontaires. Chaque dégustateur doit flairer, puis déguster l'huile.

L'analyse sensorielle est portée sur les caractéristiques suivants : couleur, aspect/texture, odeur, saveur, et gout.

Chaque dégustateur doit remplir le formulaire suivant :

<p>Dégustateur n°... :</p> <p>✓ Couleur :</p> <p>✓ Aspect/Texture :</p> <p>✓ Odeur :</p> <p>✓ Saveur :</p> <p>✓ Gout :</p>

3. L'analyse des caractéristiques physico-chimiques

3.1. Détermination des paramètres physiques

3.1.1. Indice de réfraction

❖ Principe

La mesure est effectuée à l'aide d'un réfractomètre numérique, d'RFM330-T avec effet Peltier de contrôle de la température, gradué entre $n_D = 1.3000$ et 1.7000 à une température de 20°C . Cet instrument sert à mesurer la déviation de la lumière lorsqu'elle passe dans un liquide. La méthode suivie est celle d'**ISO 6320 (2000)**.

❖ Protocole

- Étalonner l'appareil par l'eau distillée.
- Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant le papier de Joseph.
- Déposer quelques gouttes de l'huile d'olive dans la lame et régler le cercle de chambre sombre et claire dans la moitié.
- Effectuer la lecture en prenant compte la température (20°C) (Azzouni et Benariba, 2016).

3.1.2. L'humidité H₂O**❖ Principe**

Il consiste à provoquer le départ d'eau par chauffage d'une quantité connue d'huile jusqu'à élimination complète de l'eau (Benosman et al., 2005).

❖ Protocole

- ✓ Mettre une capsule dans l'étuve à 103 °C-105 °C pendant 15 min.
- ✓ Refroidir dans dessiccateur et peser à vide : m₀.
- ✓ Peser 5g de l'huile et mettre dans l'étuve pendant environ 30' à 1h.
- ✓ Refroidir dans dessiccateur et peser.
- ✓ Refaire la pesée jusqu'à poids constant m.

La teneur en eau est calculée selon la formule :

$$\text{H}_2\text{O} = (\text{PE} + \text{M}_0) - m / \text{PE} \times 100$$

Où :

PE : prise d'essai en grammes.

3.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)**❖ Principe**

Le pH donne une indication sur l'acidité ou l'alcalinité du milieu, il est déterminé à partir de la quantité d'ions d'hydrogènes libres (H) contenue dans l'huile d'olive (Audigie et al., 1984).

❖ Protocole

- ✓ Régler la température du pH mètre sur le milieu ambiant.
- ✓ Rincer toujours la sonde à l'aide d'eau distillée, puis on l'essuie.
- ✓ Prendre 100ml d'huile d'olive à analyser dans un bécher.
- ✓ Plonger la sonde dans la solution et lire le pH (**Azzouni et Benariba, 2016**).

3.1.4. Absorbance aux rayonnements ultraviolets**❖ Principe**

Cette analyse consiste à déterminer les coefficients d'extinction K_{232} et K_{270} calculés à partir de l'absorption à 232 et 270 nm qui correspondent au maximum d'absorbance des hydro peroxydes et des produits secondaires d'oxydation respectivement (**Alais et al., 1999**).

❖ Protocole

- Un 10 mg à 20 mg d'échantillon est dilué dans du cyclohexane (25 ml), jusqu'à l'obtention de densités optiques (DO) inférieures à 1.
- La lecture des absorbances est effectuée dans une cuve en quartz par rapport à celle du solvant (**ISO 3665, 2011**).

Les valeurs d'extinctions spécifiques à 232 nm et 270 nm sont calculées selon la formule suivante :

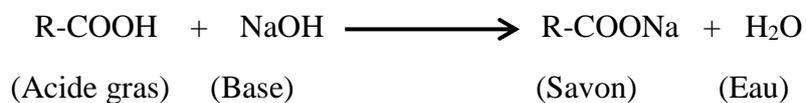
$$K_{232} = ((Abs_1 + Abs_2)/2)/P.10 \quad ; \quad K_{270} = ((Abs_1 + Abs_2)/2)/P.10$$

- K_{232} : extinction spécifique à $\lambda = 232$ nm.
- K_{270} : extinction spécifique à $\lambda = 270$ nm.
- **P** : prise d'essai (g).

3.2. Détermination des paramètres chimiques**3.2.1. Acidité libre**

❖ Principe

Elle consiste à un dosage acido-basique correspondant à la neutralisation selon la réaction ci-contre :



❖ Protocole

Selon le protocole de la CCE (2685/91)

- ✓ Une prise de 5 g d'huile est dissoute dans 20 ml d'éthanol éther-di-éthylique à 95% (v/v).
- ✓ Les fonctions carboxyliques libres sont dosées par titrage d'une solution de KOH à 0,1 N en présence d'un indicateur coloré, la phénolphtaléine.
- ✓ La fin du dosage est marquée par l'apparition d'une couleur rose pale.

Un essai témoin a été effectué en l'absence de matière grasse et ce afin d'éliminer la possible acidité du solvant.

L'acidité est exprimée en pourcentage de poids d'acide oléique, par la formule suivante :

$$\text{Acidité (\%)} = (\text{Cb} - \text{Cb0}) \times \text{N} \times \text{M} / 10 \times \text{PE.}$$

Où :

Cb : volume de KOH (en ml) nécessaire pour neutraliser les AGL présents dans l'huile.

Cb0 : volume de KOH (en ml) nécessaire pour neutraliser l'éventuelle acidité du solvant.

M : masse molaire de l'acide oléique (282 g/ mol).

N : normalité de la solution de KOH.

PE : prise d'essai.

3.2.2. Indice de peroxyde

❖ Principe

Il est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de matière grasse pouvant oxyder l'iodure de potassium en présence d'acide acétique et de chloroforme (**Bouzi, 2018**).

❖ Protocole

Selon le protocole suivi de la **CEE (2685/91)**.

- ✓ Une quantité de 2 g d'huile est dissoute dans 10 ml de chloroforme
- ✓ On ajoute 15 ml d'acide acétique glacial et 1 ml d'une solution d'iodure de potassium saturé.
- ✓ Le tout est agité pendant une minute puis mis à l'obscurité pour 15 min.
- ✓ Quelques gouttes d'empois d'amidon sont ajoutées avant de titrer avec une solution de thiosulfate de sodium 0.01 N.

Les résultats sont exprimés en milliéquivalent d'oxygène actif par kg d'huile selon la formule :

$$I_p \text{ (meq O}_2\text{/kg huile)} = C_b - C_{b_0} \times 1000 \times T / PE$$

Où :

T : titre ou normalité de la solution de thiosulfate de sodium (Na₂ S₂O₃).

C_{b0} : chute de burette témoin, volume de thiosulfate versé dans le blanc (en ml).

C_b : chute de burette, volume de thiosulfate versé dans la prise d'essai (en ml).

PE : prise d'essai en grammes.

3.2.3. Indice de saponification

❖ Principe

L'indice de saponification est le nombre en milligramme de KOH (hydroxyde de potassium), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides contenus dans un gramme de produit. La méthode d'analyse utilisée est celle recommandée par la norme (**ISO 3657, 2009**).

❖ Protocole

- ✓ On introduit dans une fiole une prise d'essai de 2g d'huile et 25 ml de potasse alcoolique (0,5N).
- ✓ La solution obtenue est portée à ébullition au bain-marie pendant 30 mn.
- ✓ Après on ajoute 3 gouttes de phénolphtaléine, puis on effectue un titrage à chaud l'excès de potasse avec l'acide chlorhydrique (0,5N) jusqu'à ce qu'on obtient une décoloration.
- ✓ On réalise un essai à blanc dans les mêmes conditions.

L'indice de saponification est donné par la relation :

$$I_s = (V - V_0) \times 56,1 \times T / PE$$

Où :

I_s : L'indice de saponification est exprimé en mg de KOH/g d'huile.

V : Volume de la solution d'HCl en ml utilisé pour la prise d'essai.

V₀ : Volume de la solution d'HCl utilisé pour l'essai à blanc.

N : Titre exact de la solution d'HCl utilisée.

P : Prise d'essai en gramme.

3.2.4. Indice d'iode**❖ Principe**

Le principe se base sur le titrage, par le thiosulfate de sodium, de l'excès de réactif de Wijs transformé en iode par l'addition de l'iodure de potassium **ISO 3961 (1996)**.

❖ Protocole

- ✓ 0,2g d'huile pesé dans une fiole de 500 ml est mis en solution dans 15 ml de tétrachlorure de carbone et 15 ml de réactif de Wijs sont ajoutés.
- ✓ Une fois bouchée, la fiole est agitée doucement et placée dans un endroit à l'abri de la lumière pendant 1 heure à 20°C.
- ✓ Après ce temps, 20ml d'iodure de potassium à 10% et 150ml d'H₂O distillée sont

additionnés.

✓ L'échantillon est titré avec le thiosulfate de sodium (0,1N) en utilisant comme indicateur une solution d'empois d'amidon à 0,5% (quelques gouttes).

✓ Le titrage est poursuivi jusqu'au moment où la couleur bleue disparaît, après agitation très vigoureusement.

Un essai à blanc sans l'huile est réalisé en même temps dans les mêmes conditions.

L'indice d'iode est déterminé ci-après :

$$\text{Indice d'iode} = V_0 - V \times 1,269 / P$$

Où :

1,269 : nombre de gramme d'iode correspondent à 1 ml de thiosulfate de sodium (0,1N).

P : masse d'huile d'olive.

V₀ : volume de Na₂S₂O₃ pour l'essai à blanc.

V : volume de Na₂S₂O₃ pour la prise d'essai.

4. Détermination de la teneur en Pigments colorants

4.1. Détermination de la teneur en chlorophylles

❖ Méthode

Selon la méthode décrite par (Wolff, 1968 ; Mosquera Minguez et al., 1991).

❖ Protocole

✓ Une prise de 7,5 g d'huile est introduite dans une fiole jaugée de 25 ml qui sera remplie, jusqu'au trait de jauge par du tétrachlorure de carbone.

La teneur en chlorophylles st déterminée par la formule :

$$\text{Chlorophylles (ppm)} = (A_{670} - (A_{630} + A_{710}) / 2) / 0,1086 \times L$$

Où :

A 630 : absorbance à 630 nm par rapport à une cuve de référence contenant de tétrachlorure de carbone.

A 670 : absorbance à 670 nm.

A 710 : absorbance à 710 nm.

L : trajet optique =1 cm.

0,1086 : coefficient lié à l'appareil.

4.2. Détermination de la teneur en caroténoïdes

❖ Méthode

La détermination de la teneur en ces pigments sera basée sur une méthode spectrophotométrique et l'absorption se fait à 470 nm (**Mosquera Minguez et al., 1991**).

❖ Protocole

✓ Une prise de 7,5 g d'huile est introduite dans une fiole jaugée de 25 ml qui sera remplie, jusqu'au trait de jauge par du cyclohexane.

✓ L'absorbance de la solution obtenue est mesurée par rapport à celle du solvant à 470 nm, la teneur en carotènes est déterminée par la formule :

$$\text{Carotène (ppm)} = (A_{470} \times 25 \times 10000) / (2000 \times 7,5)$$

5. Etude de l'activité antioxydante

Cette huile représente une source très importante d'antioxydants naturels, parmi lesquels on compte essentiellement les polyphénols et les flavonoïdes. La présente étude consiste à déterminer la teneur en composés phénoliques et flavonoïques de l'huile d'oléastre, puis à évaluer leur pouvoir antioxydant par le test anti radicalaire DPPH.

5.1. Extraction des composés phénoliques totaux

Selon le protocole de **Pirisi et al., (2000)**.

✓ Une prise de 10 g d'huile d'olive et 10 ml de solution méthanolique (méthanol/eau 80/20, v/v) sont placés dans un tube à centrifuger.

✓ On agite pendant 10 minutes au Vortex.

- ✓ Après centrifugation, pendant 15 min à 3800 rpm, la phase méthanolique est récupérée et transférée dans une fiole jaugée de 50 ml.
- ✓ L'opération est reconduite 2 fois et on complète au trait de jauge avec la solution méthanol/eau (80/20).
- ✓ Les 3 phases récupérées sont portées sous un rota vapeur à une température de 40°C pour échapper le solvant, puis mis au congélateur (-22°C) pendant 12 heures.

5.2. Dosage des polyphénols totaux

❖ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène, ce qui aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de 765 nm (Singleton *et al.*, 1999).

❖ Protocole

Après extraction, la fraction phénolique est déterminée par un dosage colorimétrique selon la méthode préconisée par Vasquez *et al.*, (1973).

- ✓ 500 µl de réactif Folin-Ciocalteu et 450 µl d'eau distillée ont été ajoutés à un tube contenant 50 µl d'extrait avec agitation vigoureuse.
- ✓ Après 3 minutes, 400 µl de Na₂CO₃ (75 g.L⁻¹) ont été additionnés.
- ✓ Les tubes ont été incubés à 25 °C et à l'obscurité pendant 40 minutes.
- ✓ L'absorbance est lue à 725 nm contre un blanc qui contient le méthanol au lieu de l'extrait.

La teneur en composés phénoliques de l'extrait a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 1) et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par kg d'huile d'olive (mg EAG/kg d'huile).

5.3. Dosage des flavonoïdes

❖ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner, avec le groupement CO, un complexe de couleur jaunâtre en présence d'aluminium.

❖ Protocole

Selon le protocole de **Branz, (2012)**.

✓ Un volume de 2 ml de l'extrait est mélangé à 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 2% (dans le méthanol).

✓ Après incubation à l'obscurité pendant 15 min et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La quantité de flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de quercétine dans un kg d'huile, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (Annexe 2) provenant de la régression linéaire des valeurs obtenues pour la solution standard.

5.4. Test de piégeage du radical libre DPPH

❖ Principe

Le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyl) de couleur violette foncée, qui se transforme en coloration jaunâtre (après réduction). Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie (**Brand et al., 1995**) (Figure 14).

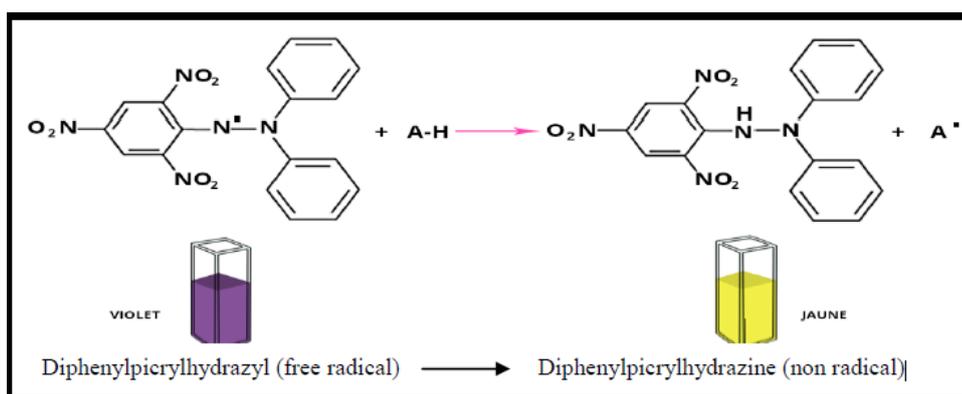


Figure 14. La forme réduite et non réduite de la molécule du DPPH (**Molyneux, 2004**).

❖ Protocole

Selon le protocole décrit par **Mansouri et al (2005)**.

- ✓ La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (6×10^{-5} M).
- ✓ 25 μ l de la solution d'extrait ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 μ l DPPH.
- ✓ Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm.

L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti radicalaire} = (\text{Abs Contrôle}) - (\text{Abs échantillon}) / (\text{Abs Contrôle}) \times 100$$

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0 à 2 mg/ml pour l'acide ascorbique et l'extrait mère.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

❖ Calcul des IC50

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé (**Torres et al., 2006**).

N.B : L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

6. Etude in vivo de la toxicité des nanoparticules

6.1. Nanoparticules étudiées

Les nanoparticules de silice (NPs-SiO₂) (structure amorphe, taille 150 nm, et de surface spécifique 200 m²/f) et les nanoparticules de nickel (NPs-Ni) (structure CFC, taille 15 nm, et de surface spécifique 280 m²/f) de notre étude ont été synthétisés par le professeur BOUDJAHM.A (Laboratoire de recherche en chimie, université de GUELMA).

6.2. Préparation des suspensions des nanoparticules

Les suspensions des nanoparticules sont initialement préparées dans une solution d'eau déminéralisée. La dispersion des nanoparticules est réalisée par sonication, qui est une technique mettant en œuvre des ultrasons. Ces derniers permettent de casser les interactions intermoléculaires et donc d'obtenir des nanoparticules moins agglomérées voir moins agrégées si la surface de liaisons entre deux particules est faible (Heinlaan *et al.*, 2008).

Les concentrations préparées des nanoparticules (NPs-SiO₂ et NPs-Ni) pour l'étude *in vivo* sont 100 mg/kg de poids corporel (Shang *et al.*, 2018) et 50 mg/kg de poids corporel (Hozayen *et al.*, 2019) respectivement.

6.3. Animaux

Notre étude a été réalisée sur 30 rats males de la souche *Albino Wistar* adultes, âgés de 75 à 90 jours, pesant 140 g à 200 g. Provenant d'un laboratoire d'élevage LEKMOUTA Nour El Houda de Guemar – El Oued. Ces rats sont soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de notre animalerie (faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre, université 08 Mai 1945 - Guelma), à une température de 22± 2° C et une photopériode naturelle.

Les rats sont placés dans des cages en plastique grillagées où ils ont accès libre à l'alimentation et à l'eau.

6.4. Traitement des animaux

Les rats sont répartis en 6 lots égaux (5 rats par lot).

Lot 1 : Rats Témoins Sains « **TS** » : reçoivent l'eau distillée.

Lot 2 : Rats injectés par NPs-Ni « **Ni** ».

Lot 3 : Rats injectés par NPs-SiO₂ « **Si** ».

Lot 4 : Rats injectés par NPs-Ni et traités par huile d'oléastre « **Ni+H** ».

Lot 5 : Rats injectés par NPs-SiO₂ et traités par huile d'oléastre « **Si+H** ».

Lot 6 : Rats traités avec l'huile d'oléastre « **H** » : avec la dose de 2 ml/Kg (Laib *et Medbouh*, 2016).

L'injection des nanoparticules a été effectuée par voie intrapéritonéale 3 fois par semaine et le traitement par l'huile d'oléastre a été administré par gavage chaque jour.

6.5. Prélèvement sanguin

Après 21 jours de traitement, les six groupes sont sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans des tubes héparines pour le dosage des paramètres biochimiques. Les tubes héparines sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 20 minutes, le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes éppendorfs et stockés au congélateur à une température de (-20° C) jusqu'au moment de dosage.

6.6. Prélèvement des organes

Les rats sacrifiés ont été ouverts ventralement pour le prélèvement de certains organes ; les reins, foie, testicules, cœur et poumons. Les cinq organes ont été rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9 %, une partie de ces organes a été stockée au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydatif. Et une deuxième partie a été conservée dans une solution de formol 10%, afin de réaliser les coupes histologiques.

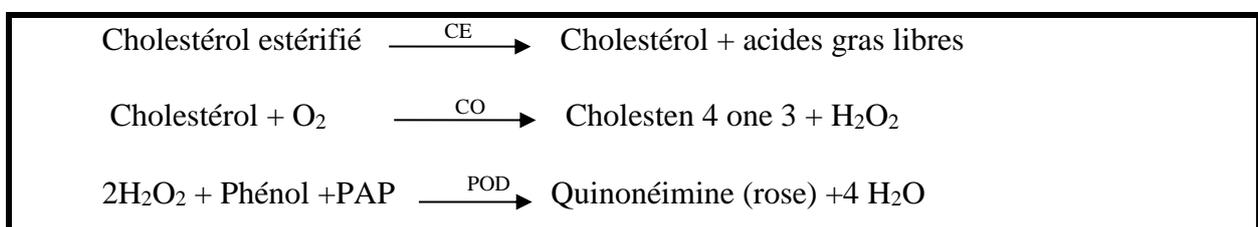
6.7. Dosage des paramètres sanguins

Les dosages ont été effectués par nous même dans le laboratoire de biochimie de l'université 08 Mai 1945 - Guelma.

6.7.1. Dosage du cholestérol total (selon la fiche technique BIOLABO)

❖ Principe

Méthode enzymatique décrite par **Allain et al.**, selon le schéma réactionnel suivant :



Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁ Réactif de Travail	Tampon phosphate Chloro-4-phénol Sodium Cholate Triton ×100 Conservateur Cholestérol oxydase (CO) Cholestérol estérase (CE) Peroxydase (POD) 4- Amino-antipyrine (PAP) PEG	100 mmol/ L 5 mmol/ L 2,3 mmol /L 1,5 mL/L _>100 UI/L _>170 UI/L _>1200 UI/L 0,25 m mol/ L 167 umol/L
R ₂ Etalon	Cholestérol	200 mg/ dl

❖ Préparation des réactifs

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Dosage
RT (ml)	1ml	1ml	1ml
Eau déminéralisée (µl)	10µl	–	–
Etalon (µl)	–	10µl	–
Spécimen	–	–	10µl

- Mélanger. Laisser reposer 5 min à 37 °C ou 10 min à température ambiante.

- Lire les absorbances à 500 nm (480-520) contre le blanc réactif. La couleur est stable pendant une heure.

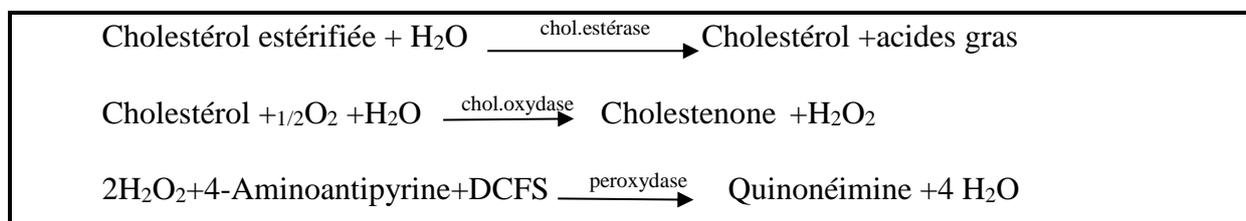
❖ Calcul

$$\text{Résultat} = \text{Abs (Dosage)} \times \text{Concentration de l'Etalon} / \text{Abs (Etalon)}$$

6.7.2. Dosage du cholestérol-HDL (selon la fiche technique Biosystems)

❖ Principe

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de faible densité (LDL) présentés dans l'échantillon, précipitent en présence de phosphotungstate et d'ions magnésium. Le liquide surnageant de la centrifugation contient les lipoprotéines de densité élevée (HDL), dont le cholestérol est quantifié spectrophotométriquement grâce aux réactions couplées décrites ci-dessous :



Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif A	Phosphotungstate Chlorure de magnésium	0,4 m mol/L 20 m mol /L
Réactif B	PIPES Cholestérol estérase Cholestérol oxydase Péroxydase 4- Aminoantipyrine Cholate sodique Dichlorophénolsulfonate, PH=7	70 m mol/L >0,2 U/mL >0,1 U/mL >1 U/ mL 0,5m mol/L 0,5m mol/L 4m mol/L
Etalon (S)	Cholestérol	200 mg/ dl

❖ **Préparation des réactifs**

Les Réactifs (A), (B) et Etalon (S) sont prêts à l'emploi.

❖ **Mode opératoire****Précipitation**

1. Pipeter dans des tubes à centrifugeuse (Note1) :

Echantillon	0,2 ml
Réactif (A)	0,5 ml

2. Agiter et placer pendant 10 min à température ambiante.

3. Centrifuger pendant 10 min à un minimum de 4000r.p.m.

4. Recueillir le surnageant en faisant attention (Note2).

Colorimétrie

5. Placer le Réactif B pendant quelques minutes à température ambiante.

6. Pipeter dans des tubes à essai (Note3).

	Blanc	Etalon	Echantillon
Eau distillée	50 μ L	–	–
Etalon de cholestérol HDL(S)	–	50 μ L	–
Surnageant	–	–	50 μ L
Réactif B	1mL	1mL	1 mL

7. Bien agiter et incuber les tubes pendant 30min à température ambiante (16-25°C) ou pendant 10min à 37°C.

8. Lire l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon face au blanc à 500 nm. La couleur est stable au moins 30 min.

❖ **Calcul**

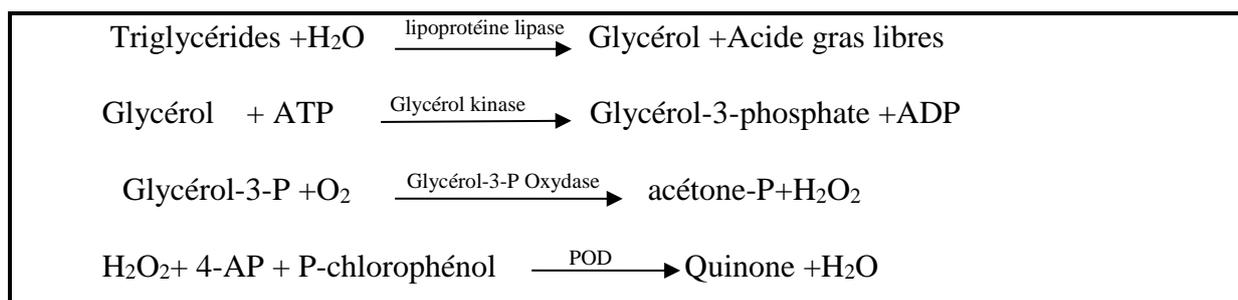
La concentration en cholestérol HDL de l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$(A) \text{ échantillon} \times C \text{ Etalon} \times \text{Facteur de dilution Echantillon} / A \text{ (Etalon)}$$

6.7.3. Dosage des Triglycérides (selon la fiche technique DiaScan)

❖ Principe

Les triglycérides sont déterminés après une hydrolyse enzymatique par les lipases. L'indicateur est une quinone formée d'après les quatre réactions suivantes (Fossati, 1980) :



Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R	GOOD pH 6,3 P- chlorophénol	50 mmol/L 2 mmol/ L
	Lipoprotéine Lipase (LPL) Glycérol kinase (GK) Glycérol-3-P- Oxydase Peroxydase 4-Aminophénazone (4-AP) ATP	150000 U/L 500 U/L 3500 U/L 440U/L 0,1mmol/L 0,1mmol/L
Etalon	Triglycérides	200 mg/dl

❖ Préparation des réactifs

Le réactif et l'étalon sont prêts à l'emploi.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
R (ml)	1ml	1ml	1ml
Etalon (μl)	-	10μl	-
Echantillon (μl)	-	-	10μl

- Mélanger et incuber les tubes pendant 10 min à 15-25°C ou 5 min à 37°C.
- Lire l'absorbance (A) de l'échantillon et de l'étalon contre le blanc à 505 nm.

❖ Calcul

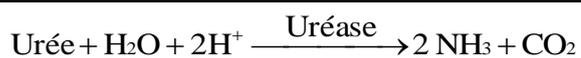
$$\text{Triglycérides(mg/dl)} = ((A) \text{ échantillon} - (A) \text{ blanc} / (A) \text{ Etalon} - (A) \text{ blanc}) \times 200$$

200 : Concentration d'étalon.

6.7.4. Dosage de l'urée (selon la fiche technique Spinréact)

❖ Principe

L'urée est hydrolysée enzymatique ment en ammonium (NH₃) et dioxyde de carbone (CO₂) selon la réaction suivante (**Kaplan, 1984**).



Les ions ammoniums formés réagissent avec α- cétooglutarate dans une réaction catalysée par glutamate dehydrogenase (GLDH) avec oxydation simultanée de NADH à NAD.



La baisse dans la concentration de NADH, est proportionnelle à la quantité d'urée présentée dans l'échantillon.

Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

RT	Composition	Concentration
(R ₁) (Buffer)	-Phosphate PH=6,7 -EDTA -Sodium salicylate -Sodium nitroprusside	50 m mol /l 2 m mol /l 400 m mol /l 10 m mol/l
(R ₂) (NaClO)	- Sodium hypochlorite(NaClO) -Sodium hydroxide	140 m mol/l 150 m mol/l
(R3) (Enzymes)	Urease	30000U/l
UREA CAL	- Urea aqueous primary standard	50 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT)

- Dissoudre le contenu de réactif (R₂) dans la fiole de réactif (R₁).
- Mélanger bien et doucement la solution jusqu'à la dissolution complète.
- Ce réactif (RT) est stable pendant 4 semaines à 2-8 °C ou 7 jours à 15-25 °C.

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT(ml)	1ml	1ml	1ml
Etalon(μl)	-----	10 μl	-----
Echantillon(μl)	-----	-----	10 μl

-Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37°C ou 10 min à température ambiante (15-25°C).

-Pipetter

	Blanc	Etalon	Echantillon
R2 (ml)	1ml	1ml	1ml

-Mélanger et incuber les tubes pendant 5 min à 37°C ou 10 min à température ambiante (15-25°C).

-Lire l'absorbance (A) de l'Etalon et de l'Echantillon face au blanc à 580 nm .La couleur est stable au moins 30 min à (15-25°C).

❖ Calcul

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc}}{(A) \text{ Etalon} - (A) \text{ Blanc}} \times 50$$

50 : Concentration d'étalon.

6.7.5. Dosage de la créatinine (selon la fiche de Spinreact)

❖ Principe

Le test de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium décrit par **Jaffé**.

La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe de couleur rouge. L'intervalle de temps choisi pour les lectures permet d'éliminer une grande partie des interférences connue pour la méthode l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans l'échantillon testé.

Echantillon : sérum

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁ réactif picrique	- Acide picrique.	17.5 mmol /l
R ₂ réactif alcalinisant	- Hydroxyde de sodium.	0.29 mmol/l
créatinine	- Patron premier de détection de la créatinine	2 mg/dl

❖ Préparation de réactif de travail (RT)

-Mélanger des volumes égaux de réactif picrique R1 et de réactif alcalinisant R2.

-Stabilité du réactif de travail 15 jours à 2-8°C ou 7 jours à température ambiante (15-25°C).

❖ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (ml)	1ml	1ml	1ml
Etalon (µl)	-----	100 µl	-----
Echantillon (µl)	-----	-----	100 µl

-Mélanger et activer le chronomètre.

- Consulter l'absorbation (A_1) au bout de 30 secondes puis de 90 secondes (A_2) après avoir ajouté l'échantillon de test à 492 nm contre l'eau distillé.

- Calculer : $\Delta A = A_2 - A_1$.

❖ Calcul

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ Echantillon} - \Delta A \text{ Blanc}}{\Delta A \text{ Etalon} - \Delta A \text{ Blanc}} \times 2$$

2 : Concentration d'étalon.

6.7.6. Dosage de l'activité d'aspartate amino transférase (ASAT) (selon la fiche technique DiaScan).

❖ Principe

L'aspartate amino transférase (AST) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxalacetate. L'oxalacetate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984).



Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R1	-Tris PH 7,8	80 mmol/l
Tampon	-L-Aspartate	200 mmol/l
R2	-NADH	0,18 mmol/l
Substrat	-Lactate dehydrogenase(LDH)	800 U/l
	-Malate dehydrogenase(MDH)	600 U/l
	- α-cetoglutarate	12 mmol /l

❖ Préparation de réactif du travail (RT)

Dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1(15ml). Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

❖ Mode opératoire

RT (ml)	1,0
Echantillon(μl)	100

- Mélanger et/ ou incube pendant 1 minute puis on lit l'absorbance (A), la densité optique DO à 340 nm contre le blanc réactif. Avec trois répétitions (à chaque fois 1 min d'incubation).

❖ Calcul

L'activité d'aspartate amino transférase sérique est calculée par la formule suivante :

$$\text{AST U /L} = \Delta \text{ Abs/min} \times 1750$$

6.7.7. Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) (selon la fiche technique BIOLABO)

❖ Principe

Méthode optimisée basée sur les recommandations de la **DGKC** (Société allemande de chimie clinique ,1972) et de la **SCE** (Société scandinave de chimie clinique).

En milieu alcalin, les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol et phosphate.

La vitesse d'apparition du p-nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité PAL dans le spécimen.

Echantillon : sérum.

❖ Les réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif (R ₁) (Tampon)	-Diethanolamine (DEA) - Chlorure de Magnésium	1 mmol /l 0.5 mmol /l
Réactif (R ₂) (Substrat)	-P-nitrophényl-phosphate.	10 mmol/l

❖ Préparation de réactif de travail (RT)

- Flacon R2 : utiliser un objet non coupant pour enlever la capsule.
- Verser sans délai le contenu du flacon R2(Substrat) dans le flacon R1(Tampon).
- Mélanger doucement et atteindre la dissolution complète avant d'utiliser le réactif (environ 2min).

