



Democratic and Popular Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Larbi Tebessi University Tebessa
Faculty of Exact Sciences and Sciences of Life and Nature
Department of Applied Biology

Thesis presented in view of obtaining the LMD Master's degree

Field: Biological sciences

Option: Pharmacotoxicology

Entitled

**Assesment of nanoparticles of TiO_2 on
behavioral and nervous system statuts of Wistar
rats**

Presented by:

Gaidi Douaa

Board of Examiners:

Chair:	BOUCHIHA Hanane	MCA	Larbi Tebessi University
Supervisor:	ROUABHI Rachid	Professor	Larbi Tebessi University
Examiner:	DJERMANE Nadia	MCB	Larbi Tebessi University

Date of defence: 04/06/2023

Note:

Mention:

ملخص

ثاني أكسيد التيتانيوم مكون واسع الانتشار في الطبيعة ويستخدمه الإنسان على نطاق واسع كمادة مضافة للغذاء ، وأصبغ ومحفزات.

يتعلق هذا العمل بتقييم السمية المحتملة للجسيمات النانومترية لثاني أكسيد التيتانيوم (TiO₂) بجرعات مختلفة على الجهاز العصبي في جرذان ويستار والتي تتناسب تمامًا مع دراسات السمية لتقييم سمية مادة غريبة عن العضوية. تم تعريض الجرذان لـ 1.25 مل / كجم / يوم و 2.5 مل / كجم / يوم من ثاني أكسيد التيتانيوم خلال فترة معالجة مدتها 90 يومًا.

أجريت الدراسة لمدة 90 يومًا على 18 جرذ مقسمة إلى ثلاث مجموعات: (6) جرذان في كل مجموعة: (1) مجموعة شاهد ، (2) مجموعة تمت معالجتها بثاني أكسيد التيتانيوم (2.5 مل / كجم / يوم) ، (3) مجموعة عولجت بثاني أكسيد التيتانيوم (1.25 مل / لتر / كجم / يوم). الوزن النسبي للدماغ ، وتركيز المستقبلات الدماغية: البروتينات، الدهون والكربوهيدرات و أيضًا على العوامل الأنزيمية وغير الأنزيمية (GST ، GPx ، CAT ، GSH ، MDA) ومع الدراسات السلوكية تم استخدامها كمؤشرات حيوية للسمية العصبية.

كشفت الدراسة البيوكيميائية عن اضطراب في الجزيئات الكبيرة الرئيسية وهي: البروتينات والكربوهيدرات والدهون وهذا بالتوازي مع تثبيط نمو الجسم (نقصان الجسم والوزن النسبي).

فيما يتعلق بالأنشطة الأنزيمية ، تظهر نتائجنا أن ثاني أكسيد التيتانيوم يقلل من مستوى المؤشرات الأنزيمية (GST ، GPx ، CAT) ، بالنسبة للمؤشرات غير الأنزيمية أظهرنا زيادة في مستوى MDA ، وانخفاض في GSH.

من ناحية أخرى، قمنا أيضًا بتسليط الضوء على التغييرات في السلوك النفسي للجرذان والتي تجلت في حالات القلق واضطراب الذاكرة والتدريب.

تظهر نتائجنا أن وجود جسيمات بثاني أكسيد التيتانيوم المعدنية النانومترية يسبب اضطرابات مختلفة في المؤشرات الحيوية ؛ مما يؤكد الطبيعة السامة لجسيمات بثاني أكسيد التيتانيوم النانومترية بالجرعة المدروسة على الجهاز العصبي.

الكلمات المفتاحية: ثاني أكسيد التيتانيوم (TiO₂)، السمية ، الجرذان ، المؤشرات البيوكيميائية، MDA ، GPx ، GSH ... الخ.

Abstract

Titanium dioxide is a constituent widespread in nature and widely used by man as a food additive, pigments and catalysts.

This work concerns the evaluation of the potential toxicity of titanium dioxide nanoparticles (TiO_2) at different doses on the nervous system in Wistar rats which are perfectly suited to toxicological studies to easily assess the toxicity of a xenobiotic.