❖ Mode opératoire

- Porter le réactif et les spécimens à température ambiante.
- Introduire dans une cuve thermostatée de 1 cm de trajet optique :

Réactif	1 ml
----------------	------

- Laisser la température s'équilibrer à 37°C puis ajouter :

Spécimen	10 µl
-----------------	-------

- Mélanger. Après 1 min, lire l'absorbance à 405 nm puis toutes les minutes pendant 3min.
- Calculer la moyenne des variations d'absorbance par minute ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$).

❖ Calcul

- Avec facteur théorique :

$$\text{PAL UI /L} = (\Delta\text{Abs/min}) \times 5450$$

- Avec multicalibrateur sérique :

$$\text{PAL UI/L} = (\Delta\text{Abs /min}) \text{ Dosage} / (\Delta\text{Abs/min}) \text{ Calibrant} \times \text{Concentration du Calibrant}$$

6.8. Dosage des paramètres du stress oxydatif au niveau tissulaire**6.8.1. Préparation de l'homogénat****❖ Protocole**

0.5g de foie, des reins, de cœur, des poumons et des testicules des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le tampon phosphate (0.1M, PH = 7.8). On a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (5000 tours/min, 4°C, 15min). Le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs puis conservé à -20°C en jusqu'au moment de dosage.

6.8.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)**❖ Principe**

La peroxydation lipidique dans le foie, rein, cœur, poumon et testicule est évaluée par le dosage de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode **d'Ohkawa et al (1979)**. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose.

❖ Protocole

✓ 0,5 ml de l'homogénat, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés.

✓ Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol.

✓ Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/minute, l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm.

La concentration de MDA est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec une solution de « 1,3,3,3-tétratoxypropane » qui donne le MDA après son hydrolyse (Annexe 4).

6.8.3. Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de **Wekbeker et Cory (1988)**.

❖ Principe

Ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-marcapturique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque par les groupements (-SH) du glutathion.

❖ Protocole

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat
- ✓ Ajouter 0.2ml de la solution d'acide salicylique (0.25%)
- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace
- ✓ Centrifuger à 1000 tours /min pendant 5 min
- ✓ Prélever 0.5ml du surnageant
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA, pH 7.4
- ✓ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M

Laisser pendant 5min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (n mol/mg protéine)} = \text{DO} \times 1 \times 1,525 / 13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéine}$$

6.8.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

❖ Principe

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode d'Aebi, (1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique à 25 C° selon la réaction suivante :



❖ Protocole

✓ Dans une cuvette en quartz, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).

✓ Le changement de l'absorbance est suivi pendant une minute à un intervalle de 15 secondes, à une longueur d'onde de 240 nm.

L'activité enzymatique est déterminée par l'utilisation de coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 0.043\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et les résultats sont exprimés en µmole d'H₂O₂ décomposer/min/ mg de protéine.

6.8.5. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de la superoxyde dismutase (SOD) est réalisé selon la méthode de Asada et al., (1974).

❖ Protocole

✓ Prélever 0.1 ml de mélange (méthionine (13mM) et Na₂EDTA (0.1mM)).

✓ Ajouter 0.8922ml de tampon phosphate (50mM, pH=7.8).

✓ Ajouter 0.05ml du surnageant.

✓ Ajouter 0.95ml de tampon phosphate.

✓ Ajouter 0.0852ml de NBT (2.64mM).

✓ Ajouter 0.0226ml de riboflavine (0.26mM).

La réduction du NBT est estimée après 20min à une longueur d'onde 580nm contre le blanc.

Le pourcentage (Y) contre unité de SOD (quantité des protéines enzymatiques capable d'inhiber 50% de NBT) peut être calculé selon l'équation suivante :

$$Y = ((\text{DO étalon} - \text{DO échant}) / \text{DO étalon}) \times 100) \times 20/C$$

Où :

20 : Facteur de dilution de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

C : la concentration des protéines dans l'échantillon (mg/ml).

6.8.6. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

❖ Principe

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

❖ Méthode

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **Habig et al (1974)**. Celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37°C et à un PH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

❖ Protocole

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

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

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

$$\text{GST (nmolGST/min/mg protéin)} = \text{DO éch/min} - \text{DO blanc/min} \div 9,6 \times \text{mgprot}$$

Où :

DO : densité optique de l'échantillon /min.

DO/min blanc : densité optique du blanc/min.

9,6 : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en Mm.cM.

6.8.7. Dosage des protéines

❖ Principe

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Les protéines réagissent avec un réactif coloré contenant de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol ainsi que le bleu de coomassie (BBC). Ce réactif réagit avec le groupement (-NH₂) des protéines. L'intensité de la couleur reflète la concentration des protéines.

❖ Protocole

- ✓ 50 µl de l'homogénat sont ajoutés à 2.5 ml de réactif de Bradford.
- ✓ Agitation.
- ✓ Incubation 5 minutes à température ambiante puis lecture de l'absorbance à $\lambda = 595$ nm contre un blanc réactif.

La concentration de protéines est déduite à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec une solution de « BSA » (Annexe 3).

7. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital IBN ZOHR de Guelma.

La technique utilisée comporte les étapes suivantes :

7.1. Fixation des organes

La fixation est réalisée immédiatement après le prélèvement de l'échantillon à observer par un liquide fixateur ou par congélation. Elle permet de l'immobiliser et le conserver dans le temps, dans un état proche du vivant respectant la structure tissulaire.

C'est l'étape la plus importante pour produire de bonnes coupes histologiques. Les liquides fixateurs sont très nombreux, nous avons utilisé le Formol ; il est communément employé pour la conservation des tissus animaux ou végétaux.

7.2. Préparation des cassettes

Avant de commencer le processus de déshydratation des pièces devant mettre l'organe en intégrale prélevé dans des cassettes (LEICA) en poly acétal avec couvercle incorporé.

7.3. Déshydratation des échantillons

Il est nécessaire de déshydrater au préalable l'échantillon en remplaçant l'eau qu'il contient par de l'éthanol pour que les pièces soient soigneusement déshydratées avant leur inclusion dans la paraffine. Ces étapes sont réalisées par un système de préparation d'échantillons automatique par remplissage.

- Mettez les cassettes dans un automate (le SLEE MTP) assure la rapidité du traitement, la flexibilité, la protection de l'environnement et d'économies.
- Facile à l'utiliser comprend 12 stations : dix bécjers en plastique ou en verre pour réactifs et solvants de traitement (xylène, éthanol, formol) et deux pots de paraffine en aluminium, il peut transporter jusqu'à 240 cassettes (standard : 120).
- Entièrement programmable grâce à l'écran LCD, et cette technique repose sur le système de rotation des bains durant presque 16 h :40 min.

7.4. L'inclusion et la réalisation des blocs

Le but de cette opération est de faire pénétrer dans les pièces une substance semi dure : la paraffine, de façon à créer une homogénéité de consistance favorable pour la coupe tout en respectant l'intégrité des tissus et à rigidifier l'échantillon.

Le paraffinage a lieu grâce à une station de paraffinage (SLEE MPS/P1) composé d'un bac thermostat, une zone d'inclusion et une plaque chauffante.

1- Déposer l'organe dans un moule métallique en inox et le remplir avec de la paraffine en appuyant sur le pédale de distribution de paraffine incluse déjà fondue à $T \geq 65^{\circ}\text{C}$ dans la zone d'inclusion qui est sous forme d'un réservoir principal de 6 litres, puis le fixer à l'aide d'une pince métallique en travaillant sur la surface refroidie de $T = -10^{\circ}\text{C}$.

2- Couvrir le moule avec le couvercle de la cassette et le laisser refroidir quelques instants sur la platine réfrigérée dédié à la finalisation d'inclusion à $T = [0 \text{ à } 20^{\circ}\text{C}]$, pour l'obtention des blocs.

3- Les blocs sont conservés au froid jusqu'à la coupe des pièces.

7.5. Coupes des organes

Pour la réalisation de fines coupes histologiques il faut d'abord dégrosser les cassettes pour éliminer l'excès de paraffine avec une épaisseur de $10\mu\text{m}$.

1- Après le dégrossissage on doit régler l'épaisseur du microtome (LEICA RM 2125RTS) entre $0,5$ et $0,1 \mu\text{m}$ puis plaçant la cassette dans l'endroit et l'orientation convenable avec le rasoir.

2- Le mouvement remis en marche, à chaque passage de la pièce, il se fait des coupes ($0,1$ - $0,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur) qui se collent automatiquement entre autres. On obtient ainsi un ruban de coupe.

3- Le ruban fractionné est posé à la surface d'une lame contenant des gouttes d'eau tiède chauffée sur une plaque chauffante ou $T = 60^{\circ}\text{C}$. Laisser la coupe à la surface de l'eau juste le temps nécessaire pour l'aplanir.

4- Avant de placer les lames à l'étuve, égouttez- les brièvement verticalement pour retirer l'excédent d'eau, puis séchées les lames à plat sur la plaque chauffante (SLEE MPS/P1)), et finalement les lames peuvent être rangées dans des portoirs pour lames en positions droite, puis séchées à l'étuve.

5- Généralement, les lames ont été toutes marquées sur leur bord par un stylo à diamant.

7.6. Coloration

Les colorations sont réalisées à l'aide de colorants ne fonctionnant que sur des tissus hydratés. Les lames doivent donc être déparaffinées avant leur réhydratation dans des bains décroissant de l'alcool.

- ✓ **Déparaffinage des coupes :** Mettez le portoir dans une étuve (modèle PANACEA) à $T \in [80 - 100^{\circ}\text{C}]$ pendant 20min.
- ✓ **Déshydratation des coupes :** Mettez le portoir sorti de l'étuve directement dans un cristalliseur de Xylène entre 10 et 60s. Réalisez un rinçage dans 2 bains d'éthanol et l'eau de robinet pour éliminer la trace de paraffine.

- ✓ **Coloration au Mayer :** Plongez le portoir dans un bain contenant l'hématoxyline de Mayer 8min puis rincez sous l'eau de robinet.
- ✓ **Coloration à l'éosine :** faire plonger le portoir des lames dans le cristalliseur de l'éosine 8min.
- ✓ **Déshydratation :** réalisez un 2^{ème} rinçage avec de l'éthanol, xylène-acétone, xylène comme suit : 4 cristalliseur d'éthanol, 2 xylène-acétone (50% 50%) et 2 xylène.

7.7. Montage

Déposer une goutte d'une solution (Baume d'inclusion) permettant l'adhésion (EUKITT) sur la lame, et recouvrir d'une lamelle couvre-objet propre et sèche en l'inclinant progressivement de façon que la solution s'étende peu à peu et recouvre la coupe sans emprisonner les bulles d'aires.

La solution ne doit pas déborder, la lamelle est adhérente et la préparation prête pour l'observation microscopique.

7.8. Observation au microscope

Les coupes sont observées au microscope optique équipé d'un appareil photographique à différents grossissements.

8. Analyse statistique des résultats

Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement statistique des données (Version 18). Les résultats sont représentés sous la forme : moyenne \pm écart type moyenne. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA) et à l'aide du test de Tukay, nous avons comparé les moyennes.

Les différences sont considérées comme :

- ✓ Significatives * lorsque ($p < 0.05$).
- ✓ Hautement significative ** lorsque ($p < 0.01$).
- ✓ Très hautement significative lorsque ** ($p < 0.001$).
- ✓ Non significatives lorsque $p \geq 0.001, 0.01, 0.05$

Avec **p** : seuil de signification.

Résultats et discussion

1. Analyse des caractéristiques de l'huile d'oléastre

1.1. Analyse organoleptique (sensorielle)

Les résultats des tests sensoriels effectués sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5. L'analyse sensorielle de l'huile d'oléastre.

Personne	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5
Caractère					
Couleur	Jaune clair	Jaune au vert	Jaune foncé	Jaune foncé	Jaune foncé
Aspect/Texture	Moyenne	Forte	Moyenne	Forte	Moyenne
Odeur	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable	Acceptable
Saveur	Bonne	Bonne	Bonne	Bonne	Bonne
Gout	Fruité (olive)	Sucré	Fruité (olive)	Fruité (olive)	Fruité (olive)

1.2. Analyse physico-chimique

1.2.1. Analyse physique

1.2.1.1. Les indices physiques

Les propriétés physiques des huiles végétales sont des indicateurs de pureté et sont donc capables de révéler des cas de fraudes (D'Aygalliers, 2013). Les résultats du pH, l'indice de réfraction et l'humidité, sont estimés à : (4,77), (1,470), et (0,72) respectivement (Figure 15).

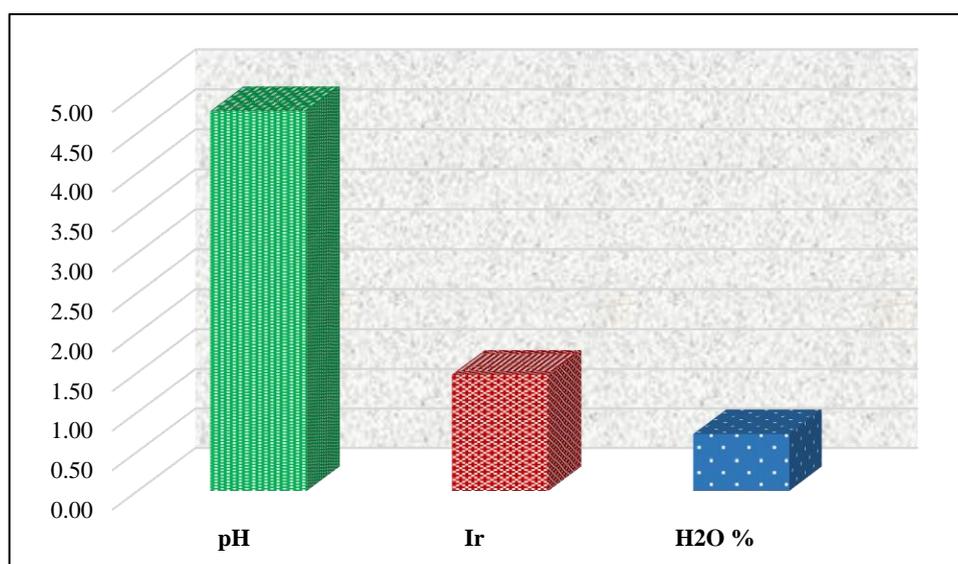


Figure 15. Indices de qualité physique de l'huile d'oléastre.

1.2.1.2. L'absorbance dans l'UV

L'extinction spécifique de l'huile d'oléastre dans l'UV est une image de son état d'oxydation. En effet, l'oxydation conduit à la formation des diènes conjugués qui absorbent à 232 nm, et les produits secondaires d'oxydation présentent une absorbance maximale vers 270 nm.

La valeur obtenue montre que l'absorbance spécifique à 232 nm, conforme aux limites fixées par le COI (2018) pour une huile d'olive extra vierge (HOEV) à savoir K_{232} inférieur à 2,5. Cependant, le coefficient d'extinction spécifique à 270 nm est inférieur aux limites établies par le COI (2018) pour une HOEV (K_{270} inférieur à 0,22), le coefficient d'extinction spécifique à 232 nm est de 0,96 et à 270 nm est de 0,118. (Figure 16).

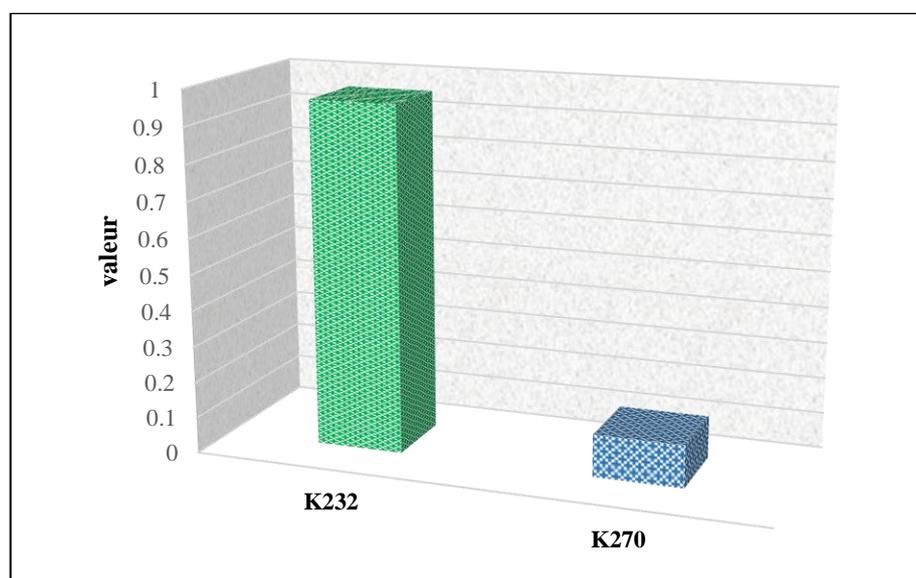


Figure 16. Les extinctions spécifiques dans l'UV (K_{270} et K_{232}).

1.2.2. Analyse chimique

L'indice de peroxyde évalue la teneur en hydroperoxydes présents dans l'huile d'oléastre et mesure l'oxydation des lipides (Haddada *et al.*, 2008). La rancidité hydrolytique serait le problème de qualité majeur de ces huiles. Celle-ci est liée à l'hydrolyse des glycérides causant l'augmentation conséquente de l'acidité totale et la détérioration de l'arôme.

Les résultats de l'acidité, l'indice de peroxyde, l'indice de saponification et l'indice d'iode, sont estimés à : (2,42), (45), (141,65) et (90,09) respectivement (Figure 17).

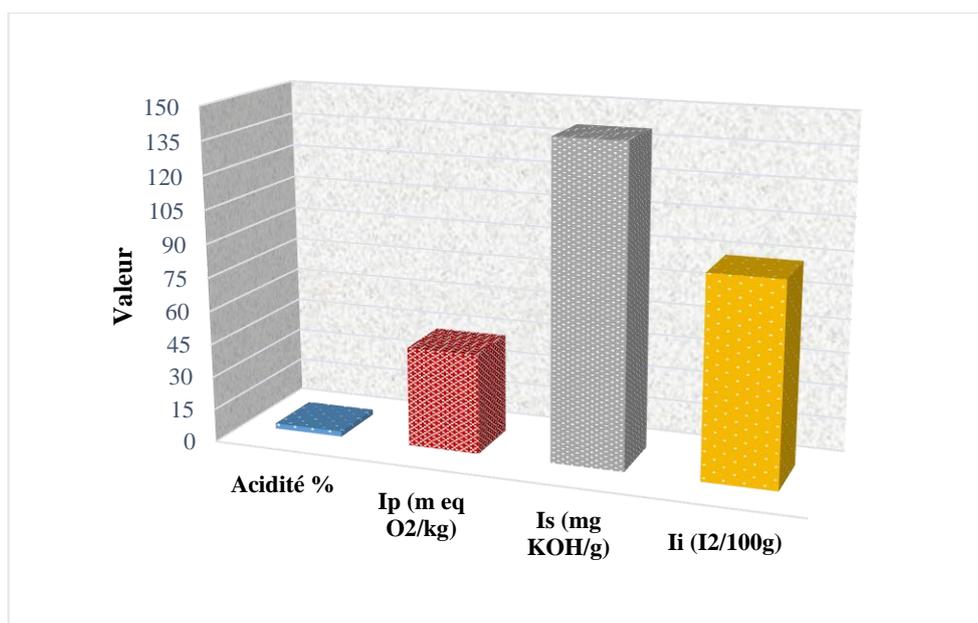


Figure 17. Indices de qualité chimique de l'huile d'oléastre.

1.3. Dosage des pigments colorants (chlorophylles et caroténoïdes)

L'évolution de la teneur en chlorophylles renseigne sur les substances colorantes contenues dans l'huile. Selon **Lazzez et al. (2006)**, les carotènes sont des substances chimiques naturelles impliquées dans les mécanismes d'oxydation de l'huile. Les résultats de la détermination des teneurs en chlorophylles et caroténoïdes donnent des valeurs estimées à 0,36 et 7,75 respectivement (Figure 18).

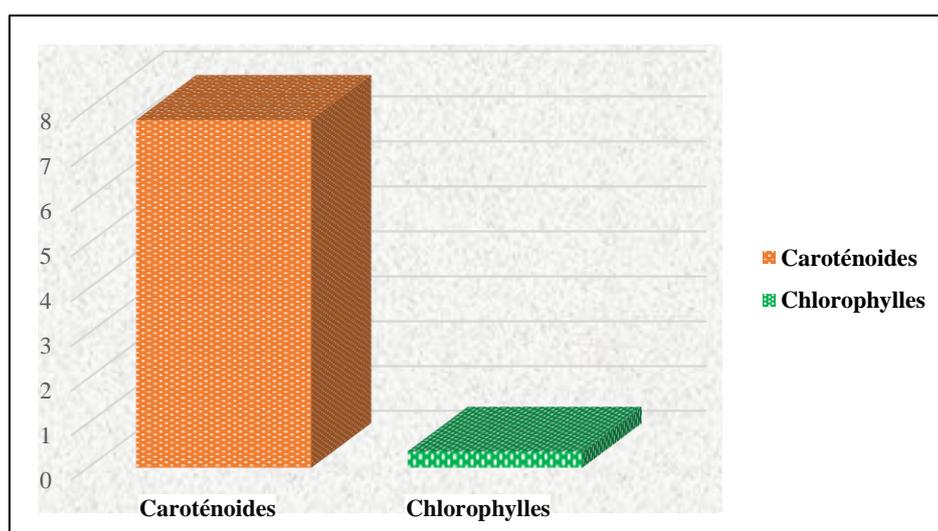


Figure 18. Pigments colorants (chlorophylles et caroténoïdes).

1.4. Dosage des composés phénoliques

1.4.1. Teneur en polyphénols

Les composés phénoliques ont une importance fondamentale dans les caractéristiques nutritionnelles et sensorielles de l'huile d'olive vierge (Montedoro *et al.*, 1992). La teneur des polyphénols totaux de notre échantillon est de 314 mg EAG/kg exprimé en milligrammes d'équivalent d'acide gallique.

1.4.2. Teneur en flavonoïdes

D'après plusieurs auteurs, les flavonoïdes sont présents en petites quantités dans l'huile d'olive vierge (Servili *et al.*, 2004 ; Oliveras-Lopez *et al.*, 2007). La teneur en flavonoïdes de notre échantillon est de 46,95 mgEQ/kg exprimée en milligrammes d'équivalent de quercétine.

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes sont représentées dans la figure 19.

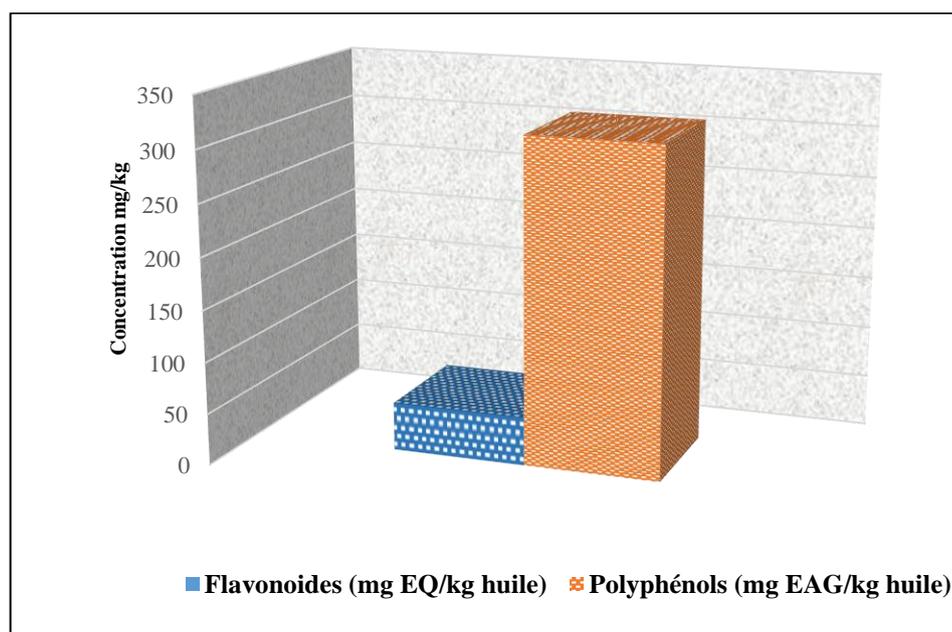


Figure 19. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

1.4.3. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH est largement utilisé pour évaluer la capacité des composés antioxydants d'agir en tant que piègeurs de radicaux libres ou donateurs d'hydrogène (Molyneux, 2004).

Le résultat obtenu est représenté dans la figure 20. L'extrait phénolique de notre huile exerce un pourcentage d'inhibition de 63,92% vis-à-vis le radical DPPH.

Ce test, nous a permis de déterminer la valeur de IC50 (plus l'IC50 est faible plus l'extrait est avec un potentiel antioxydant puissant.) qui a été de 1,37 mg/ml pour notre échantillon testé contre 2 mg/ml pour l'antioxydant de référence acide ascorbique.

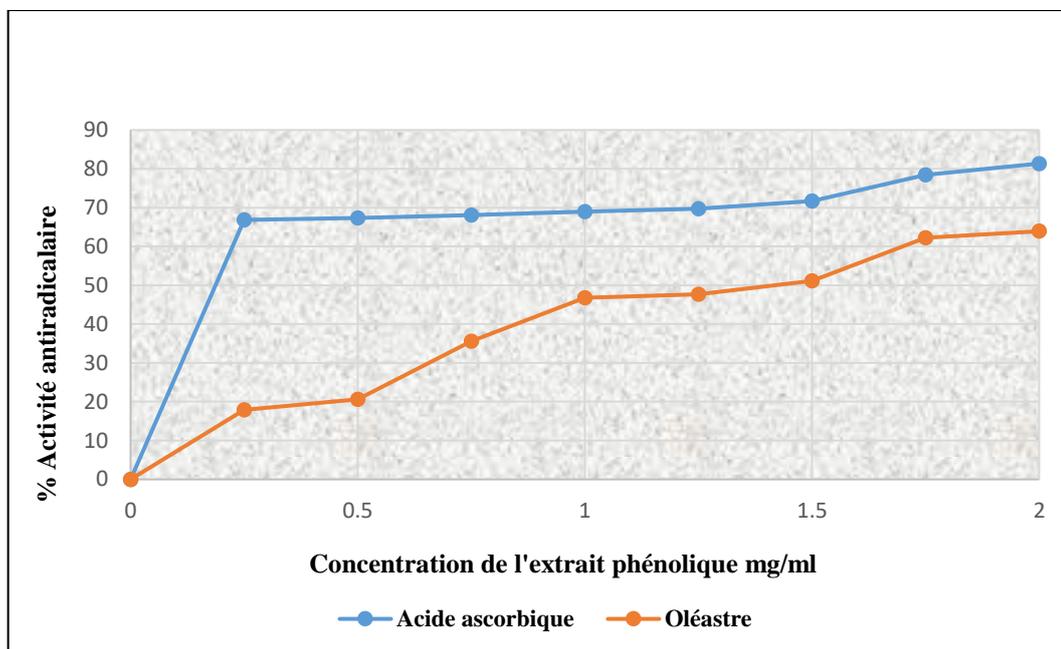


Figure 20. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique de l'huile d'oléastre.

2. Analyse des paramètres biochimiques

Les résultats de l'injection des nanoparticules de nickel et de silice et l'administration de l'huile d'oléastre sur les concentrations sériques des paramètres biochimiques (cholestérol, cholestérol HDL, triglycérides, PAL, ASAT, créatinine et urée) sont représentées dans le tableau 6 et les figures (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Tableau 6. Concentration sérique des paramètres biochimiques (cholestérol, cholestérol HDL, triglycérides, PAL, ASAT, créatinine et urée) chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Expérimentaux	Groupes	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
Cholestérol (mg/dl)		77,9±6,4200	A*** 121,2±7,5312	A** 95,9±2,7696	B*** 75,3 ±5,2416	C*** 65,4±8,8056	D ^{Ns} 74,0±5,704
Cholestérol HDL (mg/dl)		53,1±6,0416	A** 73,6±5,6288	A* 68,3±5,2736	B*** 46,2±4,8120	C*** 32,5±6,3312	D** 34,1±6,9392
Triglycérides(mg/d)		22,7±5,254	A*** 90,6±3,546	A*** 67,6±6,163	B ^{Ns} 71,4±0,792	C* 33,9±10,402	D ^{Ns} 31,6±21,27
PAL (UI/L)		7,5±2,051	A ^{Ns} 2,1±1,192	A ^{Ns} 5,4±1,696	B ^{Ns} 6,9±1,344	C ^{Ns} 5,1±1,639	D* 24,4±17,13
ASAT (U/L)		29,6±0,840	A*** 142,3±26,136	A*** 87,0±1,680	B*** 48,7±6,718	C* 44,6±19,414	D ^{Ns} 38,7±24,92
Créatinine(mg/dl)		0,5±0,049	A*** 1,0±0,024	A ^{Ns} 0,5±0,059	B* 0,7±0,077	C ^{Ns} 0,4±0,026	D ^{Ns} 0,5±0,041
Urée (mg/dl)		31,7±3,980	A*** 64,2±18,901	A ^{Ns} 51,3±4,776	B*** 29,9±1,191	C ^{Ns} 34,6±0,789	D ^{Ns} 28,5±5,462

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : P ≤ 0.05; A** : P ≤ 0.01, A*** : P ≤ 0.001, A^{Ns} : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : P ≤ 0.05; B** : P ≤ 0.01, B*** : P ≤ 0.001, B^{Ns} : P ≥ 0.05 et C* : P ≤ 0.05; C** : P ≤ 0.01, C*** : P ≤ 0.001, C^{Ns} : P ≥ 0.05 la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : P ≤ 0.05; D** : P ≤ 0.01, D*** : P ≤ 0.001, D^{Ns} : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains.

2.1. Profil lipidique (cholestérol HDL, triglycérides, cholestérol)

L'interprétation des résultats démontre une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du cholestérol et de triglycérides et hautement significative ($p < 0.01$) de l'HDL chez les rats injectés par (Ni) par rapport aux rats témoins sains.

Nos résultats illustrent aussi qu'il existe une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) de cholestérol, très hautement significative de triglycérides ($p < 0.001$) et significative de l'HDL ($p < 0.05$) chez les rats injectés par (SiO_2) par rapport aux rats témoins sains.

Chez les rats injectés par (Ni) et traités par l'huile d'oléastre on constate une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du cholestérol et d'HDL et non significative de triglycérides, par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

Chez les rats injectés par (SiO_2) et traités par l'huile on constate aussi une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) du cholestérol et d'HDL, et significative ($p < 0.05$) de triglycérides par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités.

Par ailleurs, le traitement des rats par l'huile d'oléastre a induit aussi une diminution non significative du cholestérol et de triglycérides et hautement significative ($p < 0.001$) de l'HDL par rapport aux rats témoins sains. Les résultats sont rassemblés dans les figures suivantes.