The rats were exposed to 1.25ml/kg/d and 2.5ml/kg/d of nano- TiO_2 during a treatment period of 90 days.

The study was carried out for 90 days on 18 rats divided into three groups (6 rats in each): (i) a control group, (ii) a group treated with titanium dioxide (2.5 ml/kg/day), (iii) a group treated with titanium dioxide (1.25 ml/kg/d). The relative weight of the brain, the concentration of encephalic metabolites: proteins, lipids and carbohydrates also on the enzymatic and non-enzymatic parameters (MDA, GSH, CAT, GPx, GST) and with behavioral studies have been used as biomarkers of neurotoxicity.

The biochemical study revealed a disturbance of the main macromolecules namely; proteins, carbohydrates, lipids and this in parallel with an inhibition of body growth (reduction of body and relative weight(

Concerning the enzymatic activities our results show that TiO_2 decrease the level of enzymatic activities (GST, GPx, CAT) for the non-enzymatic parameters we showed an increase in the level of MDA, the lipid peroxidation index, and a decrease in GSH.

On the other hand, we also highlighted changes in the psychic behavior of the rats which were manifested by cases of anxiety, disturbance of memory and learning.

Our results show that the presence of metallic TiO_2 nanoparticles causes various disturbances of biomarkers; which confirms the toxic nature of TiO_2 nanoparticles at the dose studied on the nervous system.

Keywords: TiO_2 , Toxicity, Rats, biochemical parameters, MDA, GPx, GSH...etc.

Résumé

Le dioxyde de titane est un constituant répandu dans la nature et abondamment utilisés par l'homme en tant qu'additif alimentaire, pigments et catalyseurs.

Ce travail concerne l'évaluation de la toxicité potentielle des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO_2) à des doses différentes sur le système nerveux chez les rats Wistar qui sont parfaitement adaptés aux études toxicologiques pour évaluer aisément la toxicité d'un xénobiotiques.

Les rats ont été exposés à 1.25ml/kg/j et 2.5ml/kg/j de nano- TiO_2 durant une période de traitement de 90 jours.

L'étude a été réalisée pendant 90 jours sur 18 rats répartis en trois groupes (6 rats dans chacun) : (i) un groupe témoin, (ii) un groupe traité par dioxyde de titane (2.5 ml/kg/J), (iii) un groupe traité par dioxyde de titane (1.25 ml/kg/J) .Le poids relatif du cerveau , la concentration des métabolites encéphaliques :protéines, lipides et glucides aussi sur les paramètres enzymatiques et non enzymatiques (MDA ,GSH, CAT,GPx,GST) et avec étude comportementales ont été utilisées comme biomarqueurs de neurotoxicité .

L'étude biochimique a mis en évidence une perturbation des principales macromolécules à savoir ; protéines, glucides, lipides et ce parallèlement à une inhibition de la croissance corporelle (réduction du poids corporelle et relatif).

Concernant les activités enzymatiques nos résultats montrent que TiO_2 diminuer le taux des activités enzymatique (GST, GPx, CAT) pour les paramètres non-enzymatiques on a montré une augmentation de taux de MDA, l'indice de peroxydation lipidique, et une diminution de GSH.

D'autre part Nous avons également mis en évidence des changements du comportement psychique des rats qui se sont manifestés par des cas d'anxiété, de perturbation de la mémoire et de l'apprentissage.

Nos résultats montrent que la présence des nanoparticules métalliques de TiO_2 provoque des perturbations diverses des biomarqueurs; ce qui confirme le caractère toxique des nanoparticules de TiO_2 à la dose étudiée sur le système nerveux.

Mots clés : TiO_2 , Toxicité, Rats, paramètres biochimiques, MDA, GPx, GSH...etc.



Remerciements

Je tiens à remercier plusieurs personnes pour leur aide et leur soutien lors de la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien constant, les conseils et l'assistance de mon encadrant Pr. ROUABHI Rachid je vous serai toujours reconnaissante pour l'effort et l'intérêt que vous avez investi dans ma formation et ma réussite.