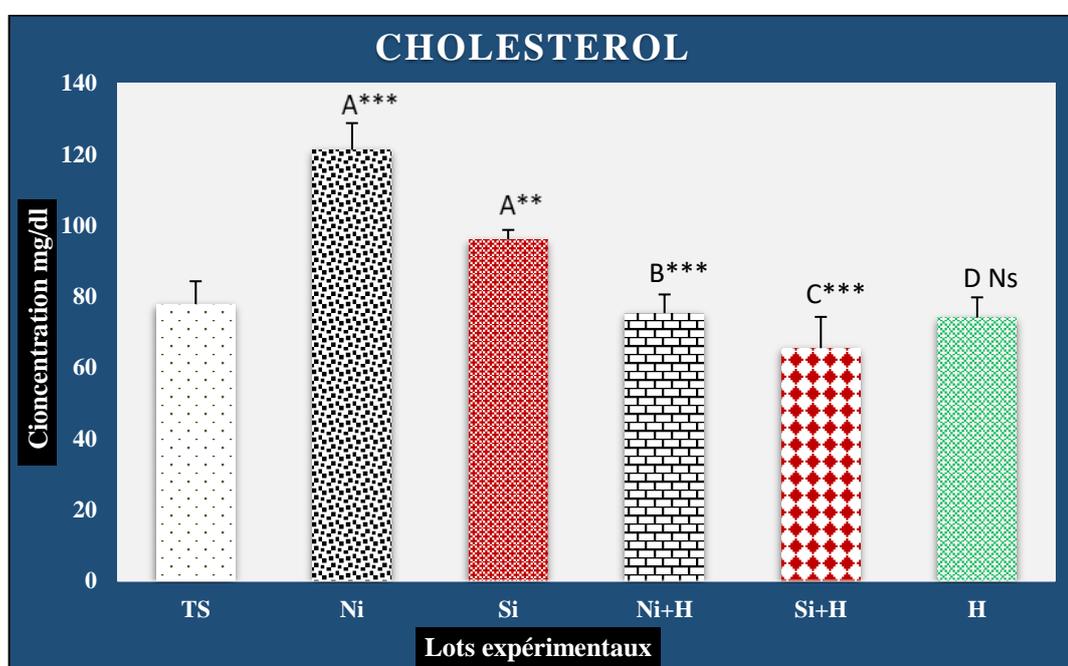


Figure 21. Concentration sérique du cholestérol chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm SEM$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

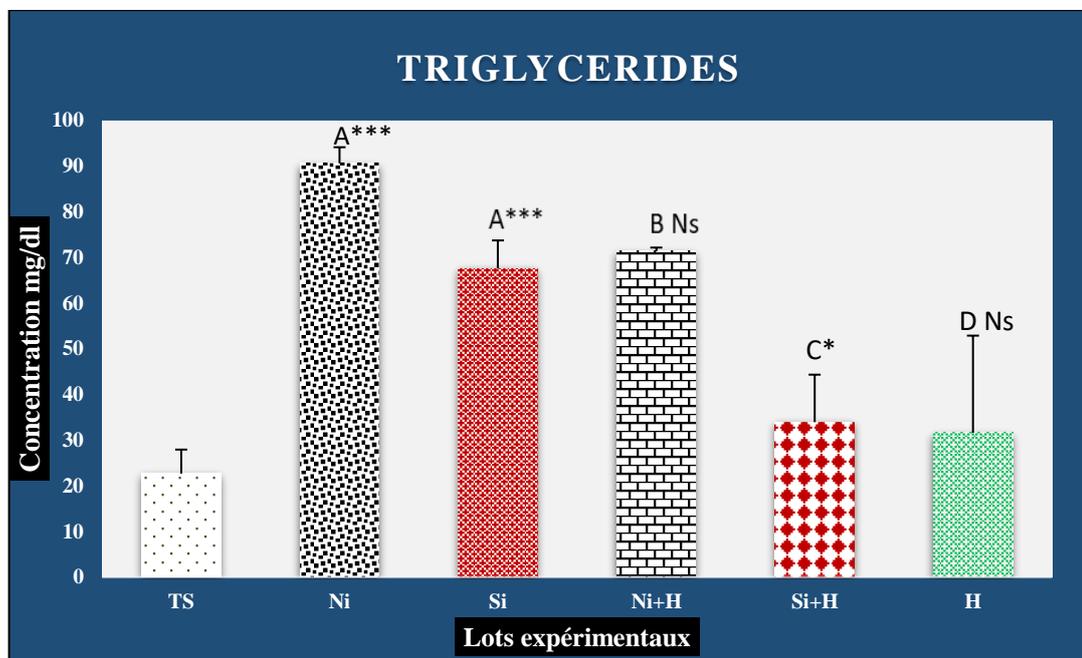


Figure 22. Concentration sérique du triglycéride chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm SEM$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

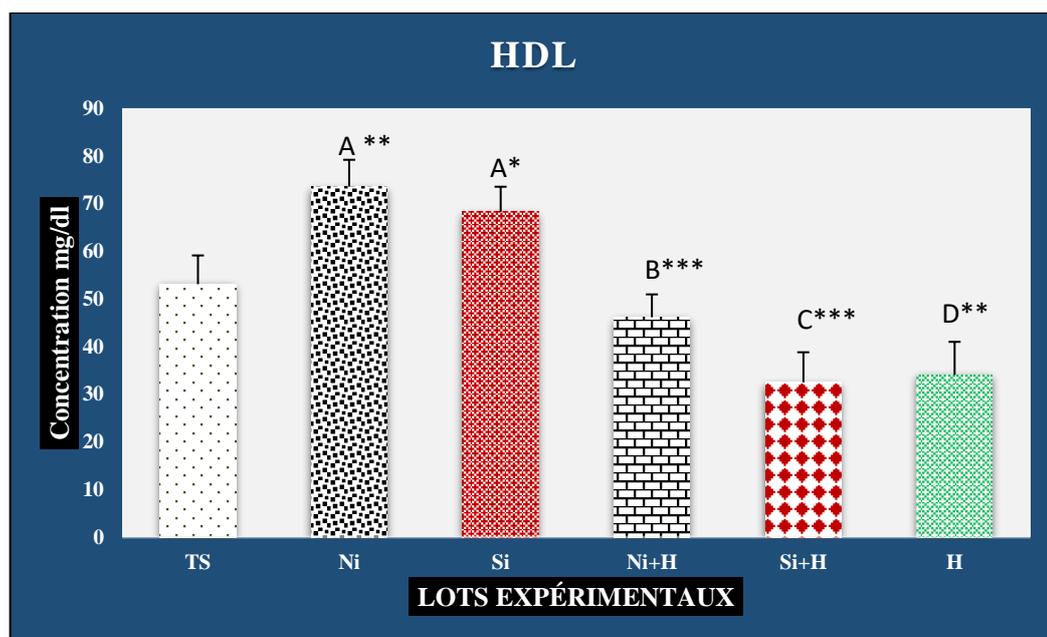


Figure 23. Concentration sérique de l'HDL chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

2.2. Profil protéique (urée, créatinine)

L'interprétation des résultats démontre une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'urée et de la créatinine chez les rats injectés par (Ni) par rapport aux rats témoins sains.

Nos résultats illustrent aussi qu'il existe une augmentation non significative ($p < 0.05$) de l'urée et de la créatinine chez les rats injectés par (SiO_2) par rapport aux rats témoins sains.

Puis chez les rats injectés par (Ni) et traités par huile on constate une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'urée et significative ($p < 0.05$) de la créatinine, par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

Ensuite, chez les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile on constate aussi une diminution non significative de l'urée et de la créatinine par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités.

Nos résultats montrent aussi que le traitement des rats par l'huile d'oléastre a induit aussi une diminution non significative de l'urée et de la créatinine par rapport aux rats témoins sains.

Les résultats sont rassemblés dans les figures suivantes.

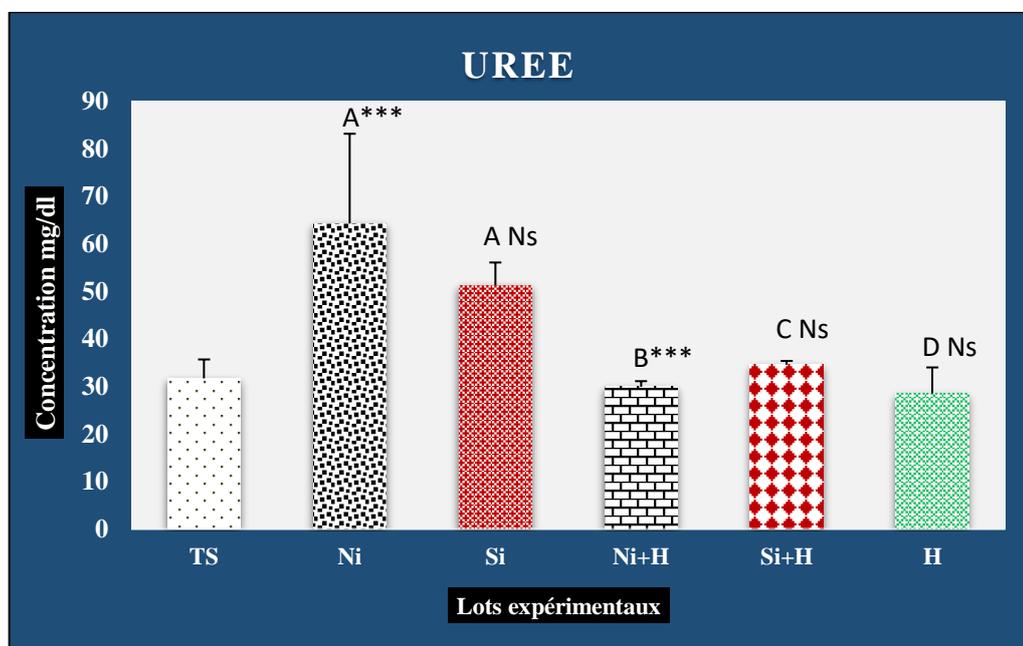


Figure 24. Concentration sérique de l'urée chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

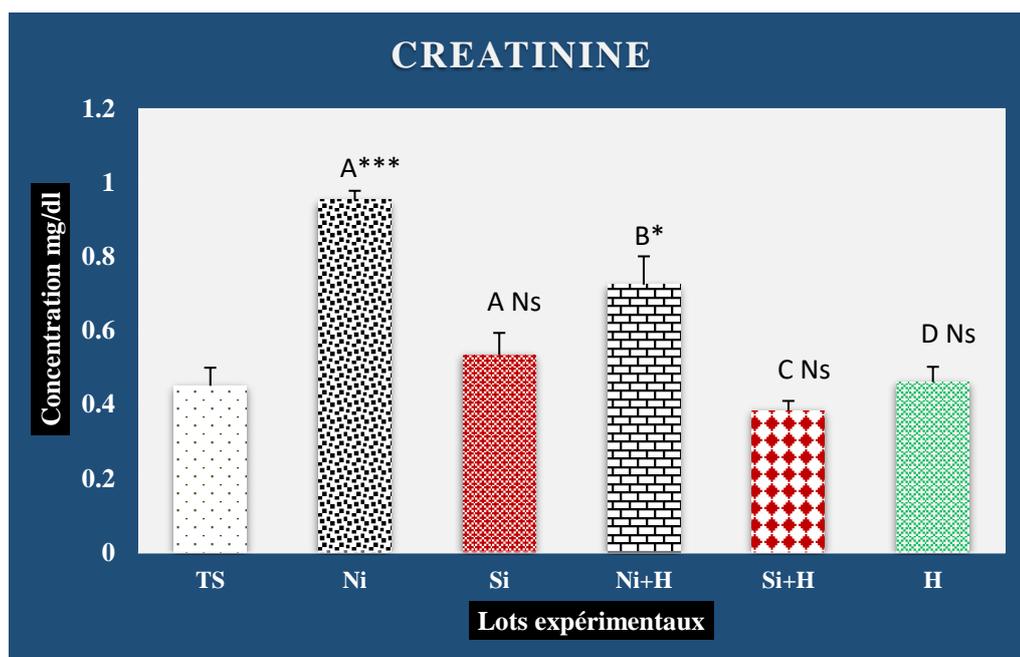


Figure 25. Concentration sérique de la créatinine chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

2.3. Activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL)

Nos résultats montrent une diminution non significative de l'activité enzymatique de la (PAL) chez les rats injectés par (Ni) ou par (SiO_2) par rapport aux rats témoins sains.

En revanche, on a enregistré une élévation non significative de l'activité de la (PAL) chez les rats injectés par (Ni) et traités par huile par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

Par contre, on remarque un rétablissement par une diminution non significative chez les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités. Le traitement des rats sains par l'huile entraîne une augmentation significative ($p < 0.05$) de la teneur en (PAL) par rapport aux rats témoins sains.

Les résultats sont rassemblés dans la figure suivante.

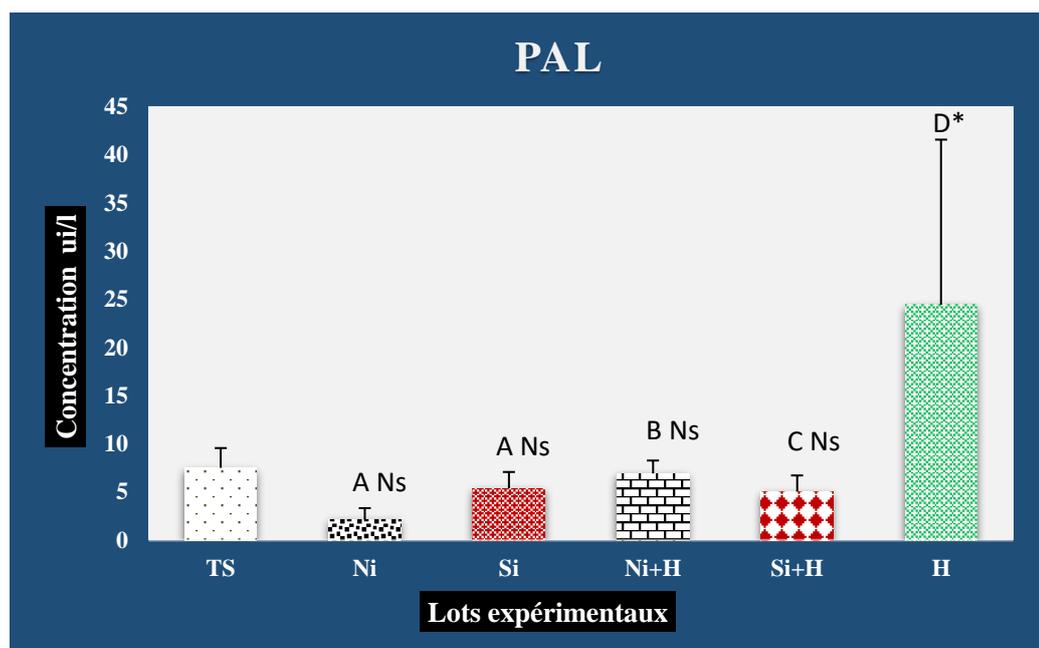


Figure 26. Concentration sérique de la PAL chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

2.4. Activité enzymatique de transaminase (l'aspartate aminotransférase ASAT)

D'après les résultats obtenus, on observe une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de transaminase (ASAT) chez les rats injectés par (Ni) ou par (SiO_2) comparant aux rats témoins sains.

Cependant, les rats injectés par (Ni) et traités par huile avaient une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de l'AST par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités, la même chose pour les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile d'oléastre montrent une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration enzymatique de l'ASAT par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités.

En revanche, on a enregistré une augmentation non significative de l'activité de l'ASAT chez les rats sains traités par huile en comparaison toujours avec les rats témoins sains.

Les résultats sont rassemblés dans la figure suivante.

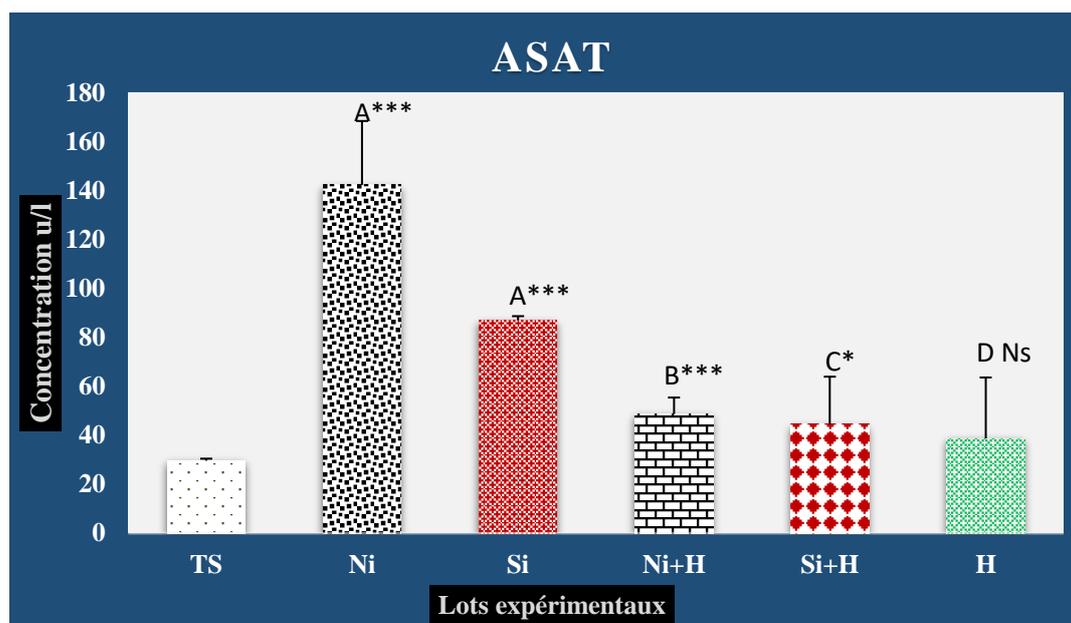


Figure 27. Concentration sérique de l'ASAT chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni) et les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

3. Analyse des paramètres tissulaires

3.1. Protéines

Le dosage de protéines a montré qu'il a subi une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie, des poumons, des testicules, et du cœur, mais cette diminution est significative ($p < 0.05$) au niveau des reins chez les rats injectés par (Ni) par rapport aux rats témoins sains.

Les résultats ont montré aussi une diminution de taux de protéine chez les rats injectés par (SiO_2) par rapport aux rats témoins sains, cette diminution est très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie et du cœur, et hautement significative ($p < 0.01$) au niveau des poumons et des testicules, et significative ($p < 0.05$) au niveau des reins.

Le traitement par l'huile d'oléastre aux rats injectés par (Ni) semble avoir un effet très hautement significatif ($p < 0.001$) au niveau du foie, des reins, des testicules, et du cœur, mais

cet effet est hautement significatif ($p < 0.01$) au niveau des poumons par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

Puis, chez les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile, cet effet est non significatif au niveau de tous les organes par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités.

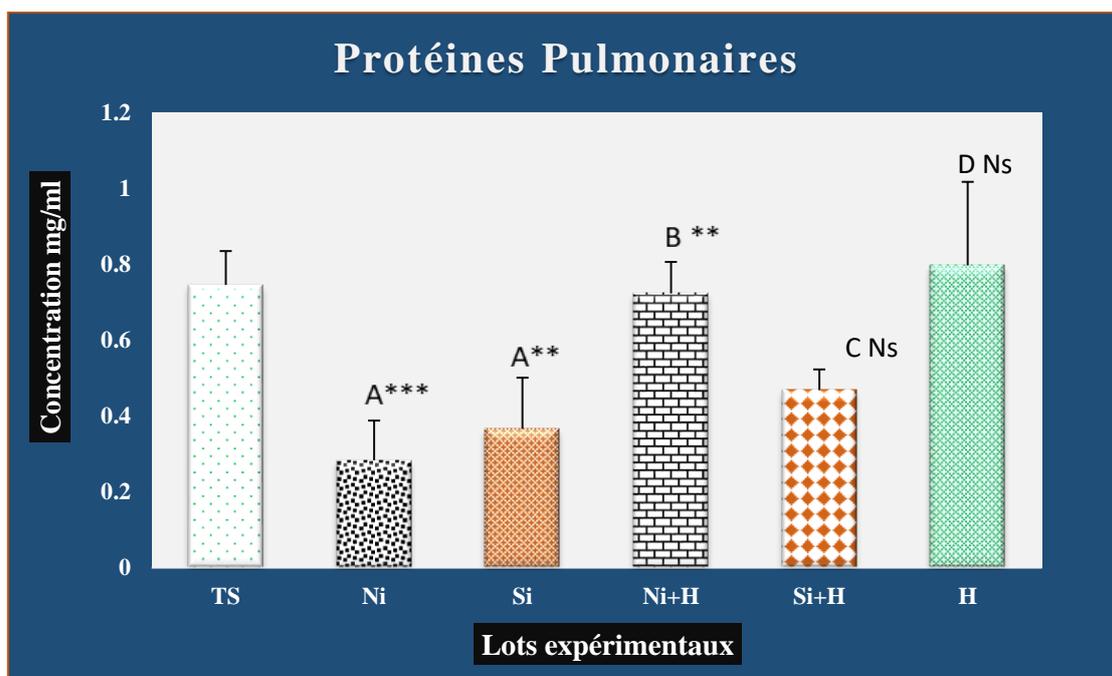
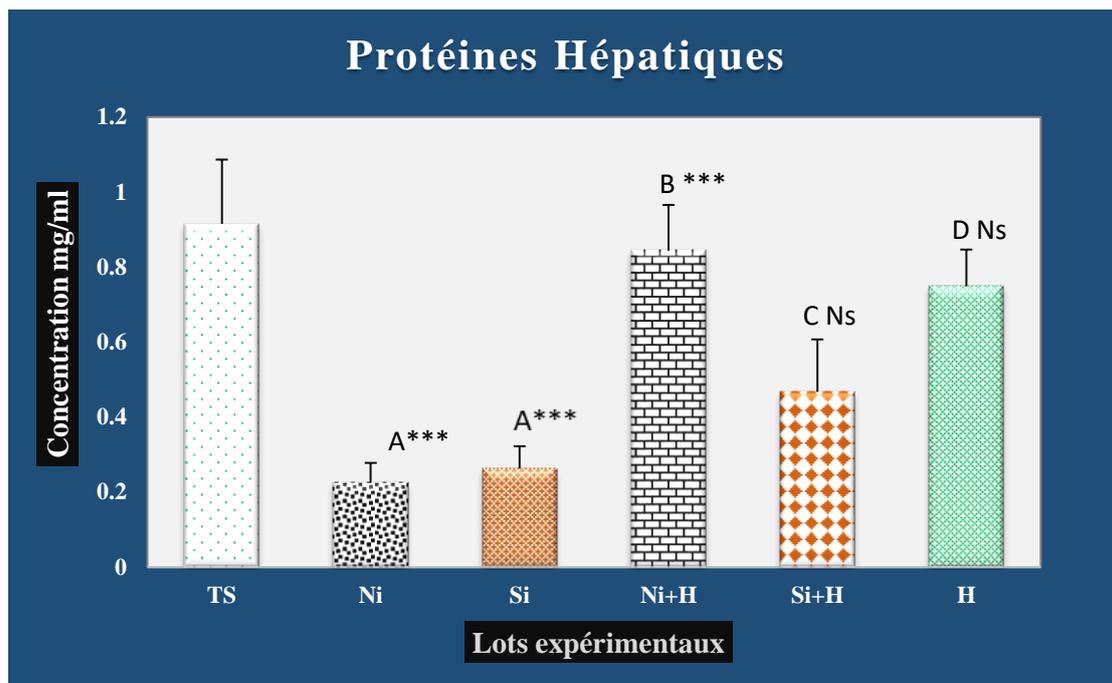
Les résultats ont montré aussi que le traitement des rats sains par l'huile d'oléastre, présente une augmentation non significative dans tous les organes par rapport aux rats témoins sains.

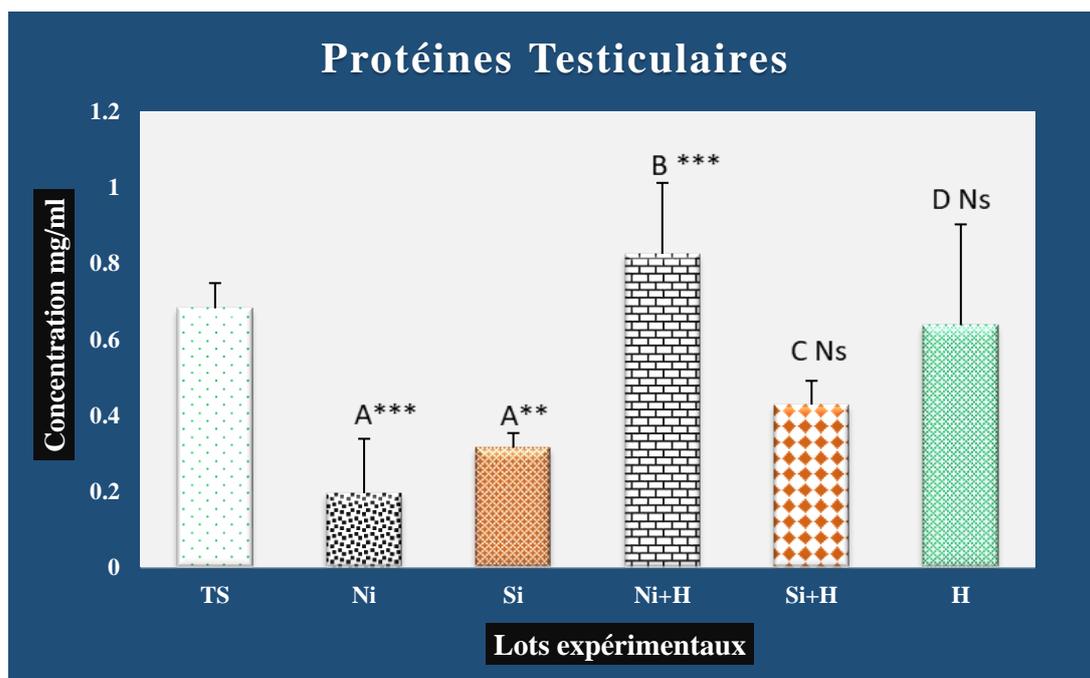
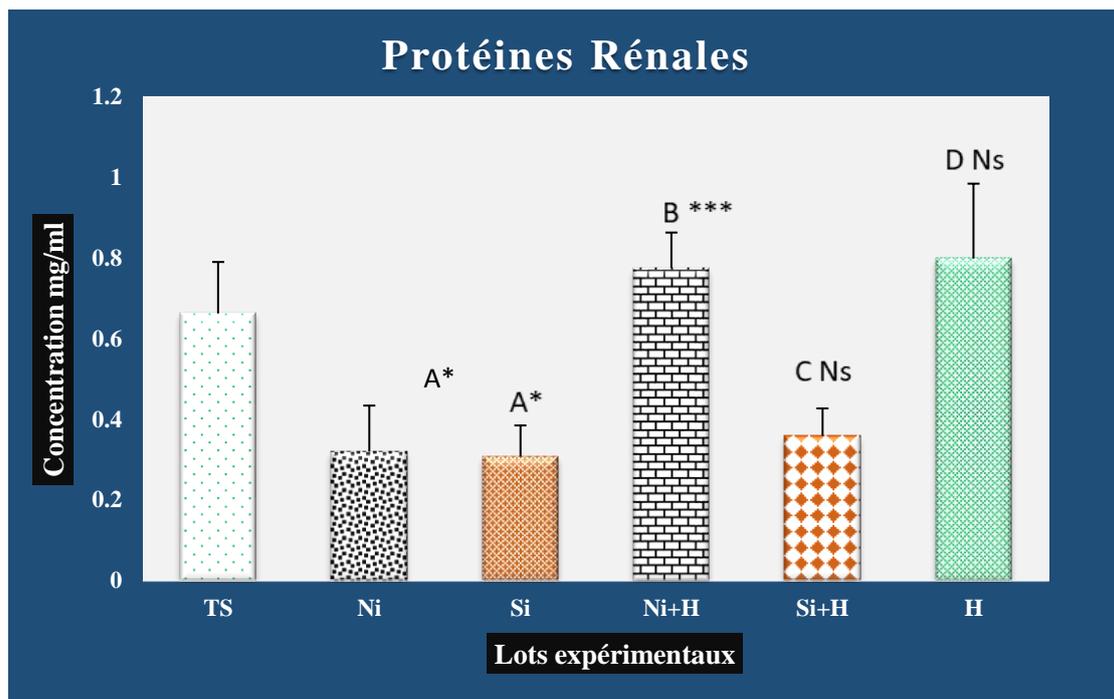
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 7 et la figure 28 suivants.

Tableau 7. Concentration de protéines hépatiques, pulmonaires, rénales, testiculaires et cardiaques chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
Prot hépatiques (mg/ml)	0,915±0,171	A*** 0,225±0,052	A *** 0,262±0,059	B*** 0,8438±0,121	C ^{Ns} 0,467±0,139	D ^{Ns} 0,748±0,097
Prot pulmonaires (mg/ml)	0,746±0,089	A*** 0,283±0,104	A** 0,366±0,134	B** 0,723±0,083	C ^{Ns} 0,468±0,054	D ^{Ns} 0,797±0,220
Prot rénales (mg/ml)	0,662±0,127	A* 0,319±0,114	A* 0,307±0,077	B*** 0,775±0,088	C ^{Ns} 0,359±0,068	D ^{Ns} 0,798±0,185
Prot testiculaires (mg/ml)	0,790±0,066	A*** 0,25±0,143	A** 0,376±0,038	B*** 0,815±0,187	C ^{Ns} 0,434±0,062	D ^{Ns} 0,764±0,265
Prot cardiaques (mg/ml)	0,682±0,122	A*** 0,194±0,105	A*** 0,314±0,069	B*** 0,825±0,078	C ^{Ns} 0,428±0,125	D ^{Ns} 0,638±0,066

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.





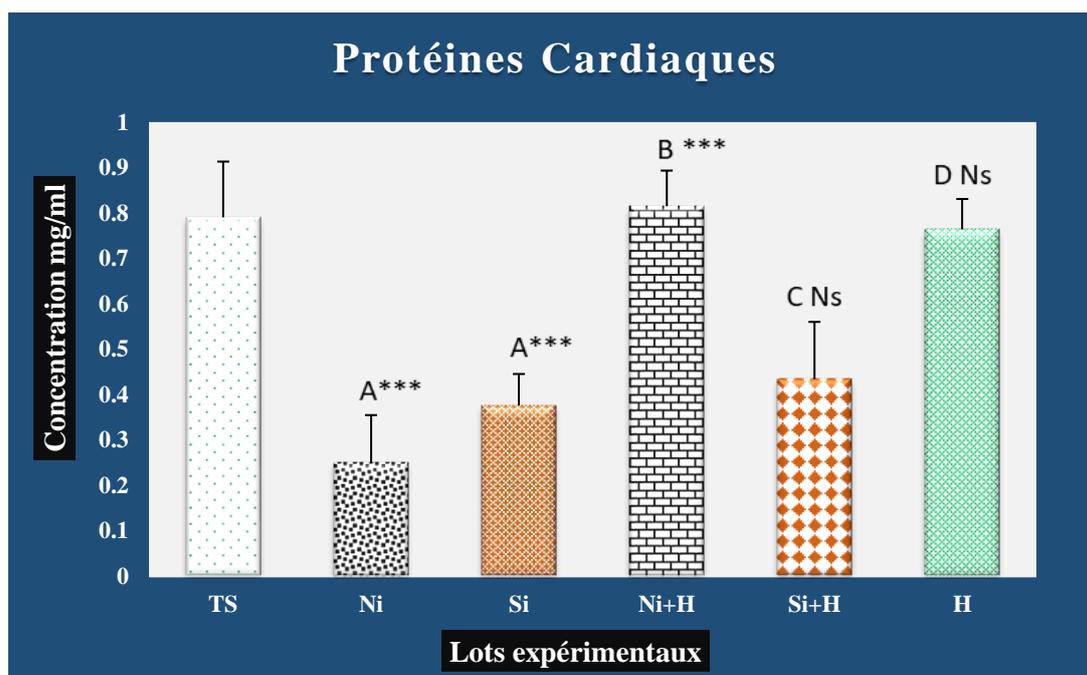


Figure 28. Concentration de protéines tissulaires au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : P ≤ 0.05; A** : P ≤ 0.01, A*** : P ≤ 0.001, A Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : P ≤ 0.05; B** : P ≤ 0.01, B*** : P ≤ 0.001, B Ns : P ≥ 0.05 et C* : P ≤ 0.05; C** : P ≤ 0.01, C*** : P ≤ 0.001, C Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : P ≤ 0.05; D** : P ≤ 0.01, D*** : P ≤ 0.001, D Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains.

3.2. MDA

Le dosage de MDA a montré qu'il a subi une augmentation hautement significative (p < 0.01) au niveau du foie et non significative au niveau des reins, des poumons, des testicules et du cœur chez les rats injectés par (Ni) par rapport aux rats témoins sains.

On note aussi une augmentation hautement significative (p < 0.001) au niveau des reins et du cœur et non significative au niveau du foie, des poumons et des testicules chez les rats injectés par (SiO₂) par rapport aux rats témoins sains.

Ensuite chez les rats injectés par Ni et traités par huile on constate une diminution très hautement significative (p < 0.001) au niveau du foie, hautement significative (p < 0.01) au niveau du cœur, significative (p < 0.05) au niveau des testicules et non significative au niveau des reins et des poumons par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

On constate aussi chez les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile, une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie et du cœur, hautement significative ($p < 0.01$) au niveau des poumons, significative ($p < 0.05$) au niveau des reins et non significative au niveau des testicules par rapport aux rats injectés par (SiO₂) et non traités.