Je tiens également à remercier les membres de jury pour leurs encouragements et leur contribution utile à la création de ce travail. Dr. BOUCHIHA Hanane et Dr. DJARMENE .Nadia ont tous deux contribué à faire de cette thèse une meilleure qu'elle ne l'aurait été si j'avais écrit sans leur aide

Ma plus profonde gratitude va à Mme Sara, doctorante à l'Université LAARBI TEBESSI, dont les précieux commentaires et encouragements ont grandement influencé la manière dont j'ai mené mes expériences.

Je tiens à remercier la Faculté de Biologie de l'Université LAARBI TEBESSI de m'avoir fourni toutes les ressources nécessaires pour poursuivre mes études.

À tous mes professeurs, amis, camarades de laboratoire et collègues, tous sont appréciés pour les moments de plaisir que nous avons passés à travailler ensemble. Je voudrais également remercier tous ceux qui ont été là pour moi émotionnellement et intellectuellement pendant que je travaillais sur mes études.



Dédicace

Louange à Dieu, qui ma donnée la force pour accomplir ce modeste travail. Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon respect, mon amour, ma reconnaissance... C'est, ainsi, tout simplement que... Je dédie ce travail a

À la douce mémoire de ma mère Nabila qui est décédée subitement en juin 2016. Elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde. Indescriptible à quel point j'aimerais qu'elle soit encore avec moi.

Pour mon cher père Ammar, vous avez été ma source d'inspiration, de soutien et de conseils.

A ma seule sœur DOUNIA Merci pour ton amour éternel et tes chaleureux encouragements. Sans vous, je ne pourrais pas surmonter mes difficultés et me concentrer sur mes études.

A mes frères Ishak Idriss Yaakoub Elyassie pour leur soutien et leur amour éternels.

A toute ma famille pour leur soutien indéfectible. S'il n'y avait pas eu toutes vos prières et bénédictions; sans votre amour et votre aide sincères, je n'aurais jamais terminé cette thèse.

Alors merci. À tous mes amis, votre amitié fait de ma vie une expérience merveilleuse. Je ne peux pas énumérer tous les noms ici, mais vous êtes toujours dans mon esprit.



Douaa



Liste des abréviations

ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ca ⁺	calcium
CAT	Catalase
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CL50	Concentration létal 50
CO ₂	Dioxyde de carbone
DDT	Dichloro-diphényl-trichloro-éthane
DL50	Dose mortel 50
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman.
EOA	Espèces Oxygénées Activées
ERN	Espèces Réactives de l'Azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydée
GST	Glutathion-S-transférase
H	hydrogène
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HCH	Hexachloro-cyclo-hexane
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
MDA	Acide Malon-dialdéhyde
mg	Milligramme
mmol	Milimole
NADPH	Nicotinamide-adéninedinucléotide-phosphate réduit.
O ₂ •-	Radical superoxyde (anion superoxyde)
OH•	Radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
RL	Radicaux Libres
SN	Système nerveux
SNC	Système Nerveux Central

SNP Système Nerveux Périphérique
SOD Super oxyde-dismutase
TiO₂ Oxyde de titane
T Témoin
TBA L'acide thiobarbiturique
TCA Trichloracétique.
TCP trichloro pyridinol
TMB 3,3', 5,5' Tetraméthylbenzidine
UI Unité international
UV Ultr

Liste des tableaux

Figure N°	Titre	Page N°
01	Tableau récapitulant les différentes applications du TiO ₂ .	17
02	Principales espèces réactives oxydantes (ERO) organiques Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.	33
03	Variation de poids corporel chez les différents groupes expérimentaux.	57
04	Variation de poids relatif chez les différents groupes expérimentaux.	58
05	les variations du temps passé dans le box noir et avec la lumière chez les rats témoins et traités avec deux doses différentes (0.5mg/kg/jour)	67
06	Concentration de Bilirubine urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.	69
07	Moyenne et écart-types des paramètres de la Formule de Numérotation Sanguine des rats témoins et traités par nano- TiO ₂ avec différentes doses	70