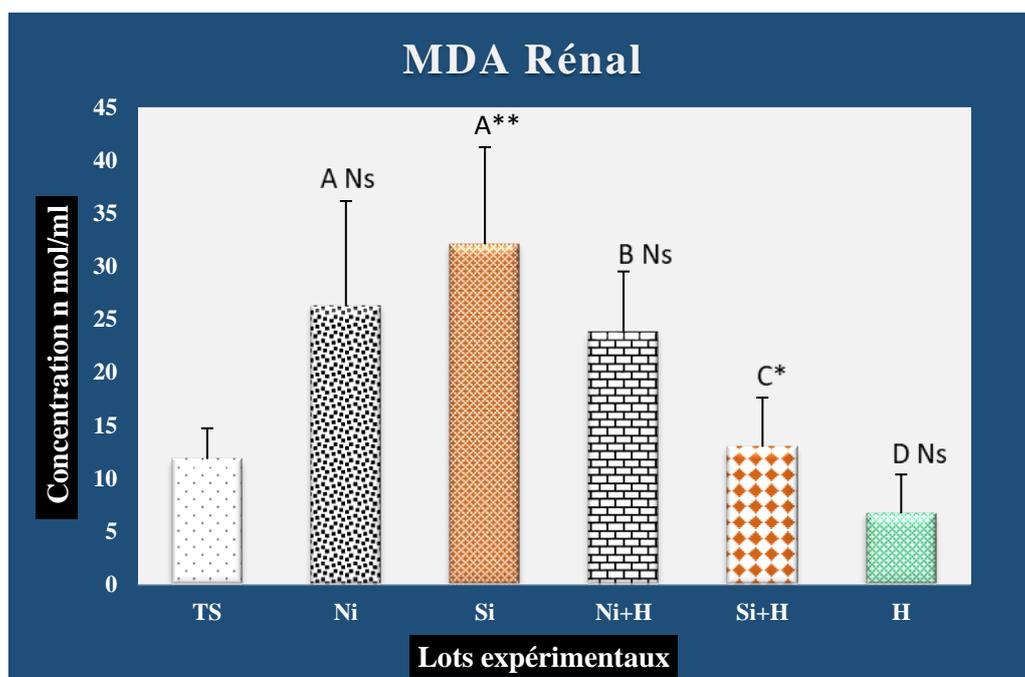
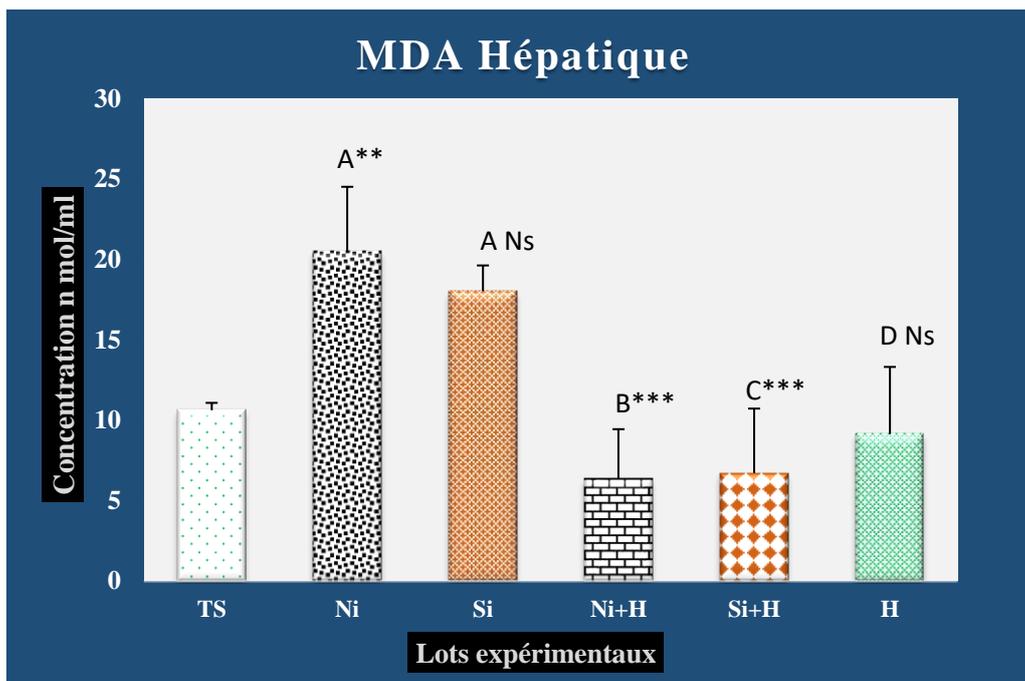
Chez les rats traités par l'huile, on note que l'effet est non significatif au niveau du foie, des poumons, des reins, des testicules et du cœur.

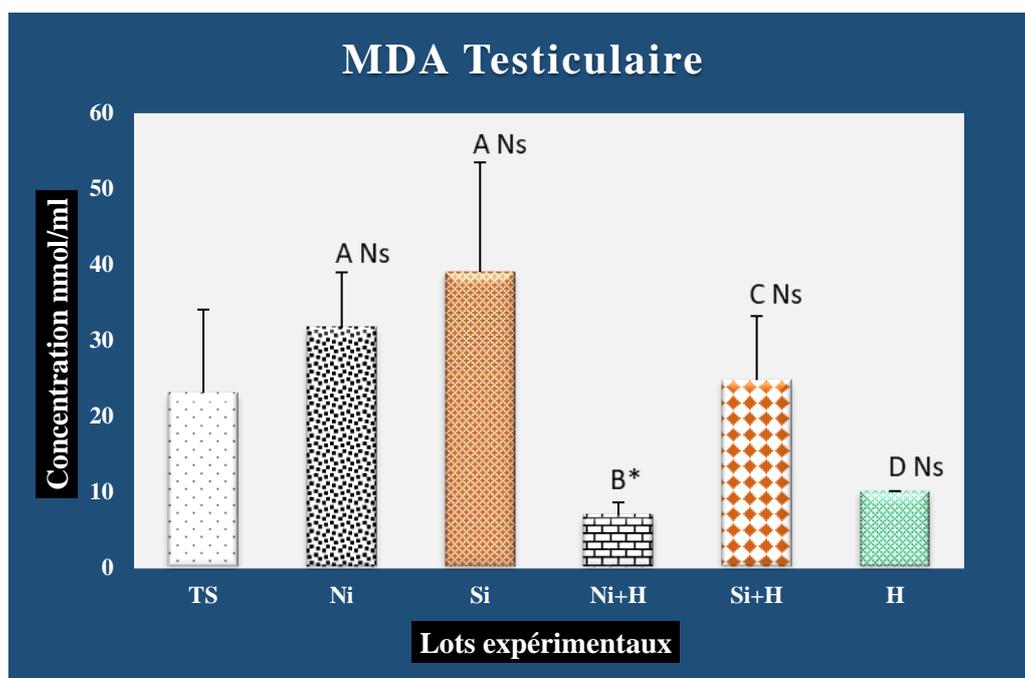
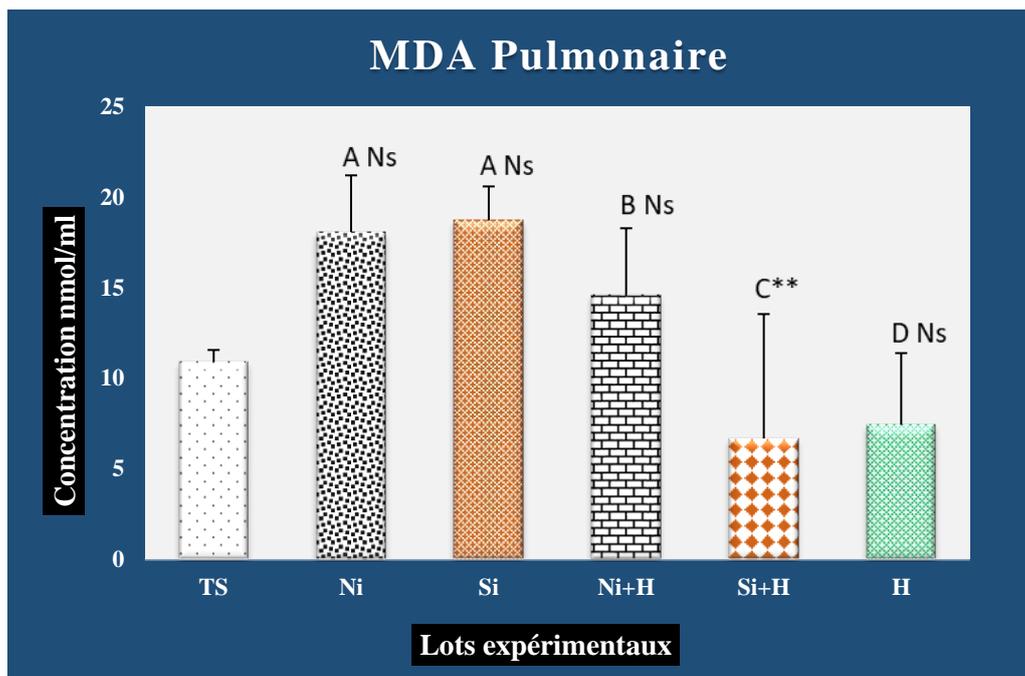
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8 et la figure 29 suivants.

Tableau 8. Concentration de MDA hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
MDA hépatique (nm/g tissu)	10,628±0,460	A** 20,495±4,033	A ^{Ns} 18,036±1,59 9	B*** 6,378 ±3,073	C*** 6,720±4,013	D ^{Ns} 9,145±4,179
MDA pulmonaire (nm/g tissu)	10,903±0,659	A ^{Ns} 18,078±3,133	A ^{Ns} 18,720±1,88	B ^{Ns} 14,629±3,66	C** 6,670±6,876	D ^{Ns} 7,429±3,96
MDA rénale (nm/g tissu)	11,811±2,906	A ^{Ns} 26,303±9,879	A** 32,128±9,15 3	B ^{Ns} 23,820±5,709	C* 12,97±4,646	D ^{Ns} 6,695±3,66
MDA testiculaire (nm/g tissu)	23,045±11,00 6	A ^{Ns} 31,695±7,273	A ^{Ns} 39,02±14,46 9	B* 6,978±1,613	C ^{Ns} 24,745±8,44 9	D ^{Ns} 10,045±0,040
MDA cardiaque (nm/g tissu)	16,62±2,1	A ^{Ns} 20,274±5,878	A** 30,661±1,59 9	B** 7,928±2,779	C*** 14,778±4,45 9	D ^{Ns} 8,511±5,679

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B^{Ns} : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.





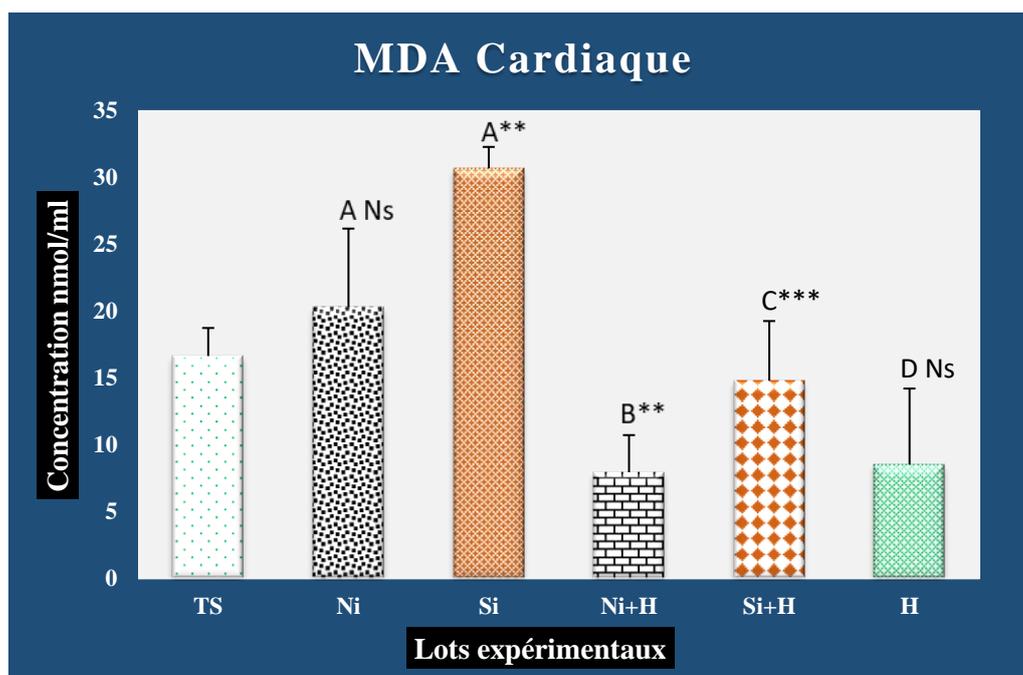


Figure 29. Concentration de MDA tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

3.3. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

L'évaluation de l'activité de SOD a montré qu'il a subi une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie, des reins et du cœur et hautement significative ($p < 0.01$) au niveau des poumons et non significative au niveau des testicules chez les rats injectés par (Ni) par rapport aux rats témoins sains.

On note aussi une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie, des poumons, des reins et du cœur et une diminution significative ($p < 0.05$) au niveau des testicules chez les rats injectés par (SiO_2) par rapport aux rats témoins sains.

Chez les rats injectés par Ni et traités par huile, on constate une augmentation non significative au niveau du cœur, des reins, des poumons, du foie et des testicules par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

On constate aussi chez les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile, une augmentation significative ($p < 0.05$) au niveau des poumons et non significative au niveau du foie, reins, cœur et testicules par rapport aux rats injectés par (SiO₂) et non traités.

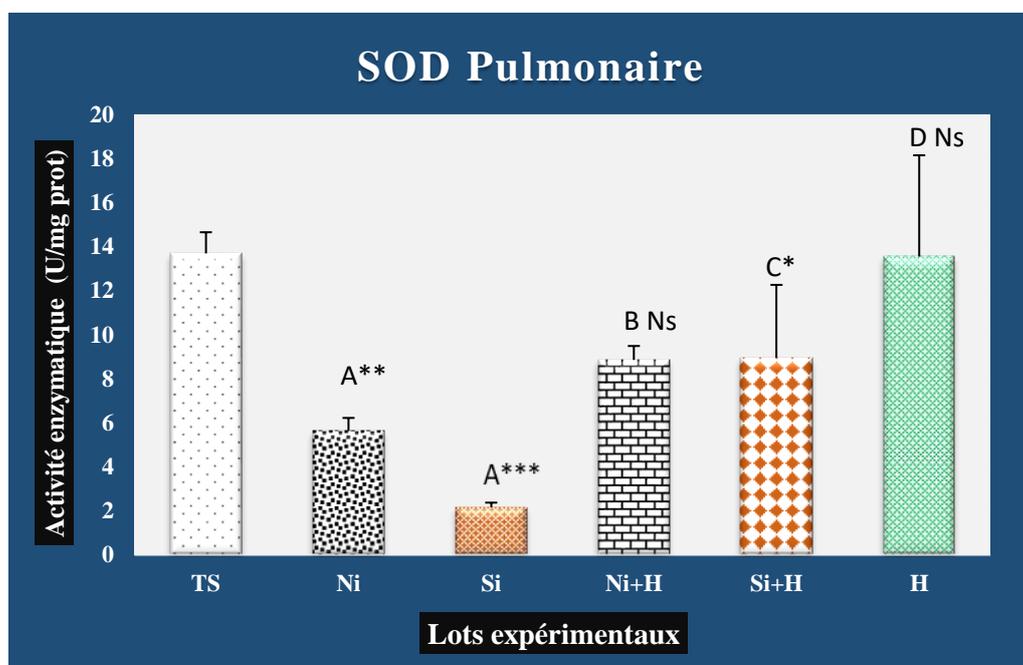
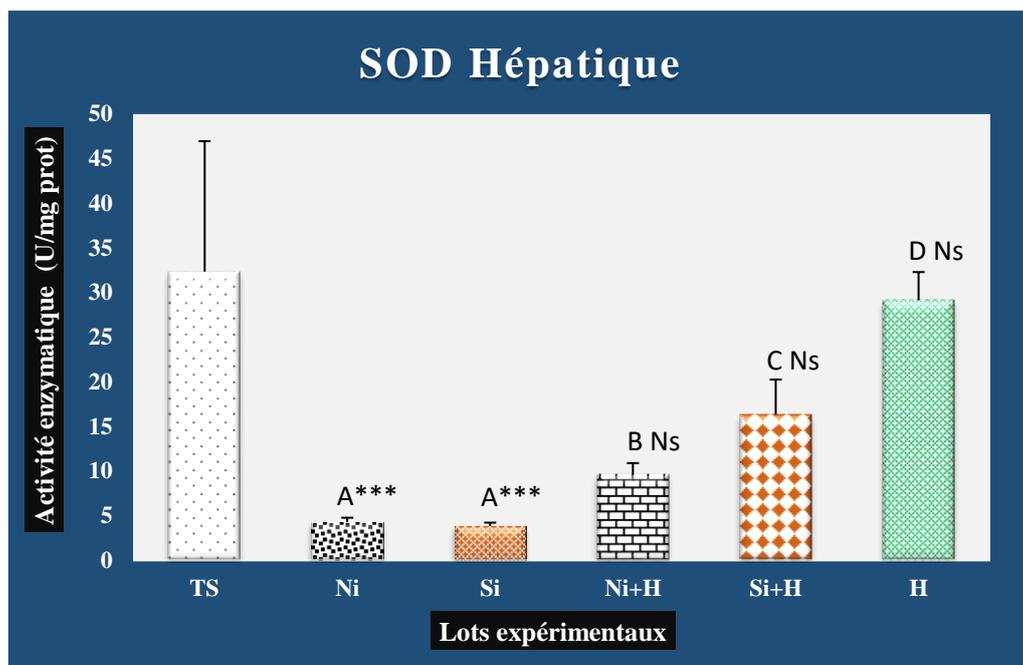
Chez les rats traités par l'huile d'oléastre uniquement, on note que l'effet est non significatif au niveau du foie, des poumons, des reins, des testicules et du cœur.

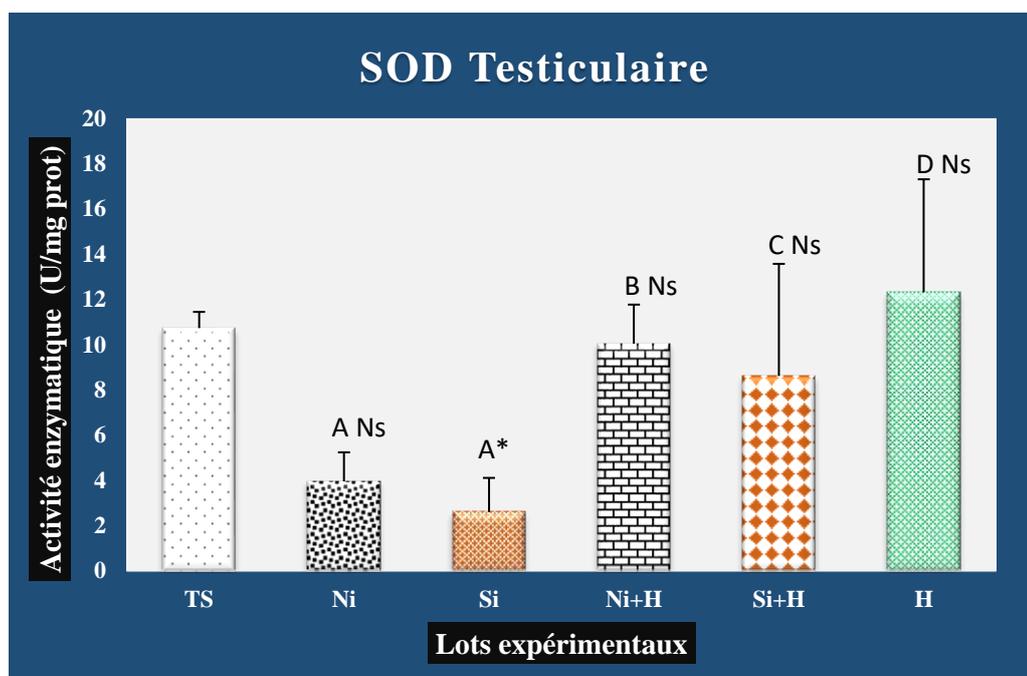
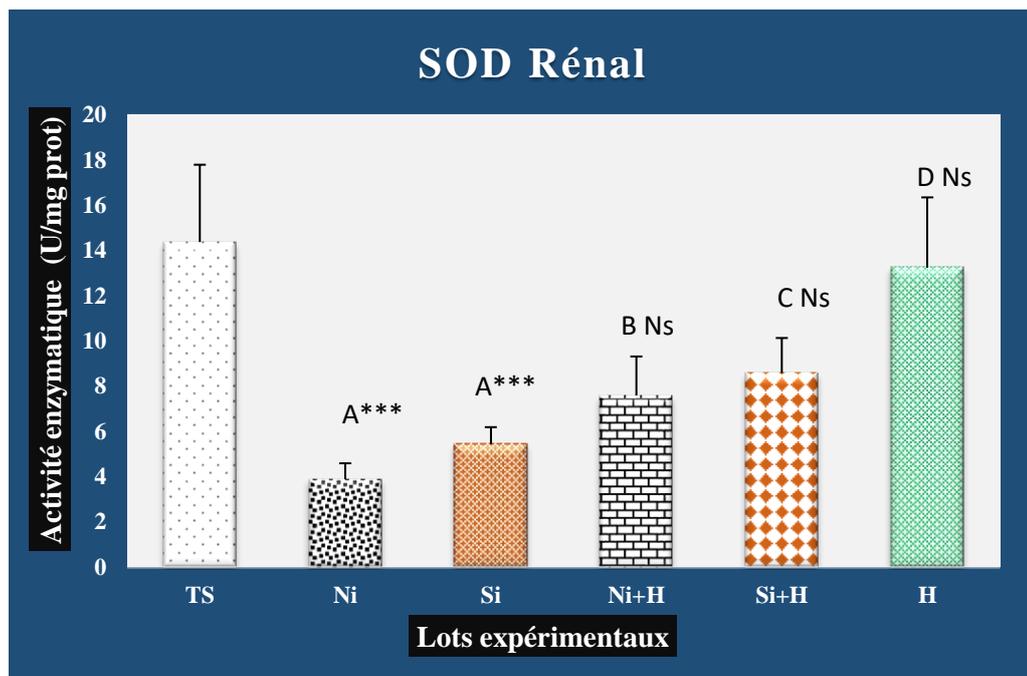
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 9 et la figure 30 suivants.

Tableau 9. Concentration de SOD hépatique, pulmonaire, rénale, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
SOD hépatique (U/mg prot)	32,336±14,60 2	A*** 4,266±0,514	A*** 3,852±0,375	B ^{Ns} 9,647 ±1,247	C ^{Ns} 16,316±3,935	D ^{Ns} 29,141±3,143
SOD pulmonaire (U/mg prot)	13,692±0,963	A** 5,631±0,591	A*** 2,168±0,208	B ^{Ns} 8,856±0,633	C* 8,951±3,314	D ^{Ns} 13,554±4,595
SOD rénal (U/mg prot)	14,373±3,420	A*** 3,882±0,712	A*** 5,437±0,754	B ^{Ns} 7,588±1,727	C ^{Ns} 8,581±1,551	D ^{Ns} 13,245±3,103
SOD testiculaire (U/mg prot)	10,729±0,717	A 3,953±1,285	A 2,599±1,508	B 10,039±1,720	C 8,612±4,957	D 12,315±4,993
SOD cardiaque (U/mg prot)	17,525±2,439	A ^{Ns} 7,125±2,962	A* 6,623±0,707	B ^{Ns} 9,851±0,414	C ^{Ns} 11,234±1,413	D ^{Ns} 13,383±4,545

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B^{Ns} : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.





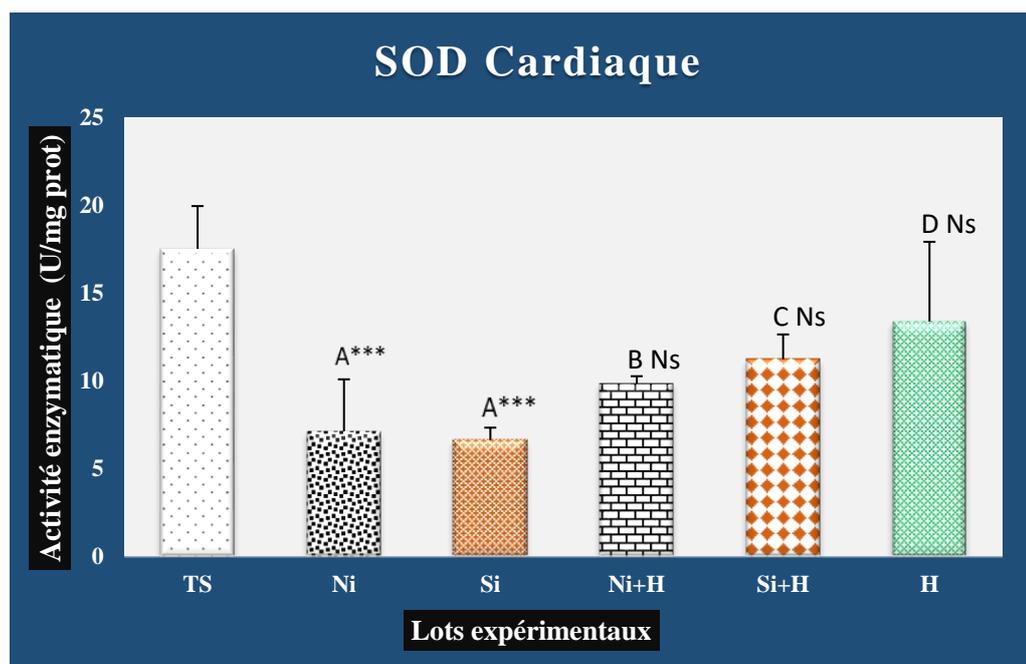


Figure 30. Concentration de SOD tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

3.4. Activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'administration des nanoparticules de (Ni) et de (SiO_2) pendant 21 jours chez les rats, induit une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) au niveau de tous les organes (foie, poumons, reins, testicules, cœur) par rapport aux rats témoins sains.

Tandis que, on n'enregistre une élévation très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie, poumons, reins et cœur et significative ($p < 0.05$) au niveau des testicules chez les rats injectés par (Ni) et traités par huile par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

En revanche, on enregistre une restauration par une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité de la (CAT) au niveau des poumons et des reins, hautement significative ($p < 0.01$) au niveau du foie, significative ($p < 0.05$) au niveau du cœur et non

significative au niveau des testicules chez les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile par rapport aux rats injectés par (SiO₂) et non traités.

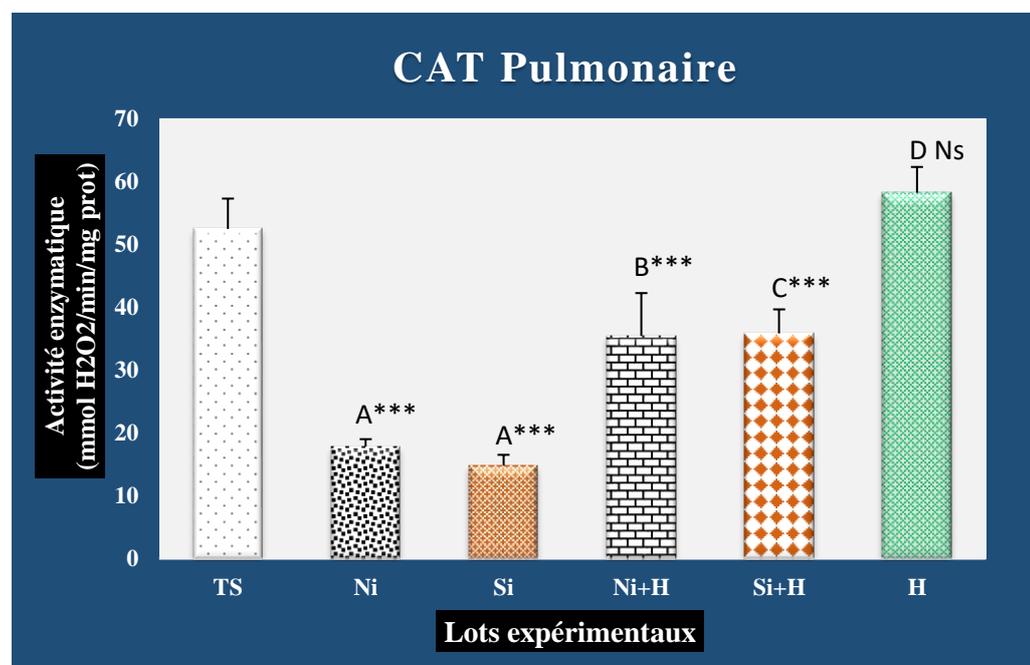
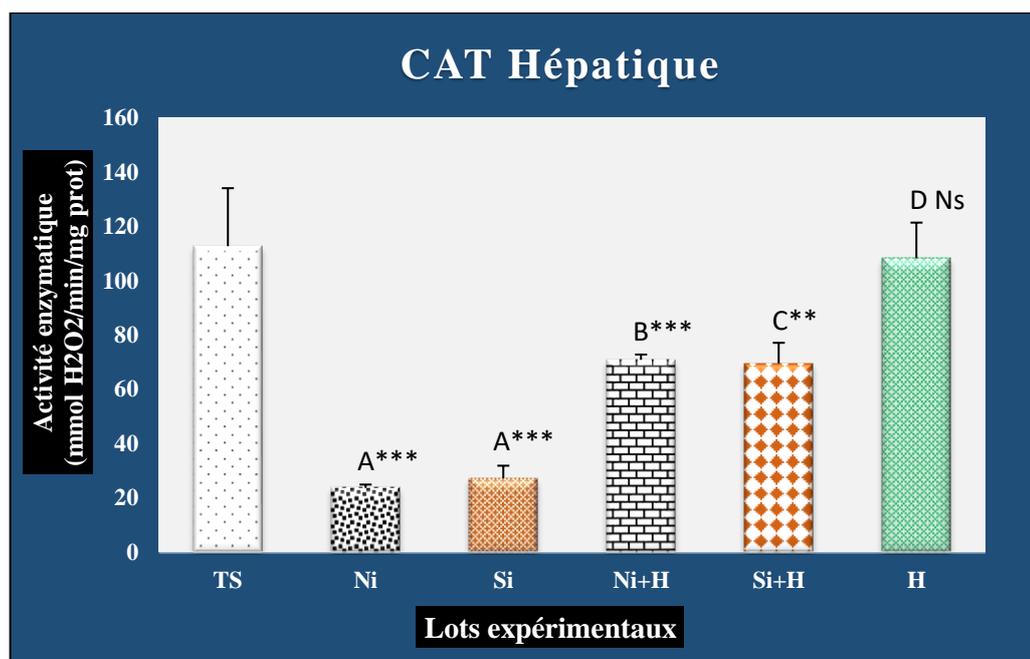
On note aussi une variation statistiquement non significative chez les rats traités par huile par rapport aux rats témoins sains au niveau de tous les organes.

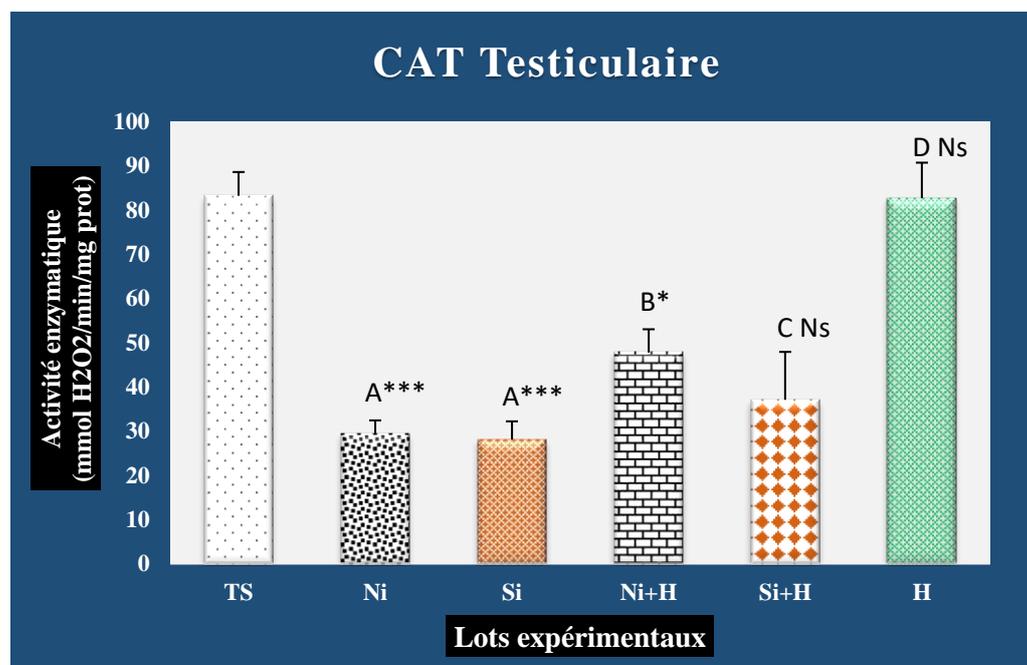
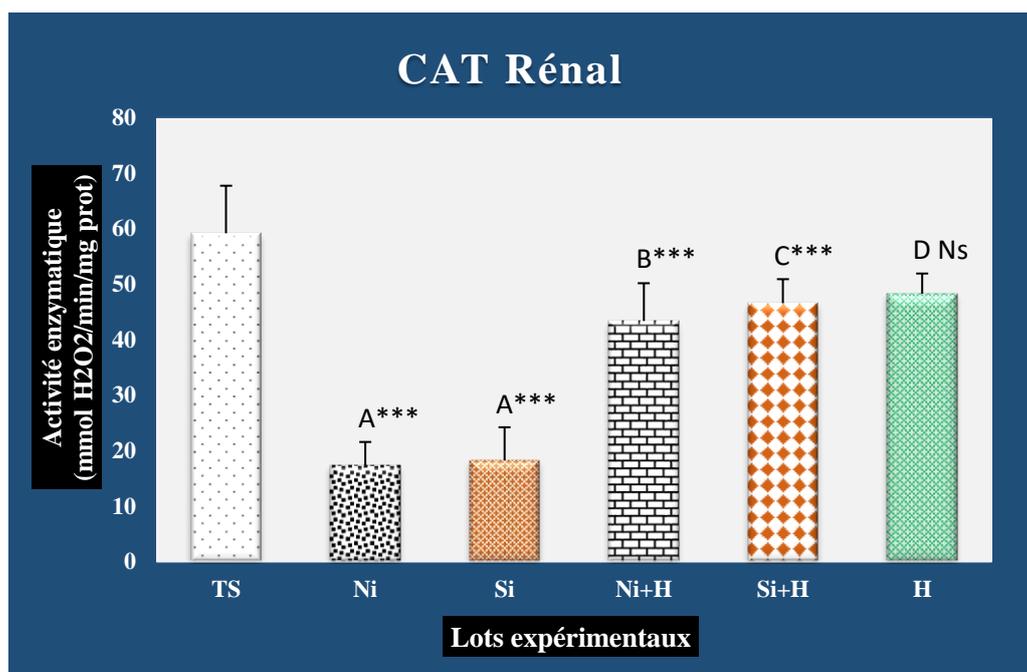
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 10 et la figure 31 suivants.