Liste des figures

Figure N°	Titre de figure	Page N°
01	Schéma représente des formes des nanoparticules(A) Les nanotubes (B) Nanoparticules sphériques	5
02	Mécanismes d'action des nanoparticules (NPs) manufacturées	6
03	structure de l'anatase	13
04	structure du Brookite	14
05	structure du rutile	14
06	Les structures cristallines du TiO ₂ anatase (a), rutile (b) et brookite (c)	15
07	Structure d'un neurone	22
08	Structures et formes des cellules gliales	23
09	Mode de transmission des signaux nerveux	24
10	Variation du potentiel électrique du cytoplasme d'un axone par rapport à l'extérieur, et origine de la dépolarisation	31
11	Mécanisme de la transmission synaptique de l'influx nerveux	28
12	Difference between a normal brain and an atrophy brain (Alzheimer's disease)	28
13	Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.	30
14	Cascade d'activation de Nox2 et formation d'anion superoxyde	31
15	Chaine de réactions lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique	32
16	La peroxydation lipidique non enzymatique	34

17	Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation »	35
18	Répartition des principales défenses antioxydants dans la cellule	36
19	rats mâles Rattus rattus de la souche Wistar	40
20	dioxyde de titane TiO ₂	41
21	photo représente les conditions d'élevage des rats.	42
22	le gavage intragastrique a l'aide d'une sonde	43
23	Mesure du poids chez les rats	44
24	Les instruments du test de Piscine de Morris	46
25	Sacrifice et prélèvement de cerveau	48
26	protocole de dosage (Protéines, Lipides, Glucides)	50
27	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	56
28	Changements des poids corporels chez les rats témoins et traités par TiO ₂ , après 90 jours de traitement	57
29	Changements des poids relatif chez les rats témoins et traités par TiO ₂ , après 90 jours de traitement	58
30	Variation de la teneur de cerveau en glucides chez les rats témoins traités par TiO ₂ apres90 jours de traitement	59
31	Variation de la teneur de cerveau en lipides chez les rats témoins traités par TiO ₂ apres90 jours de traitement	60
32	Variation de la teneur de cerveau en protéines chez les rats témoins traités par TiO ₂ apres90 jours de traitement	60
33	Variation du taux de MDA chez les rats témoins après 90 jours de traitement	61
34	Variation du taux de GSH chez les rats témoins après 90 jours de traitement	62
35	Variation du taux de CAT chez les rats témoins après 90 jours de traitement	62
36	Variation du taux de GSTchez les rats témoins après 90 jours de traitement	53

37	Variations du temps rearing enregistré chez les rats témoins et traités après 90j de traitements	64
38	Variations du temps passé dans la piscine de Morris (s) chez les rats témoins et traités après 90j de traitements	65
39	Variations du temps passé dans le box noir (test Dark-Light) chez les rats témoins et traités après 90j de traitements	66

Tables Des Matières

Contenu

ملخص	2
Abstract	3
Résumé.....	4
<i>Remerciements</i>	5
<i>Dédicace</i>	6
Liste des abréviations.....	7
Liste des tableaux	9
Liste des figures.....	10
Tables Des Matières.....	13
Introduction	18
Chapitre I.....	21
Les nanoparticules	21
1. Définition des nanoparticules	4
2. Description des nanoparticules	5
3. L'origine des nanoparticules	5
3.1. Les nanoparticules d'origine naturelle	5
3.2. Les nanoparticules d'origine anthropique.....	6
3.2.1.Nanoparticules non manufacturées	6
3.2.2. Nanoparticules manufacturées	6
4. Caractéristiques des nanoparticules	6
5. Mécanismes d'action des nanoparticules	7
6. Propriétés des nanoparticules	8
7. production des nanoparticules	9
8. Détection des nanoparticules dans l'environnement.....	10
9. Utilisation et Recherche sur les nanoparticules	11
10. Impacts des nanoparticules	11
11. Nanoparticules d'oxydes de titane (TiO ₂)	12
11.1. Définition d'oxydes de titane.....	12
11.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de titane	12

11.3. Propriétés structurales de dioxyde de titane.....	12
11.3.1-a Structure cristalline de L'anatase	13
11.3.2-b Structure cristalline de brookite	13
11.3.3 Structure cristalline de rutile	14
11.4. Propriétés physiques.....	15
11.5. Propriétés chimiques de dioxyde de titane.....	15
12. Toxicocinétique	16
12.1. Absorption	16
12.1.1. Absorption broncho-pulmonaire.....	16
12.1.2. Absorption cutanée	16
Absorption gastro-intestinale	4
12.2. Distribution.....	4
12.3. Elimination.....	4
13. Utilisation et applications d'oxyde de titane.....	3
14. Cytotoxicité des nanoparticules de dioxyde de titane	3
14.1. Etudes de survie/prolifération cellulaire	3
14.2. Stress oxydant	3
14.3. Réponse inflammatoire.....	3
14.4. Internalisation cellulaire	3
Chapitre II	3
Neurotoxicité.....	3
I. Généralités sur neurotoxicité.....	20
1.1. Histologie du cerveau	20
1.2. Physiologie du cerveau	21
2.2 Neurotransmetteurs	26
3. Majeurs pathologies neuronaux	28
I. Généralités sur le stress oxydant.....	30
1. Les Sources des radicaux libres:	30
1.1. Les radicaux libres	30
1.2. Effets des radicaux libres sur l'organisme	33

1. 2.1. Les cibles lipidiques:	33
1. 2.2. Les cibles non lipidiques.....	34
1.2.3. Oxydation des protéines.....	34
1.2.4. Oxydation des glucides	35
1.2.5. Oxydation de l'ADN	36
2. Les défenses antioxydants	36
2.1. Mécanisme d'action des antioxydants.....	37
2.2. Système antioxydant enzymatique	37
2.2.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	37
2.2.2. Glutathion peroxydase (GPx)	37
2.2.3. Les catalyseurs (CAT)	38
2.3. Système antioxydant non enzymatique	38
2.3.1. Glutathion(GSH)et les protéines-thiols	38
2.3.2. La vitamine C.....	38
2.3.3. La vitamine E	39
2.3.4. Les oligoéléments.....	39
2.3.5. Ubiquinones et cytochrome c	39
3. Les conséquences biologiques du stress oxydant	40
Partie	31
Pratique	31
I-Matériel et Méthodes.....	40
I-1-Matériel	40
1.1.1. Les animaux de laboratoire.....	40
1.1.2. Produits chimiques	41
I.2. Méthode.....	41
1.2.1. Entretien des animaux.....	41
1.2.2. Choix des doses et préparation du TiO ₂	43
1.2.3. Répartition et traitement des rats.....	43
1.3. Evaluation de la neurotoxicité de dioxyde de titane.....	44
1.3.1 .Mesure de poids.....	44
Figure 23 : mesure du poids chez les rats.....	44
1.3.2 Etude neurocomportementale	45
I.4. Etude de la toxicité de TiO ₂	48