Tableau 10. Concentration de CAT hépatique, pulmonaire, rénale, testiculaire et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
CAT hépatique (U/mg prot)	112,71±21,36 8	A*** 23,666±1,255	A*** 27,224±4,65 1	B*** 70,868 ±1,945	C** 69,518±7,61 2	D ^{Ns} 108,287±13,1 12
CAT pulmonaire (U/mg prot)	52,436±4,828	A*** 17,85±1,18	A*** 14,794±1,74 6	B*** 35,418±6,825	C*** 35,836±3,81 9	D ^{Ns} 58,183±4,110
CAT rénal (U/mg prot)	59,182±8,570	A*** 17,362±4,197	A*** 18,26±5,952	B*** 43,364±6,816	C*** 46,584±4,32 3	D ^{Ns} 48,286±3,637
CAT testiculaire (U/mg prot)	83,258±5,378	A*** 29,479±2,952	A*** 28,092±4,12 5	B* 47,778±5,278	C ^{Ns} 37,09±10,84 4	D ^{Ns} 82,726±8,026
CAT cardiaque (U/mg prot)	49,254±30,32 0	A*** 14,958±4,906	A*** 32,936±5,35 2	B*** 50,316±3,751	C* 44,636±3,45 1	D ^{Ns} 45,463±4,300

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : P ≤ 0.05; A** : P ≤ 0.01, A*** : P ≤ 0.001, A Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : P ≤ 0.05; B** : P ≤ 0.01, B*** : P ≤ 0.001, B Ns : P ≥ 0.05 et C* : P ≤ 0.05; C** : P ≤ 0.01, C*** : P ≤ 0.001, C Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : P ≤ 0.05; D** : P ≤ 0.01, D*** : P ≤ 0.001, D Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains.





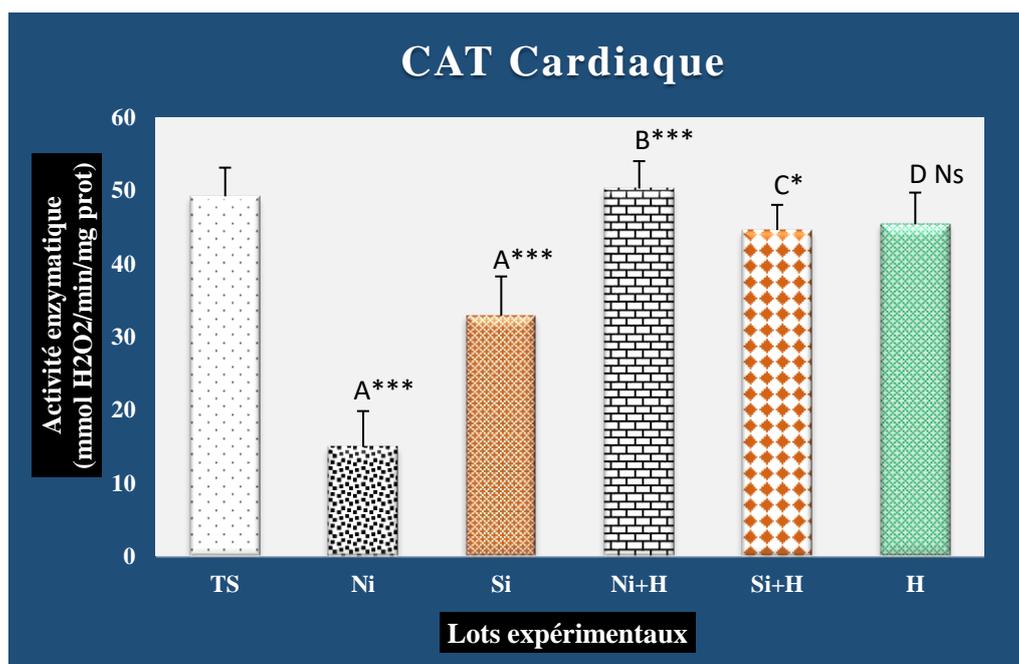


Figure 31. Concentration de CAT tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO₂), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO₂) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : P ≤ 0.05; A** : P ≤ 0.01, A*** : P ≤ 0.001, A Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : P ≤ 0.05; B** : P ≤ 0.01, B*** : P ≤ 0.001, B Ns : P ≥ 0.05 et C* : P ≤ 0.05; C** : P ≤ 0.01, C*** : P ≤ 0.001, C Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : P ≤ 0.05; D** : P ≤ 0.01, D*** : P ≤ 0.001, D Ns : P ≥ 0.05 la comparaison avec le lot des témoins sains.

3.5. Glutathion réduit (GSH)

Le dosage de Glutathion réduit (GSH) chez les rats injectés par les nanoparticules de (Ni), montre qu'il y a une diminution très hautement significative (p < 0.001) au niveau du foie et des reins, hautement significative (p < 0.01) au niveau des poumons, et non significative (p > 0,001, 0.01, 0.05) au niveau des testicules et cœur par rapport aux rats témoins sains.

D'autre côté, on note chez les rats injectés par (Ni) et traités par huile une augmentation hautement significative (p < 0.01) au niveau du foie et cœur, très hautement significative (p < 0.001) au niveau des reins et poumons et non significative (p > 0.001, 0.01, 0.05) au niveau des testicules par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

En revanche, chez les rats injectés par (SiO₂) on constate une diminution statistique hautement significative (p < 0.01) au niveau du foie, significative (p < 0.05) au niveau des

poumons, très hautement significative au niveau des reins et non significative ($p > 0.001$, 0.01, 0.05) au niveau des testicules et du cœur par rapport aux rats témoins sains.

De plus on note chez les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile, une augmentation significative ($p < 0.05$) au niveau du foie et des reins, hautement significative ($p < 0.01$) au niveau des poumons et du cœur et non significative ($p > 0.001$, 0.01, 0.05) au niveau des testicules par rapport aux rats injectés par (SiO_2) et non traités.

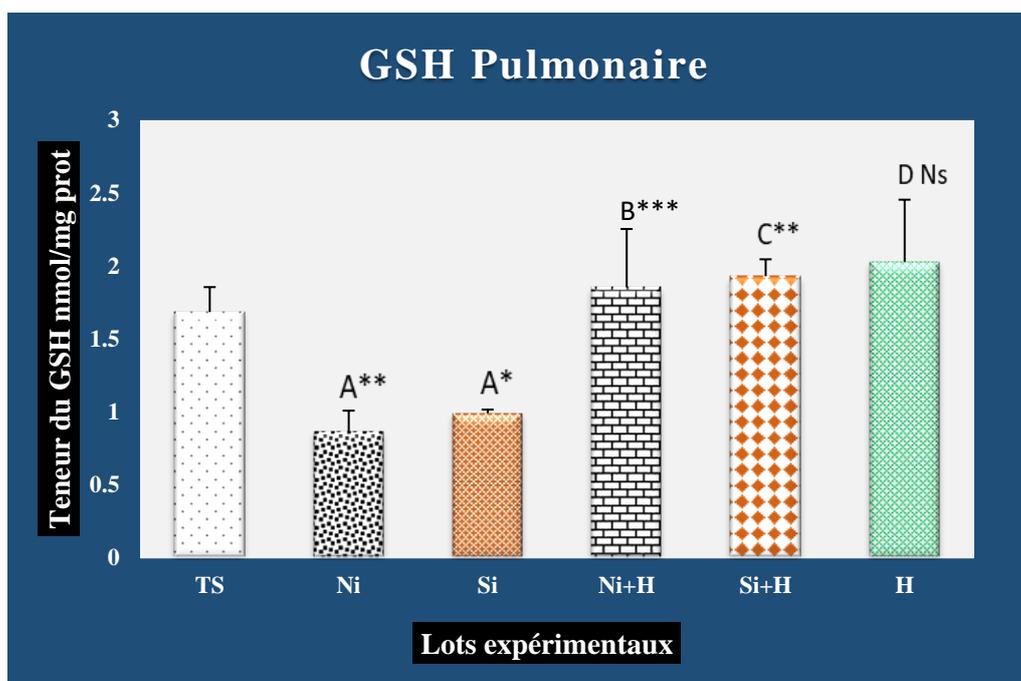
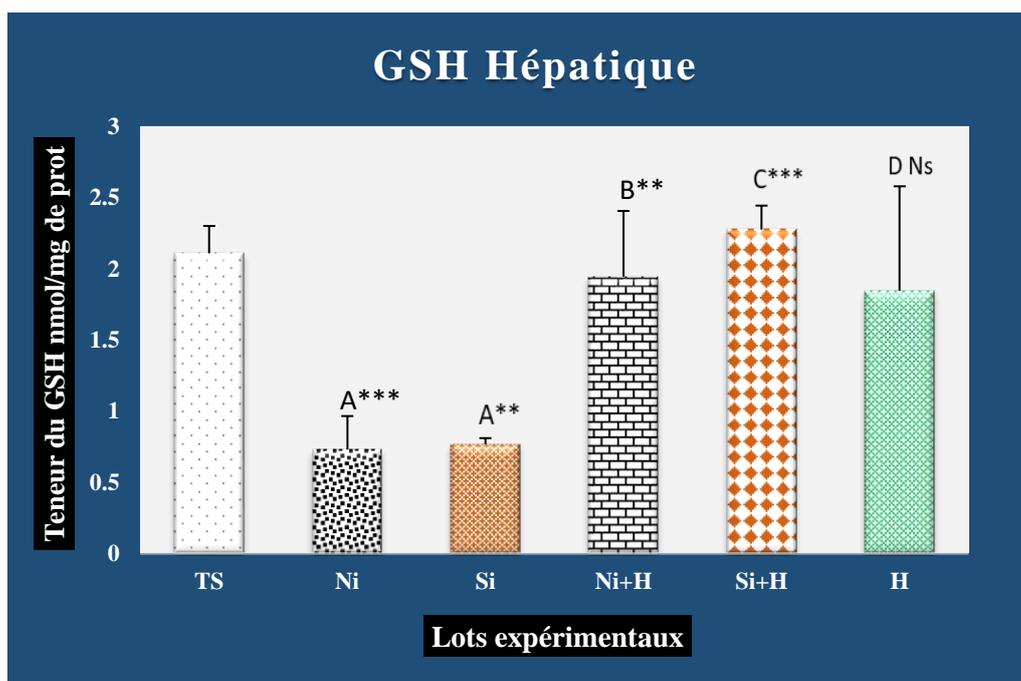
On note aussi une variation statistiquement non significative chez les rats traités par huile par rapport aux rats témoins sains au niveau de tous les organes.

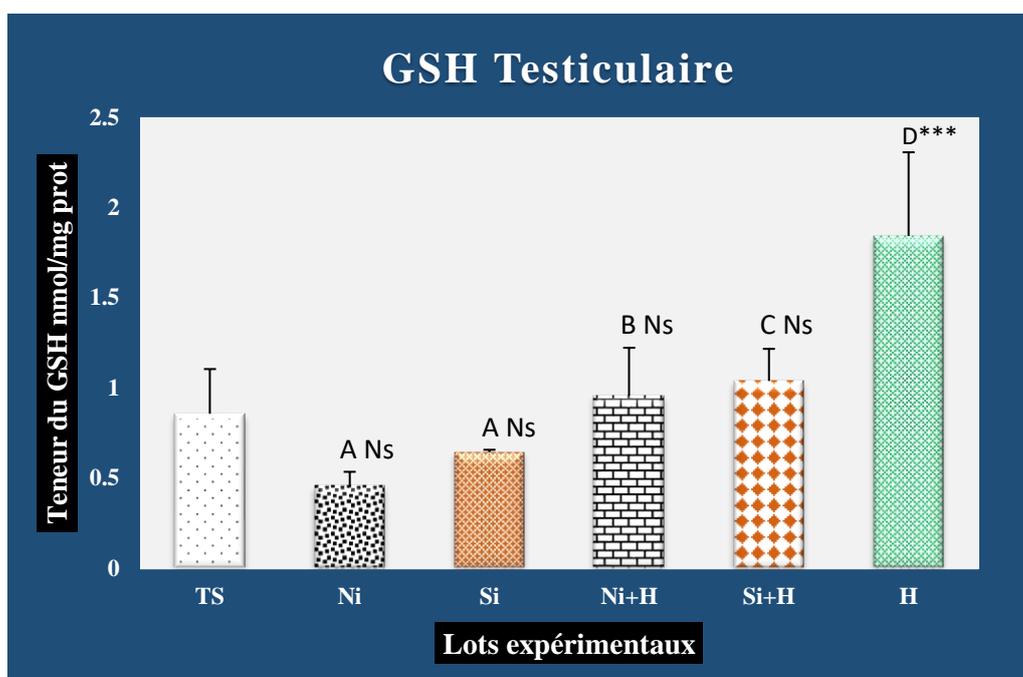
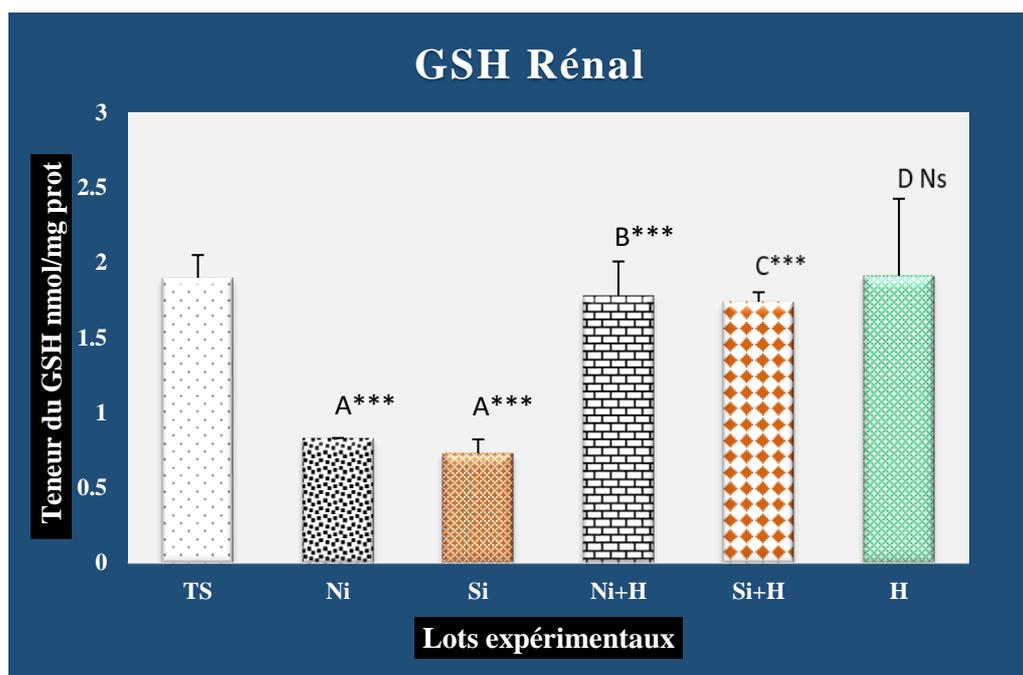
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11 et la figure 32 suivants.

Tableau 11. Concentration de GSH hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire, et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
GSH hépatique nmol/mg protéine	2,110±0,192	A*** 0,730±0,235	A** 0,768±0,042	B** 1,945 ±0,463	C*** 2,276±0,168	D ^{Ns} 1,847±0,734
GSH pulmonaire nmol/mg protéine	1,683±0,171	A** 0,858±0,148	A* 0,988±0,024	B*** 1,852±0,400	C** 1,929±0,116	D ^{Ns} 2,028±0,426
GSH rénale nmol/mg protéine	1,898±0,152	A*** 0,823±0,008	A*** 0,729±0,093	B*** 1,776±0,230	C*** 1,738±0,064	D ^{Ns} 1,912±0,512
GSH testiculaire nmol/mg protéine	0,856±0,247	A ^{Ns} 0,456±0,078	A ^{Ns} 0,643±0,013	B ^{Ns} 0,957±0,264	C ^{Ns} 1,038±0,178	D*** 1,841±0,463
GSH cardiaque nmol/mg protéine	0,843±0,042	A ^{Ns} 0,636±0,166	A ^{Ns} 0,524±0,102	B** 1,686±0,362	C** 1,602±0,284	D ^{Ns} 1,537±0,572

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm SEM$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B^{Ns} : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.





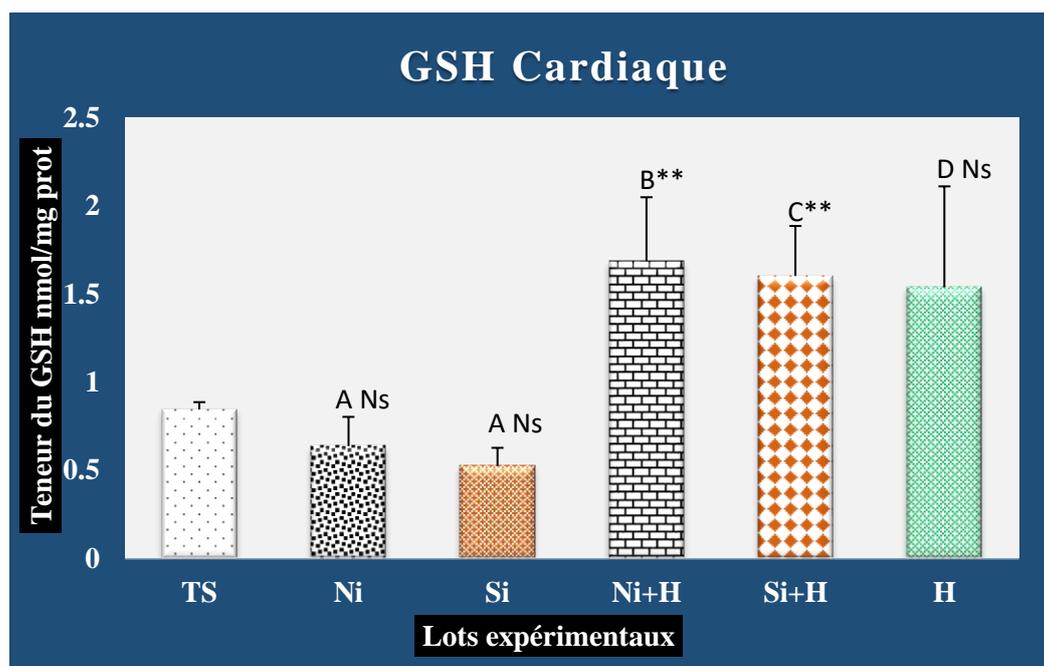


Figure 32. Concentration de GSH tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

3.6. Glutathion-s-transferase (GST)

Chez les rats injectés par (Ni), le dosage de Glutathion-s-transférase montre une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) dans tous les organes par rapport aux rats témoins sains.

De plus chez les rats injectés par (SiO_2), on note une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau du foie et cœur et hautement significative ($p < 0.01$) au niveau des reins, poumons et testicules par rapport aux rats témoins sains.

Cependant, chez les rats injectés par (Ni) et traités par huile, on note une augmentation statistique très hautement significative ($p < 0.001$) au niveau des poumons et non significative ($p > 0.001, 0.01, 0.05$) au niveau des autres organes par rapport aux rats injectés par (Ni) et non traités.

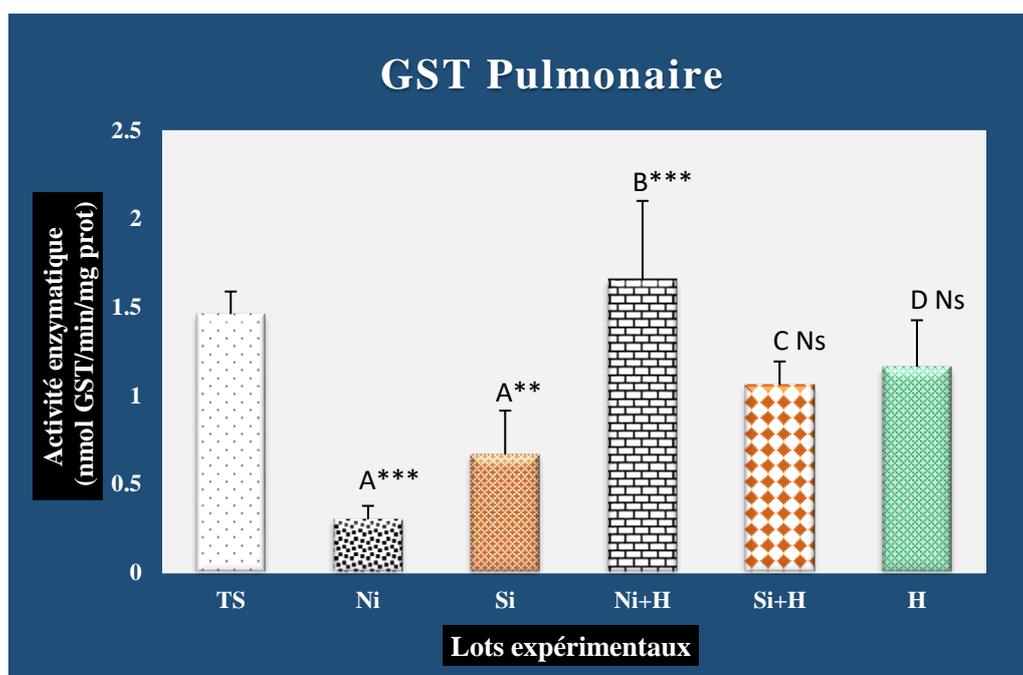
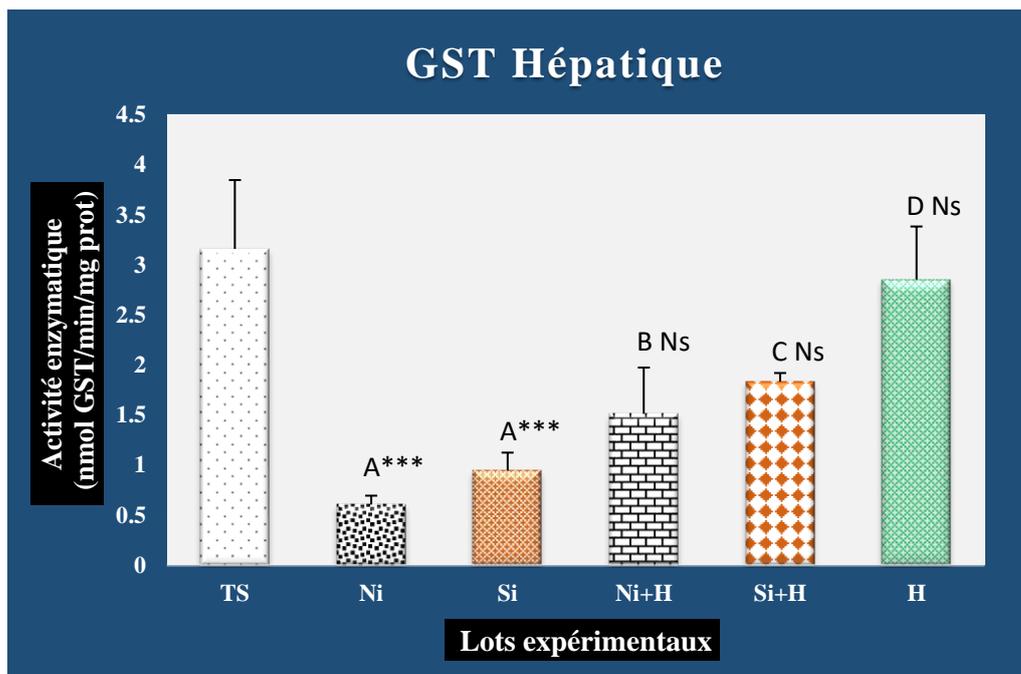
En revanche, on observe aussi que le traitement par l'huile d'oléastre augmente le taux de GST chez les rats injectés par (SiO₂) de façon non significative ($p > 0.001, 0.01, 0.05$) au niveau du foie, poumons, et cœur et de façon significative ($p < 0.05$) au niveau des reins et des testicules par rapport au rats injecté par (SiO₂) et non traités.

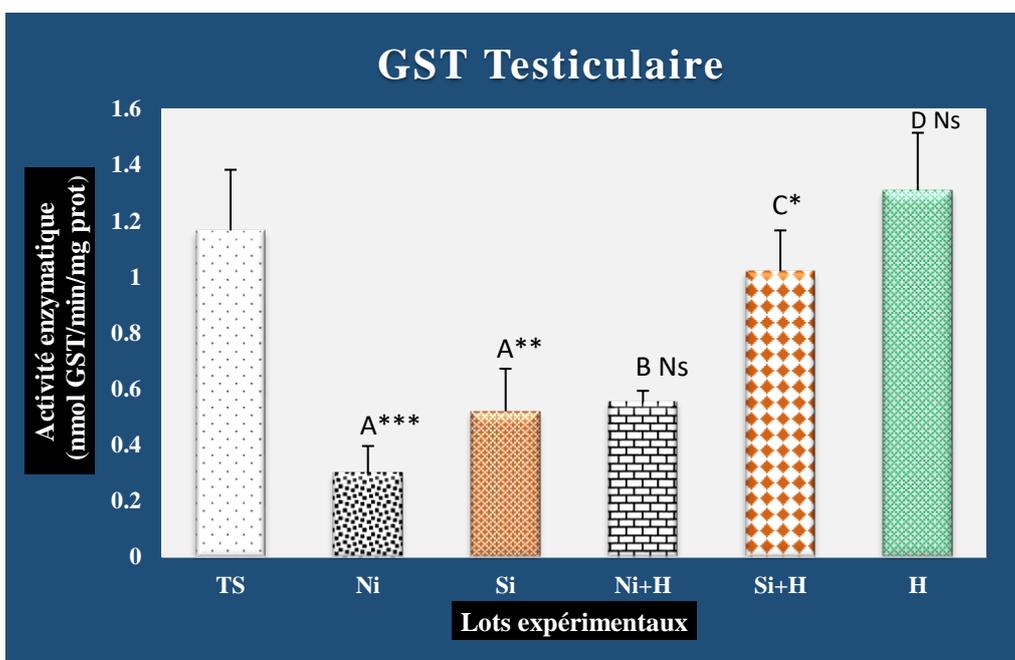
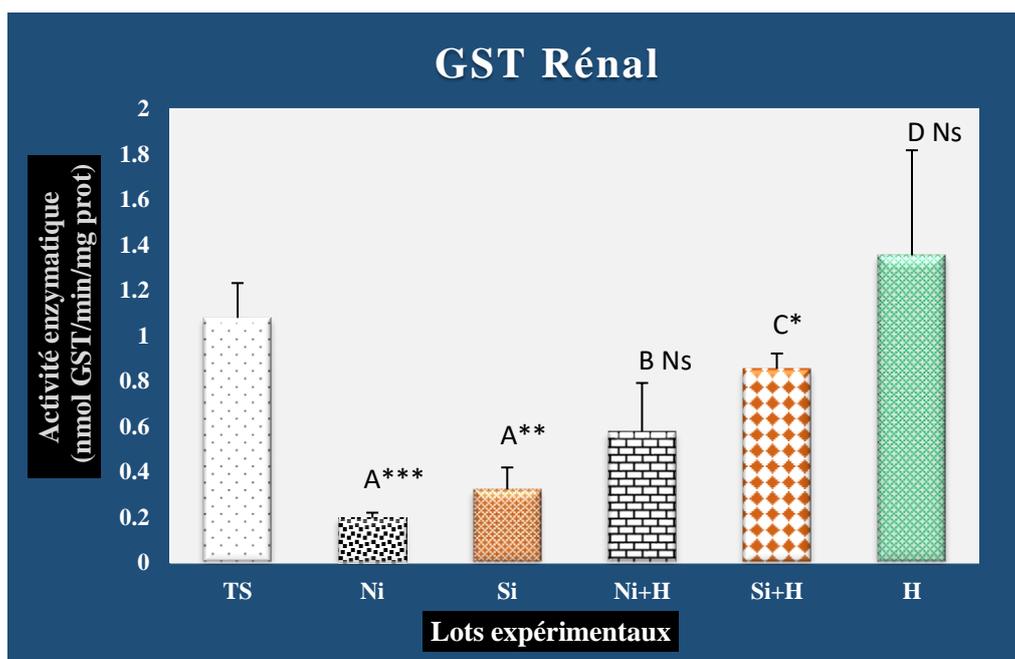
Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12 et la figure 33 suivants.

Tableau 12. Concentrations de GST hépatique, pulmonaire, rénal, testiculaire, et cardiaque chez les lots (TS), (Ni), (Si), (Ni+H), (Si+H) et (H) après 21 jours de traitement.

Groupes Expérimentaux	Témoins Sains	Injectés par Ni	Injectés par Si	Injectés par Ni et traités par H	Injectés par Si et traités par H	Traités par H
GST hépatique (nmol GST/min/mg prot)	3,16±0,688	A*** 0,606±0,0888	A*** 0,944±0,180	B ^{Ns} 1,512 ±0,462	C ^{Ns} 1,834±0,086	D ^{Ns} 2,854±0,53
GST pulmonaire (nmol GST/min/mg prot)	1,46±0,128	A*** 0,3±0,076	A** 0,668±0,246	B*** 1,656±0,444	C ^{Ns} 1,06±0,132	D ^{Ns} 1,162±0,263
GST rénal (nmol GST/min/mg prot)	1,078±0,153	A*** 0,198±0,022	A** 0,322±0,097	B ^{Ns} 0,578±0,213	C* 0,854±0,067	D ^{Ns} 1,354±0,462
GST testiculaire (nmol GST/min/mg prot)	1,166±0,216	A*** 0,3±0,096	A** 0,52±0,152	B ^{Ns} 0,554±0,039	C* 1,02±0,146	D ^{Ns} 1,31±0,205
GST cardiaque (nmol GST/min/mg prot)	1,634±0,451	A*** 0,226±0,0575	A*** 0,228±0,105	B ^{Ns} 0,722±0,118	C ^{Ns} 0,76±0,16	D ^{Ns} 1,96±0,355

Les résultats sont exprimés en : (M±SEM), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B^{Ns} : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D^{Ns} : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.