I .4.1. Sacrifice et extraction du cœur	48
I .4.2. Détermination de la Formule de Numérotation Sanguine	49
I .5.Evaluation des paramètres biochimiques	49
I .5.1. Dosage des glucides	49
I .5.2. Dosages des lipides	49
I .5.3. Dosage des protéines	50
I.6.Evaluation des paramètres de stress oxydatif	51
I .6.1.Dosage du MDA :.....	51
I .6.2. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)	52
I .6.4. Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de (Weckbeker et Cory, 1988).....	53
I .6.5. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)	54
I .6.6. Dosage de l'activité Catalase □CAT□	55
Résultats	57
1. Effet du TiO ₂ sur les paramètres de la croissance globale des animaux.....	57
1.1 Poids corporel	57
1.2. Poids relatif du cerveau (PRP)	58
2.1. Effet sur le taux des glucides	59
2.2. Effet sur le taux des lipides.....	59
2.3. Effet sur le taux des protéines	60
3. Effet du TiO ₂ sur les paramètres de stress dans le cerveau chez les rats	61
3.1. Effet sur les paramètres non enzymatiques.....	61
3.1.1. Effet sur la teneur en MDA	61
3.1.2. Effet sur le taux de GSH	61
3.2. Effet sur les paramètres enzymatiques	62
3.2. 1.Effet sur l'activité de GPx	62
3.2.2. Effet sur l'activité de Catalase.....	63
3.2.3. Effet sur le taux de GST.....	63
4. Effets de nanoparticule de dioxyde de titane sur le neurocomportemental chez le rat	64
4.1. Effet sur le Test de «Open Field ».....	64
4. 2.Effet sur le test de Piscine de Morris.....	66
4. 3. Effet sur le test de Dark –Light.....	66

5. Evaluation des paramètres biochimiques (urée ; créatinine ; Bilirubine).....	68
6. Effet des nano- TiO ₂ la FNS.....	69
6.1. Effet sur le taux des globules blanc.....	69
6.2. Effet sur le pourcentage des lymphocytes	69
6.3. Effet sur le pourcentage des granulocytes	69
6.4. Effet sur le taux des globules rouges.....	70
6.5. Effet sur le pourcentage de l'Hématocrite(HCT).....	70
6.6. Effet sur le taux de des plaquettes.....	70
1. Effets de dioxyde de titane sur les paramètres de la croissance globale.....	73
2. Effet des nanoparticules d'oxyde de titane sur les paramètres biochimiques au niveau de cerveau	74
3. Les paramètres de stress oxydatif(Enzymatique et non enzymatique) :.....	75
Conclusion.....	40
Références	41
Annexes.....	49

Introduction

Depuis plusieurs années, il y a un intérêt croissant dans la recherche en nanotechnologie, qui se concentre sur les particules qualifiées de particules ultrafines dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nanomètres encore appelé nanoparticules (NPs) (**Baratli, 2015**).

Leur intérêt repose sur les caractéristiques intrinsèques des nanoparticules, quand leur faible dimension, leur confère des propriétés physico-chimiques, En raison de leur petite taille, les nanoparticules peuvent se localiser dans des vésicules à l'intérieur des cellules et peuvent également atteindre des cibles cellulaires, et provoque des effets nocifs (**Bettini, et al., 2014**).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanoparticules dioxyde de titane TiO_2 qui se trouvent dans la croûte terrestre sous trois formes cristallines (anatase, rutile, brookite), Il est majoritairement utilisé comme pigment blanc et additif dans les aliments (**Bettini, et al., 2014**)

A l'heure actuelle, on parle beaucoup des nanotechnologies dans l'actualité scientifique, et le cas du dioxyde de titane est particulièrement intéressant et passionnant puisque ses propriétés autant que ses dangers sont, aujourd'hui, mis à l'épreuve. De plus les questions de développement durable et d'écologie sont de plus en plus à la mode, et le dioxyde de titane a des propriétés propres à première vue. La toxicité des nanoparticules de TiO_2 est un sujet de recherche en pleine expansion depuis les années 2000. Le nombre d'articles publiés sur le sujet chaque année ne cesse de croître et a dépassé en 2014 les 550 références, pour un total de 2 975 articles depuis 1996, Les principaux mécanismes de toxicité rapportés sont liés à l'inflammation, au stress oxydant et à la génotoxicité (**Boland, et al., 2014**).

De nombreuses études antérieures ont montré que les nanoparticules sont toxiques pour l'organisme animal tant en exposition aigue qu'en chronique à de faibles doses, en provoquant une neurodégénérescence des cellules du cerveau, le dysfonctionnement de l'activité locomotive, l'apprentissage et la fonction de mémorisation (**El Hassani et al., 2008**). Cette étiologie est assurée par l'accumulation de ces substances toxiques, souvent lipophiles, dans les fractions lipidiques de l'organisme notamment le cerveau qui est considéré comme étant un organe riche en lipide. En effet, le cerveau est le plus grand consommateur d'énergie

d'où la production intense des radicaux libres. Cette évidence explique l'importance du cerveau dans le corps.