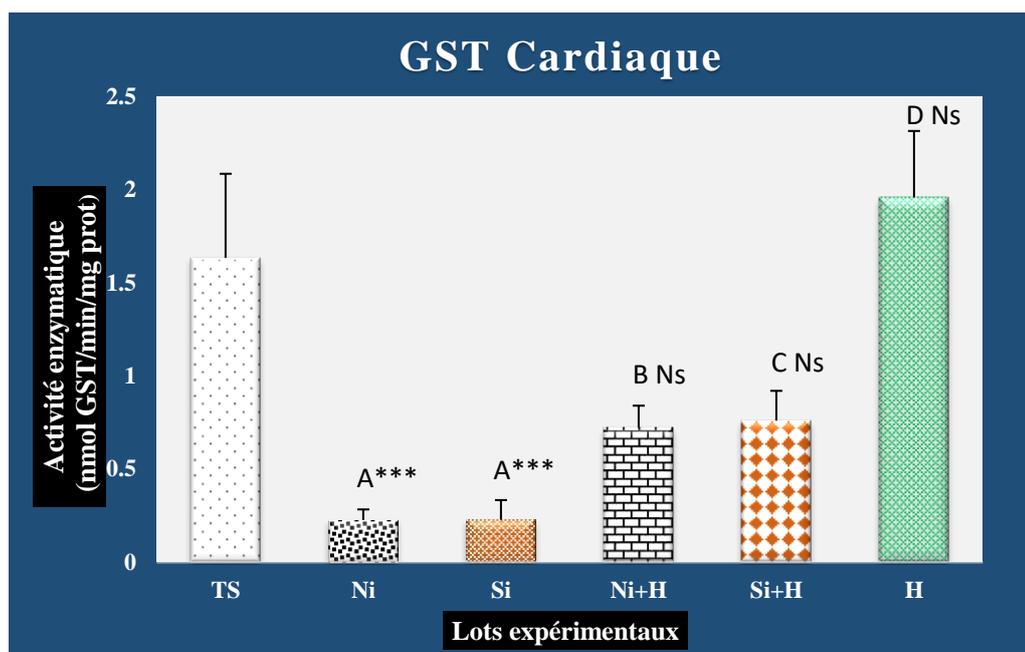


Figure 33. Concentration de GST tissulaire au niveau du foie, reins, cœur, poumons et testicules chez les rats témoins sains, les rats injectés par (Ni), les rats injectés par (SiO_2), les rats injectés par (Ni) et traités par huile, les rats injectés par (SiO_2) et traités par huile et les rats traités par huile uniquement.

Les résultats sont exprimés en : ($M \pm \text{SEM}$), A* : $P \leq 0.05$; A** : $P \leq 0.01$, A*** : $P \leq 0.001$, A Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains et B* : $P \leq 0.05$; B** : $P \leq 0.01$, B*** : $P \leq 0.001$, B Ns : $P \geq 0.05$ et C* : $P \leq 0.05$; C** : $P \leq 0.01$, C*** : $P \leq 0.001$, C Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec les lots injectés par les NPs et D* : $P \leq 0.05$; D** : $P \leq 0.01$, D*** : $P \leq 0.001$, D Ns : $P \geq 0.05$ la comparaison avec le lot des témoins sains.

4. Analyse histologique

4.1. Au niveau du foie

A la fin de l'expérimentation, l'analyse histologique au niveau du foie après coloration à l'hématoxyline-Eosine, montre que l'histoarchitecture de foie de groupe témoin sain révèle une structure histologique régulière des cellules hépatiques normales avec un cytoplasme bien conservé, un noyau et une veine centrale (Figure 34.A), aucune modification histologique n'a été observée dans le foie de groupe traité par l'huile d'oléastre (Figure 34.B) par rapport au témoin sain. En revanche, le foie de groupe injecté par les (NPs-Ni) et les (NPs- SiO_2) illustre des altérations pathologiques tels que ; la dilatation et la congestion vasculaire, infiltration de cellules inflammatoires et la souffrance des cellules hépatocytes (Figure 34.C et.D).

Par ailleurs, ces altérations histologiques ont été visiblement réduites par la supplémentation de l'huile d'oléastre chez le groupe injecté par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (Figure 34. E et F).

4.2. Au niveau du cœur

L'examen microscopique des sections colorées au H&E du cœur des rats témoins sains et des rats traités par l'huile d'oléastre a révélé une structure histologique normale du muscle cardiaque, comme le montre la figure 35 (A et B). Par contre, les rats ayant reçu les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) ont présenté une congestion vasculaire franche et une infiltration leucocytaire (Figure 35. C et D). Tandis que, ces altérations histologiques ont été visiblement réduites par la supplémentation de l'huile d'oléastre chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (Figure 35. E et F).

4.3. Au niveau des reins

Les observations microscopiques du rein d'un rat témoin sain et traité par l'huile d'oléastre seulement ont montré un parenchyme rénal normal avec des glomérules et des tubules rénaux bien définis (Figure 36. A et B). Par contre, une dilatation tubulaire, atrophie des glomérules rénaux et l'infiltration des cellules inflammatoires ont été clairement observé dans le rein injecté par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (Figure 36. C et D). Par ailleurs, ces altérations histologiques ont été visiblement réduites par la supplémentation de l'huile d'oléastre chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (Figure 36. E et F).

4.4. Au niveau des testicules

Aucune présentation histopathologique défavorable n'a été observée dans le groupe témoin sain et le groupe traité par l'huile d'oléastre (Figure 37. A et B). Cependant, la coupe histologique du tissu testiculaire a montré des tubules séminifères bordés de cellules germinales à différents stades de développement et contenant des spermatozoïdes luminaux.

Les coupes de testicules de rats ayant reçu les (NPs-Ni) ont montré la chute des cellules épithéliales du tubule séminifère brut et le désordre des cellules dans le tube (Figure 37. C). En revanche, les coupes de testicules de rats ayant reçu les (NPs-SiO₂) ont montré des changements morphologiques différents. L'injection de (NPs-SiO₂) a provoqué la dégénérescence du tissu interstitiel et un rétrécissement de l'épithélium séminifère dans les testicules. En outre, des cellules de Sertoli et des spermatogonies se sont séparées des zones basales des tubules séminifères ont été observées (Figure 37. D). Et par ailleurs, ces altérations histologiques ont

été visiblement réduites par la supplémentation de l'huile d'oléaste chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (Figure 37. E et F).

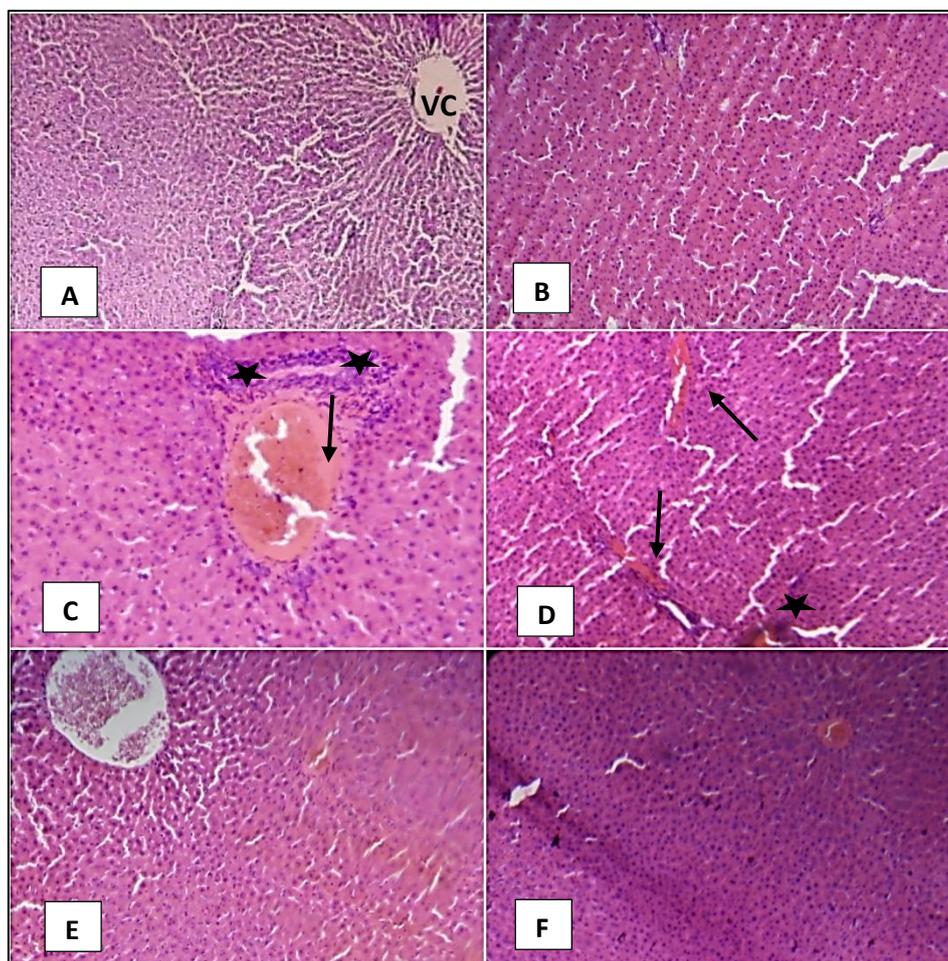


Figure 34. Coupes histologiques du foie ($\times 100$).

A : Témoin sain, **B :** Traité par Huile, **C :** Injecté par NPs-Ni, **D :** Injecté par NPs-SiO₂,

E : Injecté par NPs-Ni et traité par Huile, **F :** Injecté par NPs-SiO₂ et traité par Huile.

→ Congestion vasculaire, ★: Infiltration leucocytaire. VC : Veine centrale

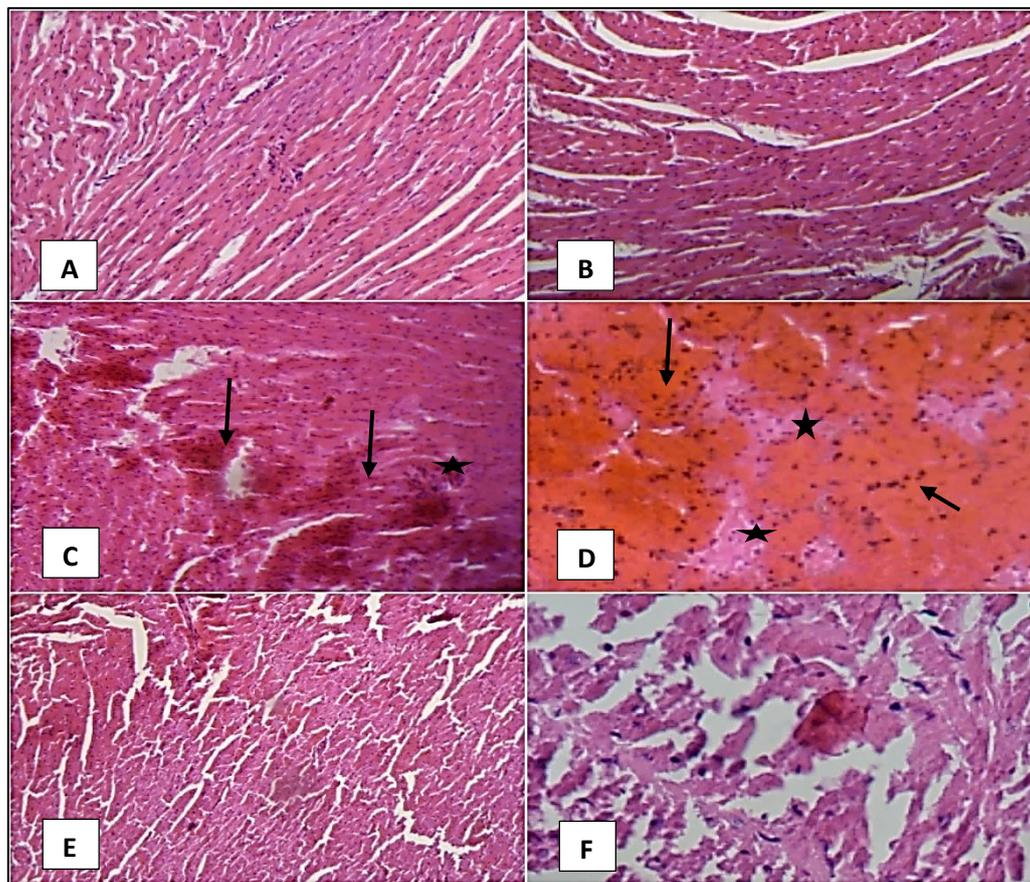


Figure 35. Coupes histologiques du cœur ($\times 100$).

A : Témoin sain, **B** : Traité par Huile, **C** : Injecté par NPs-Ni, **D** : Injecté par NPs-SiO₂,
E : Injecté par NPs-Ni et traité par Huile, **F** : Injecté par NPs-SiO₂ et traité par Huile.
→ : Congestion vasculaire, ★ : Infiltration leucocytaire.

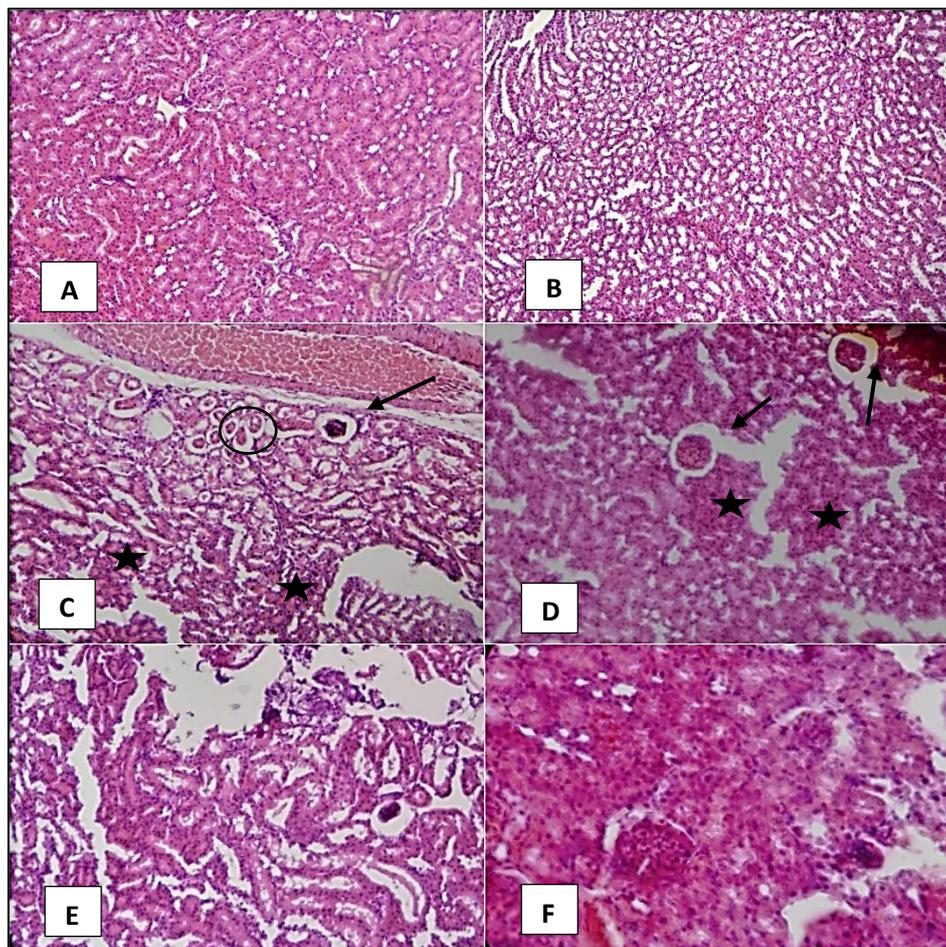


Figure 36. Coupes histologiques du rein ($\times 100$).

A : Témoin sain, **B :** Traité par Huile, **C :** Injecté par NPs-Ni, **D :** Injecté par NPs-SiO₂,

E : Injecté par NPs-Ni et traité par Huile, **F :** Injecté par NPs-SiO₂ et traité par Huile.

→ : dilatation tubulaire, ○ : atrophie glomérulaire, ★ : agrégats de cellules inflammatoires.

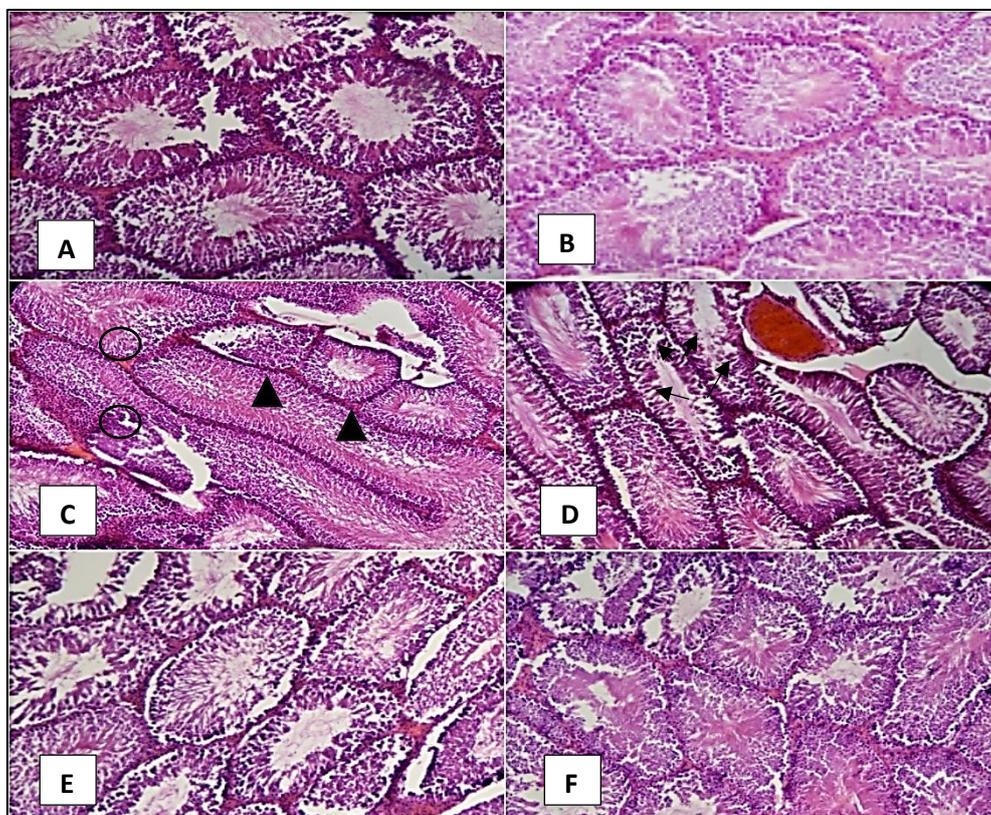


Figure 37. Coupes histologiques du testicule ($\times 100$).

- A** : Témoin sain, **B** : Traité par Huile, **C** : Injecté par NPs-Ni, **D** : Injecté par NPs-SiO₂,
E : Injecté par NPs-Ni et traité par Huile, **F** : Injecté par NPs-SiO₂ et traité par Huile.
- ▲ : Chute des cellules épithéliales du tubule séminifère.
○ : Désordre des cellules épithéliales dans le tubule séminifère.
➤ : Dégénérescence du tissu interstitiel et le rétrécissement de l'épithélium séminifère.

Discussion

1. Analyse organoleptique

Du point de vue dégustatif, notre échantillon étudié est une huile vierge de couleur jaune foncé et aspect moyen, présente une bonne saveur et leur odeur est acceptable.

Pour une huile vierge ou extra vierge les caractéristiques organoleptiques sont liées à la variété des fruits, au degré de maturité au moment de la récolte, aux facteurs écologiques, aux variations dans les opérations de récolte et de stockage des fruits et également à la variabilité des processus d'extraction et de stockage de l'huile d'olive (**Baba Hamed, 2017**).

Ce résultat de test organoleptique reste subjectif car cela nécessite un membre de jury professionnel et expérimenté dans la dégustation de l'huile d'oléastre.

2. Analyse physico-chimique

Il convient tout d'abord de déterminer les caractères organoleptiques et la composition physico-chimique de l'huile d'oléastre (indices physico-chimiques, des polyphénols, des flavonoïdes et activité anti radicalaire), obtenue de façon traditionnelle dans la région de Ain zitouna - Guelma. L'intérêt principal des analyses des indices physico-chimiques réside dans l'identification d'huile d'oléastre à travers ses propriétés physico-chimiques. La provenance géographique des échantillons notamment le facteur climatique et la méthode de préparation de l'huile peuvent avoir une légère répercussion sur certaines de ses caractéristiques physico-chimiques (**Hilali et al., 2005 ; Gharby et al., 2011**).

2.1. Les indices physiques

Le pH intervient sur le mécanisme d'oxydation des lipides. Les huiles qui présentent un pH inférieur à 4 sont des huiles acides. Le stockage à l'air libre modifie le pH. Ce paramètre permet l'élimination totale de l'eau et les produits volatiles (**CCE, 1991**).

L'indice de réfraction est également un critère important de pureté de l'huile (**Ollé, 2002**), ce paramètre varie proportionnellement à l'indice d'iode (**Chéneveau, 1917**). L'huile de l'oléastre étudiée présente une valeur de 1,470 cette valeur est proche à celle trouvée par (**Djeziri, 2012**).

L'humidité est de 0,72 %, cette valeur est supérieure à celle trouvée par (**Bouchefra et al., 2012**) ; ce résultat est assez élevé par rapport aux normes du COI (**2018**) (inférieur à 0.2) et du

CODEX (COI, 2011, CODEX, 1989) qui préconisent une absence d'eau dans les huiles d'olive vierges ; cette humidité pourrait avoir pour origine l'hydrolyse et l'oxydation des huiles. Cette valeur élevée d'humidité peut être expliquée par le fait que l'huile est additionnée d'une quantité d'eau au cours du processus d'extraction de l'huile (**Chabour,2003**) et qui n'est pas complètement éliminée lors de la séparation des phases, d'autre part, il est connu que les huiles d'olives ne subissent pas de séchage.

L'**extinction à 232 nm et 270 nm** montre une richesse en produits d'oxydation secondaires tels que : les hydroperoxydes et les cétones (**Arbi Nehdi, 2013**). D'après nos résultats concernant les absorbances spécifiques (K232, K270), les deux valeurs enregistrées s'inscrivent parfaitement dans les limites fixées par le **COI, (2018)** pour une huile d'olive extra vierge ($K232 \leq 2,5$; $K270 \leq 0,22$).

2.2. Les indices chimiques

L'**acidité** permet de contrôler le niveau de dégradation hydrolytique, enzymatique ou chimique, des chaînes d'acides gras des triglycérides (**Abaza et al., 2002**).

Notre résultat obtenu (2,42%) est assez élevé par rapport aux normes du COI et CEE (< 0,80). Cette valeur est égale à celle trouvée par Belarbi (**Belarbi et al., 2011**) (2,42%). Et supérieure à celle trouvée par Baccouri (**Baccouri et al., 2007**) sur des huiles d'oléastres issus d'autres régions et issus de l'extraction triphasique, ce qui est vraisemblablement due au temps de récolte ainsi qu'à la méthode d'extraction.

Ollé, (2002) rapporte que la présence d'eau peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse. En outre, beaucoup d'étude ont observé une augmentation de l'acidité au cours de la maturation (**Gutierrez et al., 1999 ; Rotondi et Magli, 2004 ; Baccouri et al., 2007b**).

Gutierrez et al. (1999) affirment qu'à la fin de stade de maturation, les fruits vont subir une augmentation de l'activité enzymatique (enzyme lipolytique), et elles deviennent plus sensible aux infections pathogènes et aux dommages mécaniques. **Baccouri et al. (2007b)** ont observé que l'acidité faible est due aux fruits intacts et à la transformation ou procédé rapide.

L'augmentation de l'acidité (qui est égale à l'indice d'acide divisé par 2) peut être probablement le résultat de l'activité de la lipase fongique (**Kiritsakis et Markakis, 1984**) et donc aux conditions de stockage.

Les études de **Jean-Marc et Mireille, (2003)** affirment que l'acidité oléique doit être utilisé comme une spécification de composition et non de qualité parce qu'il n'y a aucune corrélation

entre la quantité d'acides gras libres et leurs état d'oxydation. Toutefois, les acides gras libres non oxydés présentent un intérêt nutritionnel quasiment équivalent aux mêmes acides sous la forme glycéridique.

L'**indice péroxyde** est de 45 meqO₂ /Kg d'huile traduisant une forte oxydation de l'huile, valeur assez élevée aux exigences des normes commerciales COI et CEE (CEE, 2005, COI, 2011) (< 20,0) et supérieure à celle trouvée par (Baccouri et al., 2007) avec un pourcentage de 2,4 à 7,66 (mécO₂/Kg d'huile), de cinq variétés d'oléastre tunisiennes.

D'après Kiritsakis et Markakis (1988), le rancissement oxydatif est le principal facteur de détérioration des huiles d'olive pendant le stockage. Il est dû à l'oxydation des acides gras insaturés conduisant à la formation ultérieure de composés possédant un goût et une odeur désagréable.

Cette valeur élevée serait directement liée aux conditions de production : récolte, stockage et trituration. Les différences entre les échantillons récoltés dans des conditions d'extraction similaires seraient quant à elles dues à la diversité en composition des huiles.

L'**indice de saponification** étant inversement proportionnel à la longueur de la chaîne ; plus la longueur de chaîne augmente, moins sera l'indice de saponification (Harper, 1977). L'indice de saponification de l'huile étudiée est de 141,65 mg KOH/g. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par (Belarbi et al., 2011), estimé à (162,9 mg KOH/g).

L'**indice d'iode** est de 90,09 g d'iode/100g d'huile. Cette valeur conforme au **Codex Alimentarius** (Codex Alimentarius, 1989) préconisées pour les huiles d'olives vierges (75 à 94 g d'iode/100g d'huile).

Selon Gharby et al. (2011), les paramètres qui donnent une idée sur la structure des huiles (l'indice d'iode et l'indice de saponification) ne sont pas influencés ni par l'origine géographique ni par le mode d'extraction.

2.3. Les Pigments colorants

La teneur en pigments dépend de plusieurs facteurs, tels que, la variété, le degré de maturité des olives, le système utilisé pour l'extraction de l'huile ainsi que la durée et les conditions de son stockage (Rahmani M., 1989).

L'évolution de la **teneur en chlorophylles** renseigne sur les substances colorantes contenues dans l'huile et dépend de la contamination des olives par les feuilles, la teneur en chlorophylle

est de 0,3637 mg/kg. Cette valeur est inférieure à celles trouvées par **Bouarroudj et al. (2016)**, dont les valeurs oscillent entre 5,06 et 8,48 mg/kg, et à celles de **Hannachi et al. (2013)** (1,27 et 13,45 mg/kg) et supérieure à celles trouvées dans l'étude menée par **Boucheffa et al. (2014)** sur cinq oléastres Algériens (0,13-0,70 mg/kg). Selon **Boskou, (2006)** la teneur en chlorophylles est influencée par la variété, l'indice de maturation, la zone de production, le système d'extraction et les conditions de stockage.

La **teneur en caroténoïdes** est de 7,75 mg/kg. Cette valeur est supérieure à celles des oléastres étudiés par **Boucheffa et al. (2014)** (0,57 à 1,47mg/kg) et par **Baccouri et al., (2008)** (1 à 4,18 mg/kg).

Selon **Lazzez et al., (2006)**, les carotènes sont des substances chimiques naturelles impliquées dans les mécanismes d'oxydation de l'huile, leur présence en quantité suffisante dans l'huile permet de retarder le phénomène de la photo oxydation et de préserver les paramètres de qualité de l'huile au cours du stockage.

2.4. Dosage des composés phénoliques

2.4.1. Teneur en polyphénols

Les polyphénols sont reconnus comme composés antioxydants, leur présence dans l'huile d'olive est liée à leurs propriétés générales, amélioration de la stabilité, valeur nutritionnelle et propriétés sensoriels (**Servili et al., 2004**).

Selon la classification proposée par **Montedoro et al. (1992)** permettant de répartir les variétés en fonction de la teneur en composés phénoliques, notre huile d'oléastre se situerait dans la catégorie des variétés à teneur moyenne en polyphénols (inférieur à 500 mg EAG/kg).

L'huile d'oléastre étudiée montre une teneur de 314 mg EAG/kg en composés phénoliques supérieure à ceux étudiés par **Hannachi et al. (2013)** (59,58 mg EAG/kg), et supérieure aussi aux échantillons étudiés par **Bouarroudj et al. (2016)** avec des valeurs allant de 135,09 à 202 mg EAG/kg et inférieure à celle rapportée par (**Belarbi et al., 2011**) sur un échantillon de la région de Tlemcen avec un taux de 420 mg EAG/Kg.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en polyphénols : variété de l'olive, degré de maturité, qualité du sol ainsi que le procédés d'extraction utilisé et les conditions de conservation des huiles (**Ollivier et al., 2004**).

En considérant les facteurs précédents (climat, procédés d'extraction et conservation) ainsi que l'indice de maturité, seul le facteur variétal permet d'émettre l'hypothèse que les oléastres sont plus riches en polyphénols que les oliviers cultivés. En effet, l'étude menée par **Dabbou et al. (2011)** montre que l'huile d'oléastre étudiée semble intéressante en termes de composés mineurs (polyphénols et composés volatils). La richesse en composés phénoliques des huiles d'oléastres est explicable par sa résistance avérée aux conditions critiques comme le stress hydrique (**Durand et Terral, 2005**). En effet, le taux de composés phénoliques est plus élevé dans les huiles provenant de cultures soumises à la sécheresse que celles des cultures irriguées (**Tovar et al., 2001**). L'activité des enzymes responsables pour la synthèse de composés phénoliques, tels que la L-phénylalanine ammoniac-lyase, diffère selon les conditions de l'eau (**Morelló et al., 2005**), de plus, l'étude menée par **Baccouri et al. (2008)** sur les huiles d'oléastre montre que le facteur génétique influence la composition en phénols.

La richesse en composés phénoliques des oléastres constituerait donc un critère de qualité.

2.4.2. Teneur en flavonoïdes

D'après plusieurs auteurs, les flavonoïdes sont présents en petites quantités dans les huiles vierges (**Servili et al., 2004 ; Oliveras-Lopez et al., 2007**).

Le dosage des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium a révélé (46,95 mg EQ/kg huile).

Ces métabolites secondaires ont la capacité de piéger les radicaux libres, d'interrompre la réaction catalytique de peroxydation des lipides (**Angerosa et al., 1999**), et d'inhiber l'oxydation des LDL (**Fito et al., 2000**). Ces composés, comme les autres constituants mineurs de l'huile, contribuent aux propriétés organoleptiques sensorielles et à la prévention de l'auto oxydation d'huile (**Esti et al., 2009**).

❖ Les teneurs en **polyphénols totaux** et en **flavonoïdes** varient qualitativement et quantitativement d'une huile à une autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs : Facteurs climatiques et environnementaux ...etc. (**Ebrahimi et al., 2008**) ; Le patrimoine génétique (**Miliauskas et al., 2004**) ; la période de la récolte (**Miliauskas et al., 2004**) ; le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**) et la méthode d'extraction (**Lee et al., 2003**). La méthode de quantification peut également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes (**Lee et al., 2003**).

2.4.3. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le résultat de l'activité antioxydante de l'huile d'oléastre vis-à-vis le radical DPPH montre un pouvoir d'inhibition important (63,923%) mais il reste un pouvoir inférieur à celui de l'acide ascorbique (81,356%). Cette activité importante est expliquée par la richesse de cette huile en métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes). Qui sont considérés comme des antioxydants. L'action de ces antioxydants est reposée principalement sur les propriétés redox de leurs groupes hydroxyles et la relation structurelle entre les différents groupes fonctionnels dans leur structure qui leur permet de servir activement de agents piègeurs des radicaux, agents réducteurs, désactiveurs d'oxygène singlet, chélateurs de métaux et donneurs d'hydrogène (Barreca *et al.*, 2011 ; Penyarigan *et al.*, 2016).

3. Analyse des paramètres biochimiques et tissulaires

Le but principal de notre travail est basé sur l'évaluation de l'empoisonnement par les nanoparticules de nickel et de silice sur modèle animal (rats Wistar) ainsi que l'estimation de l'effet protecteur de l'huile d'oléastre.

3.1. Effet des nanoparticules de nickel et de silice sur la variation des paramètres biochimiques

Partant du principe que tout type de contraintes environnementales (stress chimiques, stress hydrique, thermique, oxydant, exposition à une pollution), provoque une libération de radicaux libres dans l'organisme, une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Halliwell et Chirico, 1993).

3.1.1. Effet sur le profil lipidique

Le résultat de l'effet du (NP-Ni) sur le profil lipidique a provoqué des perturbations des métabolismes lipidiques traduisant par une augmentation significative du cholestérol, du triglycéride et du HDL. Nos résultats sont en accord à ceux de (Hfaiedh *et al.*, 2008).

Cartana et Arola, 1992, ont rapporté une augmentation similaire des acides gras libres après l'administration du nickel ou silice, ce qui est accompagné par une forte action lipolytique de lipase en présence du glucagon (Schade et Eaton, 1977). Cette augmentation peut être expliquée par que les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) peuvent conduire à la mort cellulaire par

apoptose de certaines lignées cellulaires, due à l'accumulation de dérivés lipidiques toxiques comme les céramides (**Rudolf & Cervinka, 2010 ; Wang et al., 2012**).

Après 21 jours de traitement par l'huile d'oléastre aux rats injectés par (NPs-Ni) et par les (NPs-SiO₂), on a noté un taux de profile lipidique plus faible comparé aux groupes non traités. Ces résultats concordent avec ceux de (**Belarbi et al., 2011**) qui ont montré que la consommation d'huile d'oléastre a diminué significativement le cholestérol total. Cet effet hypocholestérolémiant a été aussi obtenu sur des rats Wistar, avec une variété cultivée (**Bouchebra et al., 2012**). Cette baisse du cholestérol total pourrait être due à l'acide oléique et linoléique contenus dans l'huile d'oléastre connus pour leur effet hypocholestérolémiant (**Kirsty et al., 2000**).

3.1.2. Effet sur la fonction hépatique

Le foie, principale organe de détoxification, est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques environnementaux à savoir le nickel ou silice, le foie présente un grand risque de dommage (**Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011**). Des études antérieures, réalisées sur des rats adultes, ont montré que le (Ni) ou (SiO₂) peut induire l'endommagement du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT). Le dysfonctionnement hépatique est suivi par des niveaux élevés de l'activité enzymatique des (ASAT), qui sont des bio marqueurs de la fonction hépatique, indiquant la perméabilité et la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane hépatique (**Ahmed et al., 1999**). Elle se correspond avec nos résultats, qui ont montré des activités augmentées d'AST dans le sérum des rats injectés par les (NPs-Ni) et par les (NPs-SiO₂). Cette augmentation a suggéré des dommages hépatiques induits par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) à travers la production des radicaux libres qu'ont la capacité de causer des dégâts hépatiques conduisant à des infiltrations et par conséquent la libération des enzymes hépatiques (**Pari et Prasath, 2008**).

Les phosphatases sont des enzymes critiques dans le système biologique, responsables du métabolisme, de la détoxification, et de la biosynthèse des macromolécules énergiques pour les différentes fonctions physiologiques. L'interférence avec ces enzymes mène aux perturbations biochimiques, aux lésions tissulaires et la perte de fonction cellulaire.

La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate en plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire.

Nos résultats montrent aussi une diminution de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans le sérum des rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂). **Rahman et al., (2000)** ont proposé que la diminution des activités de la PAL dans les différents tissus puisse être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ou à la nécrose cellulaire, montrant l'état d'un stress oxydant dans l'animal traité. En outre, ils ont rapporté que l'augmentation de leurs activités dans le sérum peut être due à la nécrose des tissus mous.

3.1.3. Effet sur la fonction rénale

Le rein est particulièrement sensible à l'action des toxiques en raison de son intense activité métabolique et de ses multiples fonctions notamment celles d'excrétion et de concentration des xénobiotiques. L'étude de la fonction rénale a montré que la nanoparticule de nickel ou de silice a entraîné une augmentation des taux sériques de l'urée et de la créatinine, ce qui témoigne de l'installation d'une insuffisance rénale transitoire, avec baisse de la filtration glomérulaire. Cette insuffisance rénale a été rapportée par des travaux antérieurs réalisés par **(Stengel, 1996 ; Smaoui et ses collaborateurs, 2000)** qui ont démontré que l'intoxication par de nombreux métaux lourds induit un dysfonctionnement tubulaire ou une néphropathie tubulo-interstitielle, qui évolue vers une insuffisance rénale.

Sur le plan clinique, la néphropathie tubulo-interstitielle chronique est diagnostiquée par l'augmentation de l'urée et/ou de la créatinine sanguines, avec protéinurie assez faible **(Courrèges et al., 1998)**. Cette augmentation peut être expliquée par le catabolisme des composés protéiques de corps sous l'action des hormones glucocorticoïdes, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et créatinine **(Pari et Amudha, 2011)**.

3.2. Effet des nanoparticules de nickel et de silice sur la variation des paramètres du stress oxydatif

3.2.1. MDA

Selon **Draper et al. (1988)** et **Valko et al. (2005)**, le MDA est l'aldéhyde le plus abondant résultant de la peroxydation lipidique. Cet aldéhyde peut être considéré comme un indicateur important de la peroxydation lipidique **(Favier, 1997 ; Bonnefont-Rousselot et al., 2003)**.

Nos résultats ont montré une augmentation significative des niveaux du MDA dans le tissu rénal, cardiaque, pulmonaire, testiculaire et hépatique après exposition de (NPs-Ni). Nos résultats confirment ceux de **Cemek et al., (2010)** et **Xiel et al., (1995)** qui ont trouvé que le nickel contribue à la peroxydation lipidique dans les reins et à l'altération du statut antioxydant.

Cette altération est accompagnée d'une augmentation de la peroxydation lipidique. Ce qui est expliqué par des effets néfastes de l'action du nickel dans le corps et l'induction de la formation d'espèces réactives de l'oxygène et l'augmentation de la peroxydation des lipides dans les cellules.

Il a été démontré que le malondialdéhyde provoque la réticulation et la polymérisation des composants de la membrane et peut contribuer aux effets mutagènes, génotoxiques qui sont provoqués par l'altération des mécanismes de défense antioxydant y compris la détoxification et les enzymes de balayage, ou bien par l'augmentation de la peroxydation lipidique suite à l'interaction entre les Espèces Réactives à l'Oxygène (ERO) et les membranes cellulaires (**Attig et al., 2010 ; Misra et al., 1990**).

On a constaté une augmentation significative de la concentration du MDA dans le foie, le cœur et les reins chez le groupe des rats injectés par les (NPs-SiO₂) par rapport aux rats témoins sains, l'augmentation du taux de MDA est le résultat de l'augmentation des ERO qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoquent la peroxydation lipidique (**Battacharya et al., 1997**). L'augmentation des ERO pourrait être due, soit à l'augmentation de leur production, soit à la réduction de leur élimination suite à l'épuisement des systèmes antioxydants piègeurs tel que rapportent (**Cho et al., 2002**).

D'autre part, on a constaté une diminution du taux de MDA après le traitement par l'huile d'oléastre chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) (**Yin et al., 2013**). Ces résultats suggèrent que l'huile d'oléastre induit un effet antioxydant, qui peut être due à la richesse de cette huile en composés bioactifs et en antioxydants qui inhibent l'oxydation des lipides et les altérations causées par la production excessive de radicaux libres. Une étude menée par (**Bouarroudj et al., 2016**) montre que cette huile est très riche en vitamine E, en vitamine C et en polyphénols qui constituent une famille importante d'antioxydants parmi ces polyphénols on trouve les flavonoïdes, terpenoïdes, saponosides, tannins et alcaloïdes. Globalement, ce sont des excellents piègeurs des ERO (**Suzuki et al., 2011**).

3.2.2. Activité enzymatique de la catalase (CAT)

La catalase (CAT) représente la deuxième étape du système de défense enzymatique. Elle prend en charge le peroxyde d'hydrogène précédemment produit par les SODs et le métabolisme en eau (**Chakrabarti, 1982**). Il joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant (**Cakmak et Horst, 1991**). Elle consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire (O₂).

D'après nos résultats on observe une diminution hautement significative de l'activité de CAT dans les reins, les poumons, le foie, les testicules et le cœur chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) comparativement aux rats témoins sains. Cette diminution est concomitante à la surproduction du O₂•- et d'H₂O₂ ce qui peut être l'origine de l'oxydation des composants cellulaires majeurs comme les lipides, les protéines et l'ADN causant leurs inactivations et leurs dégradations ultérieures (Das *et al.*, 2001). Ce résultat suggère que la (NP-Ni) induit indirectement une augmentation de H₂O₂, donc elle a causé un cas de stress oxydatif. En effet, la diminution des activités de la CAT provoque une augmentation de H₂O₂. Ceci est en accord avec des études antérieures, réalisées sur des rats intoxiqués en présence de NPs (Li *et al.*, 2012 ; Niska *et al.*, 2015). D'autre part, les résultats ont montré que le traitement par l'huile d'oléastre augmente l'activité de la catalase.

3.2.3. Protéines

Nos résultats ont montré une diminution importante des protéines totales chez les rats injectés par les nanoparticules de nickel et de silice. Cette réduction est expliquée par le fait que la plupart des protéines possèdent des groupements (SH, OH), ces dernières réagissent très facilement avec les (NPs-Ni) et les radicaux libres générés par ce métalloïde et par conséquent ces protéines peuvent se dénaturer et se fragmenter, ou perdre leurs structures primaires et secondaires (Käkelä *et al.*, 1999 ; Harris *et al.*, 2011). La liaison de ces nanoparticules avec certaines protéines de la chromatine dans les cellules somatiques peut entraîner des dommages oxydatifs et structurale importantes (Costa *et al.*, 1994; Kasprzak, 2003). De plus l'exposition des rats au stress environnemental peut modifier le métabolisme des protéines et des acides aminés et leurs synthèses au niveau du foie (Stinson *et al.*, 1992). La diminution des taux des protéines après l'injection des nanoparticules de nickel et de silice peut être également due à une diminution de la consommation alimentaire d'apport protéique (Pari and Amudha, 2011). D'autre part, les résultats ont montré que le traitement par l'huile d'oléastre a induit une augmentation de l'activité des protéines chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂). Cela due à la présence des composés bioactifs dans cette huile qui sont des excellents piègeurs des radicaux libres (Suzuki *et al.*, 2011).

3.2.4. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales. C'est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets

toxiques des composés endogènes et exogènes, compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds (Dickinson et Forman, 2002).

Le GSH joue un rôle clé dans la détoxification des radicaux libres et des métaux lourds (Hultberg *et al.*, 2001). Dans ce cas, la nanoparticule de nickel se lie exclusivement au pôle (SH) du GSH chargé à son inactivation, ce qui favorise la peroxydation lipidique et l'apparition des radicaux libres, qui augmente la susceptibilité des lésions tissulaires importantes dans les différents tissus (Pari et Prasath, 2008 ; El-Demerdash *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent que les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) provoquent une diminution significative de taux de GSH dans les organes étudiés (foie, poumon, rein, testicule et cœur).

Plusieurs autres études qui ont été réalisées sur ces nanoparticules ont noté une diminution de ce paramètre dans les cellules du foie et du rein des rats males « *in vivo* » (Azouz et Korany, 2021).

Nos résultats sont similaires à une étude antérieure qu'a montré que l'intoxication par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) induit un stress oxydatif accompagné par une diminution au niveau de systèmes de défense antioxydants GSH et GST au niveau rénal. En effet, Djemli et Kechrid (2013) et Mahmoud (2012) ont montré une réduction des niveaux de GSH dans le cas de la toxicité induite par les (NPs-Ni). Les (NPs-Ni) inhibent la glutathion synthétase, et la glutathion réductase (James *et al.*, 2006), donc peu de GSH est produit. Tous ces facteurs conduisent à une forte diminution du glutathion réduit (GSH) et une augmentation du glutathion oxydé (GSSG) et par conséquent une diminution de l'activité des enzymes GSH-dépendantes.

D'autre part, les résultats ont montré que le traitement par l'huile d'oléastre provoque une augmentation significative de la teneur en glutathion due à l'élévation efficace de l'activité du système antioxydant contre le stress oxydant.

3.2.5. Glutathion s-transférase (GST)

Concernant la glutathion S-transférase (GST), enzyme catalysant la conjugaison du glutathion (possède un groupement nucléophile -SH) à une grande variété de composés (porteurs de groupements électrophiles) et également impliquée dans le transport et l'élimination de composés réactifs qui effectuent d'autres fonctions antioxydants, l'activité de la GST a également été largement utilisé comme un biomarqueur de stress (Fitzpatrick *et al.*, 1997). Cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et elle a une grande capacité à réduire les peroxydes lipidiques (Griffith, 1999 ; Iscanetal, 2002) et/ou

dans la protection contre des métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Hayes et Pulford, 1995**).

Nos résultats montrent une diminution de l'activité GST, cela s'explique par l'importance de la GST dans la catalyse de la conjugaison des substrats électrophiles pour réduire le glutathion afin de protéger la cellule des effets des xénobiotiques (**Ferrari et al., 2007**). Nos résultats sont en accord avec ceux de (**Passagne et al., 2012**) qui ont travaillé sur des cellules rénales et (**Munteanu et al., 2010**) qui ont travaillé sur les cellules MRC-5. Ces auteurs ont suggéré que ces cellules pourraient affronter le stress oxydatif induit par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂).

3.2.6. Activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

Nos résultats montrent une diminution claire de l'activité de cette enzyme dans le foie, les poumons, les testicules le cœur et les reins chez les rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂). En comparant aux rats témoins sains, la diminution de l'activité de SOD, le chef de file des défenses antioxydants au niveau cellulaire est due à la conversion de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène qui est un élément toxique.

Après le traitement par l'huile d'oléastre aux rats injectés par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂), on observe une augmentation significative du taux de SOD, cette augmentation est due à la présence des composés phénoliques qui renforcent le système de défense antioxydant en diminuant le degré de toxicité des NPs.

4. Analyse histologique

4.1. Au niveau du foie

Plusieurs recherches ont suggéré que le foie pourrait être le principal organe cible des nanomatériaux et que ces matériaux à l'échelle nanométrique peuvent être hépatotoxiques lorsqu'ils entrent directement dans la circulation sanguine (**Liu et al., 2012**).

Les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) sont introduites dans le sang et atteignent les organes cibles où induisent une congestion vasculaire puis une apoptose des cellules, cela due à des changements dans divers biomarqueurs biochimiques qui augmentent la pression cellulaire en raison d'un déséquilibre électrolytique et provoquent des anomalies dose-dépendantes dans l'histoarchitecture. (**Nel et al., 2006**).

L'hépatotoxicité induite par les (NPs-Ni) peut également être la raison de l'inflammation observée qui peut être causée par l'activation des cellules de Kupffer (**Berrahal et al., 2011**).

qui jouent un rôle central dans la défense contre les particules étrangères en éliminant de telles particules via la phagocytose (**Nishimori et al., 2009**). Cette activation des cellules de Kupffer peut servir d'effet hépatotoxique indirect des NPs qui est associé à l'apoptose (**Manke et al., 2013**). De plus, les NPs sont absorbées par les cellules de Kupffer dans le foie et ensuite par les macrophages dans d'autres endroits (**Sadauskas et al., 2007**).

Notre étude est cohérente avec celle de (**Shabnoor et al., 2021**) qui ont fait une enquête relative à l'exposition aux (NPs-Ni) et ont arrivé au résultat qui montre la congestion vasculaire et l'infiltration de cellules inflammatoires dans les hépatocytes.

4.2. Au niveau du cœur

Les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) sont induit un dysfonctionnement cardiaque médié par la contraction cardiaque et une inflammation cardiaque médiée par les neutrophiles (**Duan et al., 2016**).

Les rapports démontrant les altérations histologiques du cœur de rats ayant reçu des injections de (NPs-SiO₂) sont peu nombreux. Bien que **Du et al (2013)** aient démontré l'effet cardiotoxique des (NPs-SiO₂) amorphe, ils n'ont pas effectué d'étude histologique. Par contre, **Fu et al (2012)** ont examiné les effets toxiques aigus et les changements histologiques chez des rates femelles ayant reçu des (NPs-SiO₂) par voie intraveineuse et nous sommes arrivé à un résultat similaire.

4.3. Au niveau des reins

L'histoarchitecture rénale des rats recevant les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂), présente une dilatation tubulaire, hémorragie intra-glomérule et une atrophie de glomérule rénale. Ces altérations sont probablement dues aux effets néfastes des radicaux libres et les produits finaux issus de la peroxydation lipidique (MDA) induite par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂). De ce fait, l'accumulation des hydroperoxydes dans les reins est l'un des facteurs cytotoxique et nécrotique associés à la peroxydation des phospholipides membranaires (**Li et al., 2010 ; Mershiba et al., 2013**). Ces résultats confirment les modifications observées lors des mesures des paramètres biochimiques et les biomarqueurs d'atteinte rénale (urée et créatinine).

Dans l'étude actuelle, malgré les petites tailles de (NPs-Ni) mais elles ont montré une toxicité pour les néphrons. A cet égard, **Ahmadzadeh et al. (2017)** ont justifié ce phénomène comme suit ; avec la diminution de la taille des nanoparticules et l'augmentation du rapport entre leur surface et leur volume, leur réactivité chimique et biologique augmente. Cela conduit

à une production accrue de ROS au-delà de la tolérance des systèmes biologiques pour éliminer ou réduire leurs effets nocifs (**Thai et al., 2019**).

À l'appui de cette étude, notre résultat est proche à celui de **Chen et al. (2015)** qui a constaté que les doses élevées de (NPs) ont induit une atrophie glomérulaire, une dilatation tubulaire, une dilatation kystique de la capsule de Bowman, et une infiltration lymphocytaire.

4.4. Au niveau des testicules

La chute des cellules épithéliales du tubule séminifère brut et le désordre des cellules dans le tube ont été détectés lors de l'exposition des groupes de (NPs-Ni). Ce résultat a également été confirmé par les travaux de **Feron et al., (1973)** en selon lesquels ils montrent qu'une modification du coefficient de poids des organes doit être considérée comme étant due à un effet des produits chimiques (les NPs-Ni) dans les cas de réduction de la croissance et de dommages aux organes.

Notre résultat est en accord avec l'étude de **Morishita et al. (2012)** selon laquelle ils ont montré que les (NPs-SiO₂) étaient capables de pénétrer dans la barrière sang-testicule et distribuées à l'intérieur du testicule et donc pouvaient causer des dommages à la structure histologique des testicules.

Selon nos résultats, il a été constaté que la supplémentation en huile d'oléastre a également atténué les altérations histologiques (foie, rein, cœur et testicules) induites par les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂), cette réhabilitation pourrait être attribuée à la richesse de cette huile en composés bénéfiques qui ont un puissant pouvoir antioxydant et sont capables de réduire significativement le stress oxydatif, et par la suite conduire à la réduction des changements histopathologiques et à la restitution de l'état physiologique normal de l'organisme.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les nanotechnologies et les nanoparticules sont un domaine d'activité en pleine expansion, avant tout en raison du fait que les nanoparticules révèlent des propriétés chimiques et physiques radicalement différentes des substances de même composition mais de plus grande taille. En effet, les connaissances actuelles des effets toxiques des nanoparticules sont relativement limitées, il existe une incertitude réelle quant à leurs impacts sur les humains et l'environnement. Les raisons de cette inquiétude scientifique sont basées sur la méconnaissance des interactions existantes entre les nanoparticules et les systèmes biologiques.

L'utilisation des huiles végétales et des plantes médicinales sont encore aujourd'hui la forme de médecine la plus répandue à travers le monde, qui permet de remédier à des problèmes du quotidien de manière naturelle.

Notre travail avait pour objectif d'étudier d'une part les effets toxiques de les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) sur certaines fonctions vitales et sur le stress oxydant chez le rat, et d'autre part, de tester l'effet modulateur de l'huile d'oléastre contre la toxicité de ces nanoparticules.

A la lumière des résultats obtenues on peut conclure que ;

- L'huile d'oléastre contient une composition riche en polyphénols et présente en petites quantités des flavonoïdes.
- L'huile d'oléastre possède un pouvoir anti-radicalaire très important, est en relation directe avec son contenu en métabolites secondaires, et dépendant de l'ensemble des substances antioxydantes, de leur nature et de leur quantité.
 - L'administration des (NPs-Ni) et des (NPs-SiO₂) aux rats, a engendré ;
 - ✓ Des perturbations au niveau de certains paramètres biochimiques ; augmentation des concentrations sériques en cholestérol total, cholestérol-HDL et triglycérides.
 - ✓ Des perturbations au niveau de certains paramètres métaboliques hépatiques confirment l'atteinte hépatique (perturbation des activités des enzymes hépatiques (ASAT, PAL)).
 - ✓ Une atteinte rénale, qui se manifeste par une perturbation des paramètres sériques de la néphrotoxicité (urée, créatinine).
 - ✓ Un stress oxydant, se traduit par une nette augmentation du marqueur de la peroxydation lipidique (MDA) au niveau du foie, reins, poumons, testicules et cœur, une réduction de taux du GSH et des activités antioxydants enzymatiques du CAT et du SOD.

✓ Des modifications histologiques au niveau du foie et cœur (une congestion vasculaire et une infiltration leucocytaire), au niveau des reins (une atrophie glomérulaire et l'apparition des agrégats de cellules inflammatoires) et au niveau des testicules (une chute des cellules épithéliales du tubule séminifère, un désordre des cellules épithéliales dans le tubule séminifère, et une dégénérescence du tissu interstitiel et le rétrécissement de l'épithélium séminifère. Ces modifications sont en accord avec les résultats biochimiques observés.

- La supplémentation en l'huile d'oléastre aux rats intoxiqués a engendrée ;
- ✓ Un retour des taux de cholestérol total, cholestérol-HDL, triglycérides et des enzymes hépatiques (ASAT, PAL) à la normale.
- ✓ Absence des altérations graves de la fonction hépatique.
- ✓ Une correction des taux sériques en créatinine et en urée sans altération de la fonction rénale.
- ✓ Une diminution du taux de MDA tissulaire.
- ✓ Une amélioration du statut enzymatique antioxydant telle que la SOD, la CAT et le GST et non enzymatique telle que le GSH au niveau hépatique, rénale, pulmonaire, testiculaire et cardiaque.
- ✓ Une atténuation des altérations histologiques et une réhabilitation des tissus hépatiques, cardiaques, rénales et testiculaires.

Ces résultats montrent bien que les (NPs-Ni) et les (NPs-SiO₂) exercent ses effets cytotoxiques en tant que stress oxydant et ceci éventuellement par la formation de radicaux libres oxygénés. Ainsi, des supplémentations en l'huile d'oléastre permettent de limiter les perturbations provoquées par ces nanoparticules. Ces supplémentations semblent avoir des effets bénéfiques, par une limitation des phénomènes radicalaires et une réparation des dommages oxydantes, ceci est expliqué par leur pouvoir antioxydant qui conduit donc à contracter l'état du stress oxydant.

Dans le but d'approfondir ce travail, il serait intéressant de ;

- ✓ Evaluer les effets d'une exposition chronique aux (NPs-Ni) et aux (NPs-SiO₂) sur une période plus longue avec d'autres doses afin de mettre en évidence leurs effets toxiques.
- ✓ Conduire cette recherche sur d'autres modèles biologiques et d'autres traitements.
- ✓ Approfondir l'étude par des techniques plus complètes au niveau subcellulaire et moléculaire.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- ✎ **Abudayyak M, Guzel E and Özhan G. (2017).** Nickel oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in kidney cell line (NRK-52E). *Biol Trace Elem Res* 178:98-104.
- ✎ **Addou S. (2017).** Étude des paramètres physico-chimiques et organoleptiques de l'huile d'olives de la variété ségoise dans la région de Tlemcen. Mémoire de fin d'étude. Université de Tlemcen.P27
- ✎ **Aebi H. (1983).** Catalase, In : *Methods in Enzymatic Analysis* (Ed. Bergmer HU), Vol. 3 .Academic press, New York.,p. 276–286.
- ✎ **Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P et Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de loxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum ; 74 : 636-643.*
- ✎ **AFSSET. (2010).** Les nanomatériaux, evaluation des risques lies aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement, Rapport d'expertise collective : http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/460552230101468097041324565478/10_03_ED_Les_nanomateriaux_Rapport_comprese.Pdf.
- ✎ **Ahmadzadeh A, Aghababaei M, Allameh Z, and al. (2017).** The impact of silymarin extract on oxidative stress induced by gold nanoparticles. *Biomed Res.* 28:6144-50.
- ✎ **Alain O. (2008).** Les nanotechnologies. P1.
- ✎ **Alais C, Linden G and Miclo L. (1999).** Lipides In: *Biochimie alimantaire.* P51-71.
- ✎ **Andujar, P. (2016).** Nanoparticules : Nature, utilisations, effets sur la santé. Université Paris-Est Créteil. Faculté de Médecine Inserm U955 8 rue du Général Sarrail 94000 Créteil, Centre hospitalier Intercommunal de Créteil Service de Pneumologie et de Pathologie Professionnelle 40 avenue de Verdun 94000 Créteil – France. P 10-11.
- ✎ **Ansari K. (1997).** The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences,* 51, 319-336.

- ✂ **Attig H, Dagnino A, Negri A and al. (2010).** Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(7): 1712-9.
- ✂ **Asada K, Takahashi M and Nagate M. (1974).** Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem.* 38, 471–3.
- ✂ **Audrey F, Dumax-Vorzet M, Tate R, Rhod H, Elder A and Povey C (2015).** Cytotoxicity and genotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. *Mutagenesis* 30(5), 621–633.
- ✂ **Audigie C, Dupont G, et Zouszain F. (1984).** Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tomel. Ed. Doin. Pp : 136-155.
- ✂ **Azouz R and Korany R. (2021).** Toxic impacts of amorphous silica nanoparticles on liver and kidney of male adult rats: an in vivo study. *Biological Trace Element Research*, 199(7): 2653-2662.
- ✂ **Azzouni M et Benariba. (2016).** Comparaison physicochimiques et organoleptiques de quelques huiles d'olives de la région de Tlemcen. Mémoire de fin d'étude. Université de Tlemcen. P50.

B

- ✂ **Baccouri B, Zarrouk W and Krichene D. (2007).** Influence of fruit ripening and Crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected Oleasters (*Olea europaea* L.). *Journal of Agrbiology*, 6 (3): 388-396.
- ✂ **Bai C, Capell T, Berman J, Medina V, Sandmann G, Christou P and Zhu C. (2016).** Bottlenecks in carotenoid biosynthesis and accumulation in rice endosperm are influenced by the precursor-product balance. *Plant biotechnol J*, 14: 195-205.
- ✂ **Battacharya S, Satyan K and Ghosal S. (1997).** Antioxidant activity of glycol with anolides from with aniasomnifera. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35p.
- ✂ **Bayr H. (2005).** Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), 498-501.
- ✂ **Beckman K and Ames B. (1998).** The free radical theory of aging matures, *Physiol, Rev*, 78(2) ; p : 547-81.

- ✎ **Beddiar A, Mekahlia, M.N. (2007).** Infectivité et efficacité de 4 morphotypes de spores de champignons endomycorhiziens à arbuscules extraits de sols Algériens et inoculés à l'oléastre (*Olea oleaster* « HOOFG. Et LINK. »). Colloque international sur les BioTech World. 24-25 Novembre. *Oran, Algérie*. 18.
- ✎ **Bendimerad, S. (2011).** Effet hypolipidémiant de l'huile d'olivier sauvage *olea europaea* oléastre ou *olea sylvestris*. Thèse magister : physiopathologie cellulaire : faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Tlemcen.
- ✎ **Benosman R, Mamchaou, (2005).** Contribution au contrôle de qualité physicochimique d'échantillons d'huiles d'olives. Mémoire d'une fin d'étude. Université de Tlemcen. P103.
- ✎ **Berrahal, A., Lasram, M., El Elj, N., Kerkeni, A., Gharbi N., El-Fazaa, S. (2011).** Effect of age-dependent exposure to lead on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male rats. *Environmental Toxicology*, 26(1):68–78.
- ✎ **Besnard, G., Bervillé, A. (2000).** Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences Série III*. 323, 173-81.
- ✎ **Bettazzi, F. Palchetti, I. (2019).** Nanotoxicity assessment: A challenging application for cutting edge electroanalytical tools. Université degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica Ugo Schiff, via dellaLastruccia, Sesto Fiorentino, Fi, Italy. *Analyticachimica* 1072 : P 61-74.
- ✎ **Boczkowski, J. Lanone, S. (2010).** Nanoparticules : une prévention est-elle possible. Université Paris-Est. *Revue française d'allergologie* 50 : P 214-216.
- ✎ **Bonnefont-Rousselot D.,Théron P., Beaudoux J.L., Peynet J., Legrand A and Delattre J. (2001).** Aging and oxidative stress. Which potential markers. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* ; 59(4) ; p: 453-9.
- ✎ **Boon CS, Mc Clements DJ, Weiss J, Decker EA. (2010).** Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* ; 50: 515-532.
- ✎ **Boskou D. (1996).** Olive Oil; Chemistry and Technology. American Oil Chemist's Society. Press: champaign, IL, USA, pp.52-83.
- ✎ **Boualem B.(2009).** Bejaïa : L'olivier sauvage délaissé. *Revue de presse, Quotidien El Watan, Algérie*, 20/07/2009.

- ✂ **Bouchefra A. et Idoui T., (2012).** Effet nutritionnel de l'huile d'olive vierge « variété Sigoise » sur les performances de croissance, les lipides plasmatiques et la flore endogène du rat Wistar. *Les technologies de laboratoire*, 7(26) :20-26.
- ✂ **Bouchenak O., Yahiaoui K., Toubal S., Benhabyles N., Laoufi R., et Arab K. (2018).** Étude comparative des huiles d'olives de cinq régions d'Algérie (Bouira, Bejaia, Biskra, dellys et Jijel). *Revue agrobiologie*, 8 (2), 1038-1046.
- ✂ **Boudribila, M.M. (2004).** Les anciens Amazighs avant les phéniciens : Mode de vie et Organisation sociale. *AWAL*. 29, 17-31.
- ✂ **Bouhadira K épse Fodhil. (2011).** Étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. P29.
- ✂ **Boukhallout F et Touati K. (2016).** Nantoxicité de Sélénure de Cadmium (NPs) sur les paramètres de stress oxydatif d'un modèle cellulaire biologique alternatif *Helix aspersa* PP 06-07.
- ✂ **Bouzidi H. (2018).** Evaluation de la qualité physico_chimique de huile d'olive aromatisé.Mémoire d'une fin d'étude.Université A. Mira - Bejaia .P23.
- ✂ **Brigitte Pouyet, Véronique Ollivier, (2014).**, Réglementations sur l'étiquetage et la présentation des huiles d'olive. OCL.
- ✂ **Breton, C., Besnard, G., Bervillé, A. (2006).** Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In: Documenting Domestication: new genetic and archaeological paradigms. Berkeley: University of California Press (Zeder MA., Decker- W. D., Bradley D. & Smith B., eds). 47.
- ✂ **Branz A. (2012).** antioxydant activity and phenolic composition of brizilin hoeney and their extracts *J.Chem Sco*,15-22.
- ✂ **Breton, C., Tersac, M., Bervillé, A. (2006).** Genetic diversity and gene flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. *Journal of Biogeography*.
- ✂ **Breton, C., Pinatel, C., Médail, F., Bonhomme, F., Berville A. (2008).** Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. 524-200.

- ✎ **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales. 3e édition. Ed. Technique & Documentation, Paris.

C

- ✎ **C. Fu, T. Liu, F. Tang, D. Chen, L. Li, H. Liu, X. Li. (2012).** Acute toxicity and oxidative damage induced by silica nanorattle in vivo, *Chin. Sci. Bull.* 57 (20) 2525–2532.
- ✎ **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat AG., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L and Sauvaigo S. (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.*, 383(6); p: 933-43.
- ✎ **Cartana, J., Arola, L. (1992).** Nickel induced hyperglycemia the role of insulin and glucagon. *Toxicol.* 71 : 181-92.
- ✎ **Cartes, P., Gianfreda, L., & Mora, M. L. (2005).** Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant and Soil*, 276(1-2), 359-367.
- ✎ **Caravaca, F., Barea, J.M., Figuerola, D., Roldán, A. (2002).** Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *Sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *ELSEVIER.* 20, 107-118.
- ✎ **Cemek M., Buyukben A., Buyukokuroglu M. E., Aymelek F. et Tur L. (2010).** Protective roles of vitamin E (α -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 96 : 113-118.
- ✎ **Chen L., HU J.Y. and Wang S.Q. (2012).** The rôle of antioxidants in photoprotection: a critical review.
- ✎ **Chen, Z., Gallie, D.R. (2004).** The ascorbic acid redox state controlsguard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell Online* 16, 1143-1162.

- ✂ **Chen, X.; Zhouhua,W.; Jie, Z.; Xinlu, F.; Jinqiang, L.; Yuwen, Q.; Zhiying, H .(2015).**Renal interstitial fibrosis induced by high-dose mesoporous silica nanoparticles via the NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Nanomed.* , 10, 1–22.
- ✂ **Chettah K. (2014).** Etude des propriétés physiques des couches minces et des poudres du SiO₂ dopées au Cobalt P04.
- ✂ **Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, Jang MK, Kim Mj, ParkYB. (2002).** Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile instreptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clinica Chimica Acta*, 317 : 109 - 117.
- ✂ **Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA. 1262.
- ✂ **CONSEIL OLÉICOLE INTERNATIONAL. (2015).** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive, COI/T.15/NC n° 3/Rév.
- ✂ **CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL.**Analyse sensorielle de l'huile d'olive méthode d'évaluation organoleptique de l'huile d'olive vierge., COI/T.20/Doc. n° 15/Rév. 10
- ✂ **Costa M., Salnikow K., Cosentio Z. et al. (1994).** Molecular mechanism of nickel carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 102: 127-130.
- ✂ **Comte, H. (1990).** Le tour de l'olivier. Régine Vallée, 2ème ed. 116

D

- ✂ **Dabbou S., Dabbou S., Selvaggini R., Urbani S., Taticchi A., Servili M., Hammami M. (2011).** Comparison of the chemical composition and the organoleptic profile of virgin oliveoil from two wild and two cultivated Tunisian *Olea europaea*. *Chemistry and Biodiversity*.Vol 8, p: 189-202.
- ✂ **Das K.K., Gupta A.D., Dhundasi S.A. et al. (2001).** Effect of L-ascorbic acid on nickel-induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology.* 17 : 29-44
- ✂ **Dickinson D and Forman H. (2002).** Cellular glutathione and thiols metabolism.*Biochem Pharmacol.*64 .1019-26

- ✂ **De Candolle A. (1883).** Origines des plantes cultivées. Ed., Librairie Germer Bâillière, Paris. 372.
- ✂ **Djaalali I et Gouasmia N. (2018).** Néphrotoxicité d'oxyde de titane (TiO₂) sous forme des nanoparticules chez les rats et l'effet opposé de diféruoyl-méthane.P 08.
- ✂ **Djehboub W.(2010).** Nanoparticules d'or et d'argent déposées sur oxyde de cérium synthétisées sous irradiation. PP 03-04.
- ✂ **Djemli, S., Kechrid, Z., & Mohamed R. D. (2012).** Combined protective effect of zinc and vitamin C on nickel-induced oxidative liver injury in rats. *Annals of Biological Research*, 3(7), 3410-3418-
- ✂ **Djeziri F. (2012).** -Etude de l'activité hypolipémiante de l'huile d'olea europaea var oleaster chez le rat « wistar ». Thèse de doctorat. Université Abou-Bekr Belkaïd de Tlemcen.
- ✂ **Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y, Reid MM, Tufenkji N, Lead JR, Leppard GG, Wilkinson KJ, (2009).** Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environ. Sci. Technol.* 43 : 7277-7284.
- ✂ **Doveri S., Baldoni L., (2007).** Olive in Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants.Ed C. Kole. Volume 4: Fruits and Nuts, p: 253-264.
- ✂ **Draper, H.H., Hadley, M, (1988).**Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186. 241-431.
- ✂ **Du Z, Zhao D, Jing L, Cui G, Jin M, Li Y, Liu X, Liu Y, Du H, Guo C, Zhou X, and Sun Z. (2013).** Cardiovascular toxicity of different sizes amorphous silica nanoparticles in rats after intratracheal instillation, *Cardiovasc. Toxicol.* 13 (3)194–207.

F

- ✂ **FAO/WHO, (2003).** www.fao.org/docrep/x1880f/x1880f03.htm .
- ✂ **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*,108-115.

- ✂ **Favier A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin.* 55 (1), 9 - 16.
- ✂ **Feron, V.J.; de Groot, A.P.; Spanjers, M.T.; Til, H.P. (1973)** .An evaluation of the criterion "organ weight" under conditions of growth retardation. *Food Cosmet. Toxicol.* 1973, 11, 85–94.
- ✂ **Ferrari A, Venturino A et D'Angelo A.(2007).** Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2) : 134-142
- ✂ **Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh A.R. (1997).** Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.) as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers*, 2 : 5156
- ✂ **Fingo D.R. (1997).** Kidney function. In: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruce M.L. *clinical Biochemistry Domestic Animals.* Academic Press, San Diego, California. 462-478.
- ✂ **Foyer C, Harbinson, J and Mullineaux P. (1994).**Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *Causes photooxidative Stress Amelior. Def. Syst. Plants* 1-42.
- ✂ **Foyer C and Noctor G.(2005).**A Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant cell Online* 17, 1866-1875

G

- ✂ **Gherib A. (2015).** Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait d'*Olea europea* var.oleaster et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques .Thèse Doctorat: biochimie Appliquée : faculté des. Université Badji Mokhtar – Annaba.
- ✂ **Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M. (2001).** Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. Pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- ✂ **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.

- ✂ **Gould. (1992).** Total quality management for the Food industries. Éditions Elsevier, Baltimore, USA. 165PP.
- ✂ **Goodman T.T., Chen J., Matveev K., Pun, S.H., (2008).** Spatio-temporal modelling of nanoparticle delivery to multicellular tumor spheroids. *Biotechnology and Bioengineering*, **101**(2):388–399.
- ✂ **Griffith, O.W. (1999).** Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biol. Med.* 27: 922-935.
- ✂ **Gutierrez F, Varona I and Albi M. (2000).** Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1106-10.
- ✂ **Guitto M. (2014).** Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO₂ P 22.

H

- ✂ **Habig WH, Pabst Jakoby WB. (1974).** Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *J Biol chem.* 249, 7130-9.
- ✂ **Harborne J.B. and Williams C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry.* 55 : 481-504.
- ✂ **Hansen S.F., Michelson E.S., Kamper A., Borling P., Stuer-Lauridsen F., Baun A.,(2008).** Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology*, **17**(5): 438-447.
- ✂ **Hansen S. (2009).** Régulation and Risk Assessment of Nanomaterials Too Little, Too Late. Mémoire en vue d'obtention de la thèse de doctorat. Université technique du Danemark, p : 130.
- ✂ **Huang C.L. & Sumpio B-E., (2008).** -Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *the American College of Surgeons*, 207(3): 407-416.
- ✂ **Harris, R.M., Williams, T.D., Hodges, N.J., Waring, R.H.(2011).** Reactive oxygen species and oxidative DNA damage mediate the cytotoxicity of tungsten–nickel–cobalt alloys in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250 : 19–28.

- ✎ **Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. (2008).** Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition. Oxford University Press.
- ✎ **Halliwell B., Gutteridge JMC. (1989).** Free Radicals in Biology and Medicine, Second edition, Clarendon Press, Oxford.
- ✎ **Harber, L.T., Diamond, G.L., Zhao, Q., Erdreich, L., & Dourson, M.L. (2000).** Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31(2 Pt 1): 231-41.
- ✎ **Hattiwale, S.H., Saha S, Yendigeri, S.M., Jargar. J.G., Dhundasi, S.A., & Das K.K (2013).** Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. *Biometals.* 26: 329–336.
- ✎ **Hayes J.D. et Pulford D.J. (1995).** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 : 445-600.
- ✎ **Herrera B., and Dueñas A. (2008).** La cata d'aceites : aceite d'oliva virgen. Características organolépticas y análisis sensorial. Sivilla.junta d'andalucía. Instituto de investigación y formación agraria y pesquera, consejería de agricultura y pesca, Secretaria General Técnica .P 16-18.
- ✎ **Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C. et Kahru, A. (2008).** Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71 (7), 1308-1316.
- ✎ **Hfaïedh, N., Allaqui, M.S., Croute, F., Soleilhavoup, J.P., Jammoussi, K., Makni Ayadi, F., Kammoun, A. & El Feki, A. (2005).** Interaction du jeûne intermittent sur les effets cytotoxiques rénaux du nickel chez le rat pubère. *Comptes Rendus Biologies*, 328(7), 648660.
- ✎ **Hultberg, B., Anderson, A., Isakson, A. (2001).** Interactions of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potential of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology.* 56, 93100.

I

- ✂ **_Iscan, M., Ada, A.O., Coban, T.(2002).** Combined Effects of Cadmium and Nickel on Testicular Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Rats, *Biological Trace Element Research*. 89: 178-190.

J

- ✂ **Jacques-Meunié, D. (1982).** Le Maroc saharien des origines à 1670, Klincksieck, Paris. 990.
- ✂ **Jacotot B. (1996).** Huile d'olive et prévention. *Nutrition Clinique Et Métabolisme*. 10, 7S- 9S.
- ✂ **Jiang J, Pi J and Cai J, (2018).** The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorg Chem Appl* 5:1062562.
- ✂ **Ji LL, Fu R, Mitchell EW. (1992).** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol*. 73, 1854-1859.
- ✂ **James, C.W., Lamaa, Sh.T., Simon, K.F., Chanc, M. H.W., Lam, M. M., Paul.K.S .(2006).**Nickel-seleniuiinteraction-time dependentbiochemical alterations and metal decoration IN RATS Lam *Environmental Pollution* 144 790_801.

K

- ✂ **Kahru, A. and K. Savolainen. (2010).** Potential hazard of nanoparticles: from properties to biological and environmental effects." *Toxicology* 269(2-3): 89-91.
- ✂ **Käkelä, R., Käkelä, A., Hyvärinen, H. (1999).** Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 123(1) : 27-37.
- ✂ **Karami S and Abdollahi M. (2011).**Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology*. 30(9): 1119-1140.
- ✂ **Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., and Moller, L. (2008).** *Chem Res Toxicol* 21(9), 1726- 1732.

- ✂ **Kasprzak S Kazimirz, sunderman william slankiw konstanin. (2003).**Nickel corcinogenesis laboratory of comparative carcinogenesis National cancer institute at frederick Mutation Reaserch 533, 67-97.
- ✂ **King A and Young G (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. Jof the American dietetic association.99:213-218. (Cited in Djemai Zoueglache S, 2008).
- ✂ **Kirsty A. H., Lynn C. & Crosbie, A.W. (2000).** A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men. Journal of Nutritional Biochemistry, 11:408-416.
- ✂ **Krieger-Liszkay A. (2005).** Singlet oxygen production in photosynthesis. J, Exp. Bot. 56, 337-346.
- ✂ **Krötz F, Sohn H and Pohl U. (2004).** Reactive oxygen species. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 24(11), 1988-1996.
- ✂ **Koudri M. (2008).** Extraction et caractérisation physico-chimique de l'huile d'argan provenant d'arbres cultivés dans deux régions de l'Algérie (Tindouf et Mostaganem). Mémoire de fin d'étude. Université Hassiba Ben Bouali- Chlef.P50.
- ✂ **Kondoh M, Nishimori H, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K. (2009).** Silica nanoparticles as hepatotoxicants. Eur J Pharm Biopharm; 72:496e501.

L

- ✂ **Lakhal R. (2016).** Nouveau procédé d'élaboration de micro et nanoparticules d'oxyde de fer en voie sèche : caractérisation, étude du procédé et proposition d'un mécanisme réactionnel p31.
- ✂ **Lavee,S. (2012).** Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*. 161, 333–339.
- ✂ **LAIB, A. et MEDBOUH, S. (2016).** Impact de l'huile d'oléastre sur l'inflammation colique chez le rat de la souche Wistar. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine.

- ✎ **Lazzez A., Cossentini M., Khlif M. (2006).** Etude de l'évolution des stérols, des alcools aliphatiques et des pigments de l'huile d'olive au cours du processus de maturation. Journal de la société chimique de Tunisie.
- ✎ **Lugasi A., Hovari J., SagiK., and Biro L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases J.Acta.biologica. szegediensis. 47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).
- ✎ **Lumaret R., Ouazzani N., Michuad H., Vivier G., Deguilloux M-F., Di Giusto F., (2004).** Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean basin. Heredity. 92, p: 343-351.
- ✎ **Li A, Han L, Han C.(2012).** Antioxidant and neuroprotective activities of essential oil isolated from chinese herb pairs of *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. J Appl Pharm Sci; 2(5):1–4.
- ✎ **Li, Z., Piao, F., Liu, S., Wang, Y., Qu, S. (2010).** Subchronic exposure to arsenic trioxide-induced oxidative DNA damage in kidney tissue of mice. Exp. Toxicol. Pathol. 62, 543–547.
- ✎ **Lou, J., Jin, L., Wu, N., Tan, Y., Song, Y., Gao, M., Liu, K., & Zhang. He, J. (2013).** DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 533–540.
- ✎ **Lu, S. C. (2013).** "Glutathione synthesis." *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3143- 3153.
- ✎ **Lungato, L., Marques, M. S., Pereira, V. G., Hix, S., Gazarini, M. L., Tufik, S. and D'Almeida, V. (2013).** "Sleep deprivation alters gene expression and antioxidant enzyme activity in mice splenocytes." *Scand J Immunol* 77(3) : 195-199.

M

- ✎ **Martínez-Cayuela M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77, 147-161.
- ✎ **Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E and Kefalas P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry* 89; p: 411-420.

- ✂ **Manke, A., Wang, L., Rojanasakul, Y. (2013).** Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Research International*: 942916.
- ✂ **Massea, R. Boudéne, C. (2008).** Les nanoparticules constituent-elles une nouvelle classe de toxiques environnementaux ? Académie nationale de médecine. Paris (France). Mésson Elsevier. P 319.
- ✂ **Mena S., Ortega A. and Estrela J. M, (2009).** Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 36-44.
- ✂ **Mershiba, S.M., Dassprakash, M.V., Saraswathy, S.D. (2013).** Protective effect of naringenin on hepatic and renal dysfunction and oxidative stress in arsenic intoxicated rats. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3681–3691.
- ✂ **Milbury P and Richer C. (2008).** Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: PRAEGER; p: 81-100.
- ✂ **Minguez-Mosquera I., Rejano-Navaro L. & Gandul-Rojas B. (1991).** - Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68:669–671.
- ✂ **Misra, M., Rodriguez, R. E and Kasprzak, K.(1990).** Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. *Toxicology*, 64(1), 1–17.
- ✂ **Munteanu M.C., Radu M., Hermenean A., Sima C., Dinu D., Costache M., Grigoriu C., Dinischiotu A., (2010).** Antioxidative response induced by SiO₂ nanoparticles in MRC5 cell line. *Rom Biotechnol Lett*, 15(1): 5000-5007.
- ✂ **Morishita, Y., Yoshioka, Y., Satoh, H., Nojiri, N., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Tsutsumi, Y.(2012).** Distribution and histologic effects of intravenously administered amorphous nanosilica particles in the testes of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 297–301.

N

- ✂ **Nafisi V., Hägg M.B.(2014).** Development of dual layer of ZIF-8/PEBAX-2533 mixed matrix membrane for CO₂ capture. *Journal of Membrane Science*, **459** : 244-255.

- ✂ **Napierska D., Thomassen L.C., Lison D., Martens J.A., Hoet P.H. (2010).** The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and fibre toxicology*, 7(1): 1-32.
- ✂ **Niska K, Santos-Martinez MJ, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. CuO (2015).** Nanoparticles induce apoptosis by impairing the antioxidant defense and detoxification systems in the mouse hippocampal HT22 cell line: Protective effect of crocetin. *Toxicol Vitr* ; 29(4):663–71.
- ✂ **Nel A, Xia T, Madler L, and al. (2006).** Toxic potential of materials at the nano level. *Science* 311: 622–627.

O

- ✂ **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979).** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal Biochem*; 95: 351–8.
- ✂ **Ostiguy, C. Lapointe, C. Trottier, M. Ménard, L. Clautier, Y. Boutin, M. Antoun, M. Normand, C. (2006).** Les effets à la santé reliés aux nanoparticules. IRSST 505. Montréal (Québec). Rapport R-451. P 07.
- ✂ **Owen R.W., Haubner R. & Wurtele G.(2000).** Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 1: 107–112.

P

- ✂ **Packer T, Ritschler HJ, Wessel K. (1997).** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 22, 359-378.
- ✂ **Pailleux M. (2012).** Etude in vitro de la toxicité de nanoparticules de boehmite. PP 31-37.
- ✂ **Pari, L., Amudha, K. (2011).** Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 10 ; 650(1) : 364-70.
- ✂ **Pari, L., Prasath, A. (2008).** Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Biochem Biotech.* 173: 77–8.
- ✂ **Pascale H. Berthoz A. Corriu R. Dupas C. Fert A. Grangier P. Henry C. Joachim C. Joblin C. Kapsa P. Ledoux-Rak I. Marzin J. Nozières J. Pannetier B.**

- Pérez A. Stievenard D. Vieu C. Yvon J. Zyss J. (2004).** Nanosciences et nanotechnologies. P 23.
- ✂ **Passagne I., Morille M., Rousset M., Pujalté I., L'azou B.(2012).** Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*, 299(2-3) :112-124.
- ✂ **Perez-Jimenez F. (2005).** International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 35: 421-424.
- ✂ **Pirisi F.M., Cabras P., Cao C.F., Migliorini M.,and Magelli M. (2000).** Phenolic compounds in virgin oil.2. Reapparaisal of the extraction HPLC separation,and quantification procedures. *Journal of the Agricultural and food chemistry*, 48:1770-5.
- ✂ **Poole, C.P., and Owens, F.J. (2003).**Introduction to Nanotechnology. Editions Wiley-Interscience.
- ✂ **Powers SK, Lennon SL. (1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 58, 1025-1033.
- ✂ **Powers S and Jackson M. (2008).**Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88, 1243-1276.
- ✂ **Prosie F, Lesage F et Deschamps F. (2008).** Nanoparticules : Structures, utilisations et effets sur la santé. *Presse Med* 37 : P 1431-1437.
- ✂ **Pujlaté I. (2011).** Étude *in vitro* de la toxicité de nanoparticules métalliques (TiO₂, ZnO, CdS) sur la cible rénale. Mémoire doctorat. Université Bordeaux Segalen. Thèse n° 1849. P 02-24.

Q

- ✂ **Qian F, Pang HL, Xu XR, Zou ZY, Dong PC, Xiao X, Wang X, Sun TT, Dou HL, Lin XM. (2012).** Effect Of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age-related macular degeneration. *Ophthalmology* ; 119: 2290-2297.

R

- ✂ **Rao C. (2004).** Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research*, 555, 107-119.
- ✂ **Raman, Arjun V and Marla J. (2011).** Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates. *Molecular Aspects of Cell Signaling*. 195-208.
- ✂ **Rahman M, Siddiqui M and Jamil K. (2000).** Acid and alkaline phosphatase activities in a novel phosphorothionate (RPR-11) treated male and female rats. Evidence of dose and time-dependent response. *Drug Chem. Toxicol.* 23: 497-509.
- ✂ **Rayan D, Robards K et Lavee S. (1998).** Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 72 :23-33.
- ✂ **Ricaud M. (2007).** Les silices amorphes. P01.
- ✂ **Rudolf E and Cervinka M. (2010).** Zinc pyrithione induces cellular stress signalling and apoptosis in Hep-2 cervical tumor cells : the role of mitochondria and lysosomes. *Biometals* 23, 339–354.

S

- ✂ **Sarah T. (2013).** Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique, 84.
- ✂ **Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A et Deby-Dupont G. (2003).** La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 147, 79-93.
- ✂ **Seingleton V, Othofer R and Lamuela R. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- ✂ **Seyoum A, Asres K, and El-Fiky F. (2006).** Structure–radical scavenging activity Relationship of flavonoides. *Phytochemistry*. 67: 2058–2070.

- ✎ **Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A and Danscher G. (2007).** Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the Organism. *Particle and Fibre Toxicology*, 4 :10.
- ✎ **Shabnoor I, Farhat J, Cheng P, Muhammad A, Muhammad UI, Azhar R, Shujat A, Abdur R, Gaber ES B and Ewa K.(2021).**Nickel nanoparticles induce hepatotoxicity via oxidative and nitrative stress-mediated apoptosis and inflammation *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 0(0) 1–16.
- ✎ **Shang Z, Abdulqadir and Falah MA. (2018).** Nephrotoxicity of Nickel Nanoparticles in Rat: Effect of Different Doses.The International Conference on Chemical, Biological, Environmental & Medical Sciences (CBEMS-18), Istanbul.
- ✎ **Steinbrenner H and Sies H. (2009).** Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(11), 1478-1485.
- ✎ **Sidi Mammar M. (2011).** Elixir, une huile d'oléastre thérapeutique.
- ✎ **Sidi Mammar M. (2012).** Procédé de fabrication d'une huile thérapeutique dérivée de l'oléastre qu'est la forme sauvage de l'olivier. INAPI. 110528.
- ✎ **Singh U, Devaraj S and Jialal I. (2005).** Vitamine E, Oxidative stress, and inflammation.*Ann Rev of Nut.* 25, 151-175.
- ✎ **Stadtman ER. (1991).** Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.*, 10(3-4); p: 249.

T

- ✎ **Tanouti K. , Elamrani A., Serghini – Caid H. , Khalid A. , Bahtta Y. , Benali A. , Harkous M., et Khlar M. (2010) .** Caractérisation de l'huile d'olive produite dans des coopératives pilote (Lakamara et kenine) au niveau du Maroc oriental. *Technologie de laboratoire*, 5, 18-26.
- ✎ **Terral, J.F., Arnold-Simard, G. (1996).** Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res.* 46,176-85.

- ✂ **Tianlong Liu, Linlin Li, Changhui Fu, Huiyu Liu, Dong Chen, Fangqiong Tang. (2012).** Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles *Biomaterials* 33 2399-2407.
- ✂ **Tomalia D. (2004).** Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichimica Acta* 37 (2) : 39-57. Page d'accueil visionnée le 8/06/2005.
- ✂ **Torres R. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; *Phytochemistry* 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987.
- ✂ **Tratner I. (2003).** Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux. *Médecine/Sciences* n°12. Vol 19 ; p : 1291-1292.
- ✂ **Triboulet S. (2013).** Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique. *Sciences agricoles*. Université de Grenoble, 2013. Français. P82-84.



- ✂ **Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. (2005).** "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1- 40.
- ✂ **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J.(2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J. Biochem. Cell Bio.* 39, 44-84.
- ✂ **Vasquez Roncero A, Ganer Del Valle C. et Ganer Del Valle ML. (1973).** Determinacion de los polyfenoles totales de la ceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24(6) : 350-357.
- ✂ **Villasante A, Araneda O, Behn C, Galleguillos M and Adarmes H. (2010).** Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. *Veterinary Research Communications*. 34 (2), 133141.

W

- ✎ **Walaa GH, Ayman M, Ekram M, El-Shaymaa El-Nahassd, Hanan AS, Ahmed AF .(2019).** Cardiac and pulmonary toxicity of mesoporous silica nanoparticles is associated with excessive ROS production and redox imbalance in Wistar Rats. *Journal of Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109: 2527–2538.
- ✎ **Wang Y, Xu Z, Bach SJ and McAllister TA. (2008).** Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on *in vitro* ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145 (1/4): 375-395.
- ✎ **Weckbeker G and Cory JG. (1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Let.* 40 , 257-264.
- ✎ **Wolff SP, Bascal ZA and Hunt JV. (1989).**"Autoxidative glycosylation": free radicals and glycation theory. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 304; p: 259-75.
- ✎ **Wolff JP. (1968).** Manuel d'analyse des corps gras. Edition Azoulay-Paris. P245.

X

- ✎ **Xiel J, Funakoshi T, Shimada H and Kojima S. (1995).** Effects of chelating agents on testicular toxicity exposure to nickel in mice caused by acute. *Toxicology*.103 : 147-155.

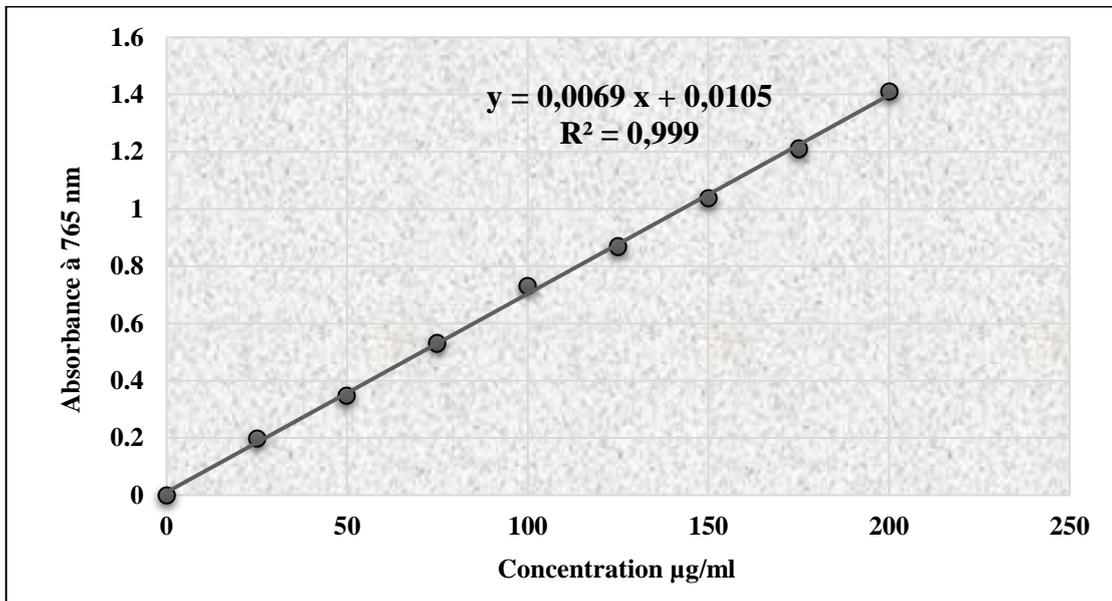
Y

- ✎ **Yin JJ, Liu J, Ehrenshaft M, Roberts JE, Fu PP, Mason RP and Zhao B.(2013)** .Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-Generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicol Appl Pharmacol*; 263(1):81–8.
- ✎ **Yu Y, Duan J , Li Y, Li Y, Jing L, Yang M, Wang J and Sun Z .(2017).** Silica nanoparticles induce liver fibrosis via TGF(1)/Smad3 pathway in icr mice. *Int. J. Nanomed.* , 12, 6045–6057.

ANNEXES

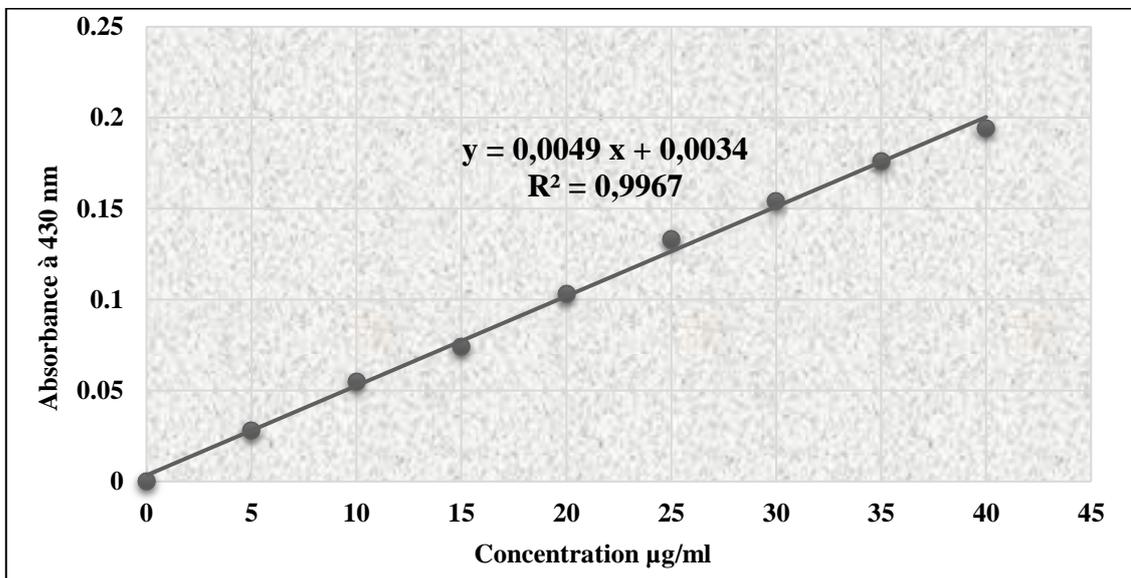
1. Courbes d'étalonnage

1.1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique



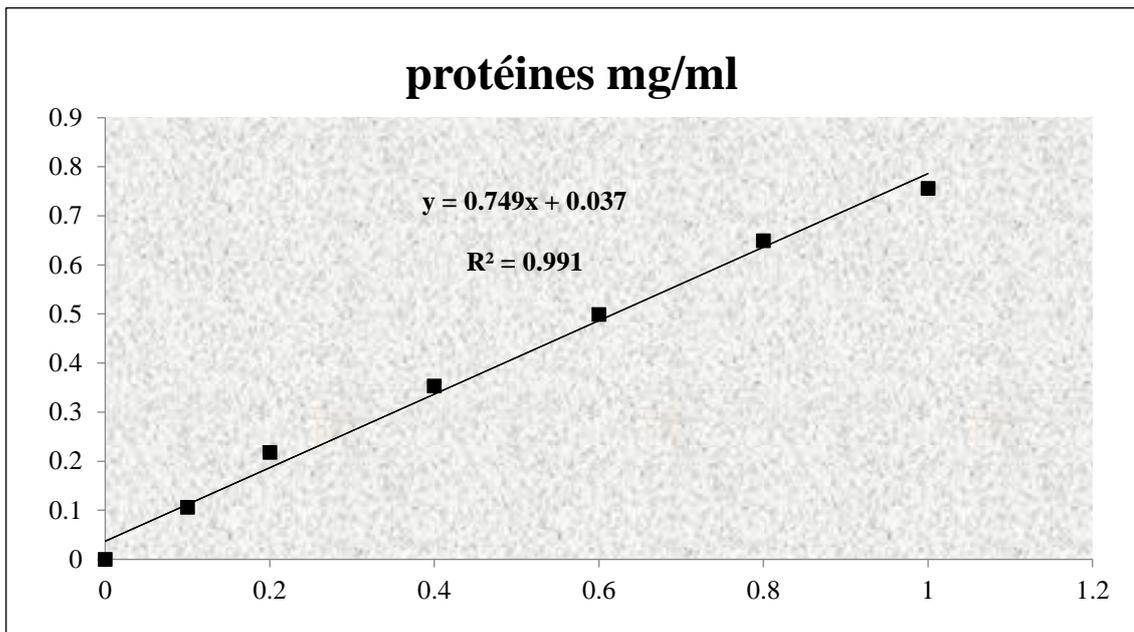
Annexe 1. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

1.2. Courbe d'étalonnage de la quercétine



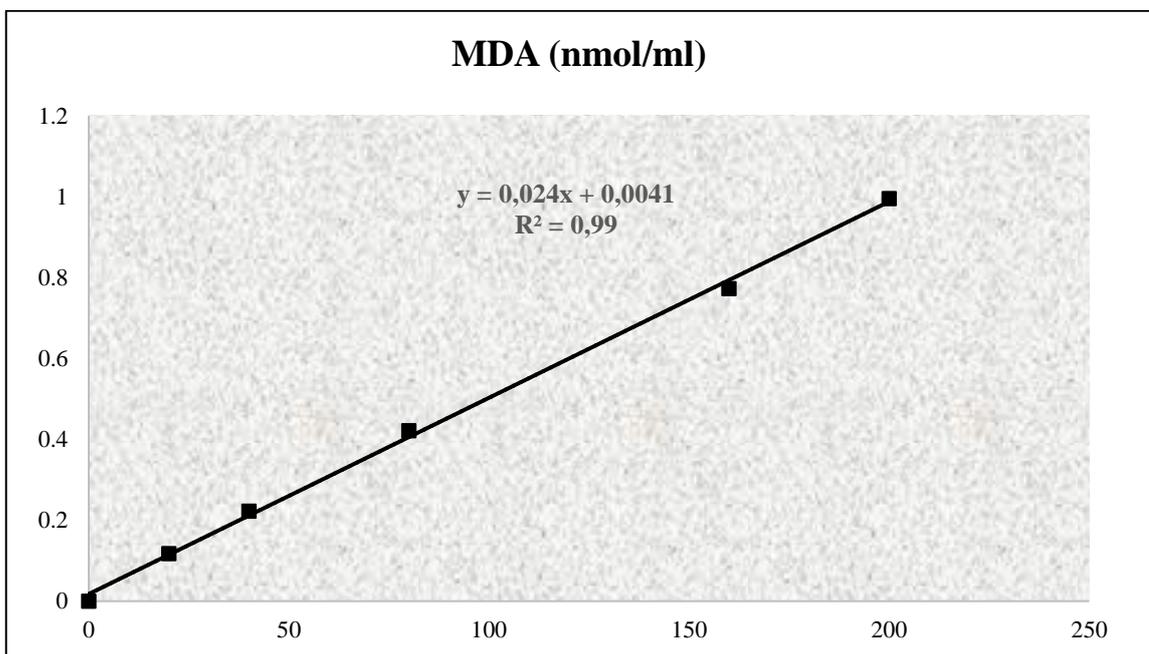
Annexe 2 . Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

1.3. Courbe d'étalonnage de protéines



Annexe 3. Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines.

1.4. Courbe d'étalonnage de l'MDA



Annexe 4. Courbe d'étalonnage de MDA.