Le stress oxydant est devenu un phénomène d'actualité, en effet, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par ce concept qui est, de nos jours, jugé, comme une situation physiologique impliquée dans la plupart des maladies humaines.

Le stress oxydant correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire. Il se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre du rapport entre les radicaux libres et les systèmes de défense antioxydants dont dispose la cellule, avec comme conséquence l'apparition des dégâts souvent irréversible pour la cellule (**Pincemail et al., 2002**).

De nombreux xénobiotiques, tels que les nanoparticules, peuvent causer un stress oxydatif conduisant à la génération de ROS et l'altération des antioxydants ou les piègeurs des radicaux d'oxygène libres dans les systèmes enzymatiques des organismes. Les ROS, comme les radicaux des ions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le très réactif radical hydroxyle (OH) peuvent réagir avec les macromolécules biologiques sensibles (**Livingstone, 2001 ; Nordberg and Arnér, 2001 ; Shi et al., 2005**).

Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que TiO_2 induit la neurotoxicité. Par conséquent, l'objectif de notre travail est l'étude de l'effet toxique de nanoparticule oxyde de titane TiO_2 au niveau de système nerveux chez les rats qui sont parfaitement adaptés à l'étude toxicologique pour évaluer aisément la toxicité de xénobiotique.

Pour atteindre l'objectif de cette présente étude, nous allons examiner les données bibliographiques permettant une analyse plus poussée des travaux réalisés récemment afin de révéler l'état de l'art de la problématique posée dans cette étude. Ensuite, des méthodes expérimentales d'approches, tant biochimiques et neurocomportementales, seront appliquées conformément aux orientations de la signalisation cellulaire et de la biologie neurocomportementale, et aussi par les aspects oxydo-réductifs cellulaires et leurs implications sur l'intégrité structurales et moléculaire des cellules du cerveau.

Partie bibliographie

Chapitre I

Les nanoparticules

I. Généralité

Chaque semaine, de nouveaux produits utilisant des nanoparticules sont introduits sur le marché dans le domaine croissant de la nanotechnologie (**Ostiguy et al., 2010**).

Afin d'obtenir des propriétés optiques, électroniques ou magnétiques uniques, novatrices et commercialement précieuses, ils définissent de manière cohérente la taille et la forme des matériaux à l'échelle atomique (en nanomètres). (Masaya et al., 2002). Cependant, il est évidemment préoccupant que ces caractéristiques puissent entraîner de nouveaux comportements lors de l'interaction avec les êtres vivants et éventuellement de nouveaux effets toxiques.

Le terme «nanoparticule» est maintenant passé dans le langage courant mais revêt toujours un certain mystère. Cela provient d'une part des interrogations sur la toxicité ou au contraire sur les applications potentielles de ces objets mais également du flou autour de leur constitution. Concernant leur taille, les nanoparticules se situent entre les clusters composés de seulement quelques atomes et les particules micrométriques, tant décriées en périodes de forte pollution (**Pierre, 2016**). Les nanoparticules sont constituées essentiellement d'atomes « de surface » du fait de leur petite taille et de leur réactivité (**Patrick, 2015**). Ils peuvent se présenter sous la forme de particules, fibres ou tubes (on parle de charges ou renforts), de couches minces ou de constituants structurels (**Eric, 2008**).

En raison de leur petite taille, les nanoparticules peuvent présenter un risque pour la santé.

Les nanoparticules ont une taille qui les place entre la matière macroscopique et l'échelle moléculaire, elles sont dangereuses pour l'organisme, car elles sont plus petites que nos cellules. Elles sont si petites qu'elles traversent notamment sans difficulté la barrière encéphalique chez les humains (**Malinski, 1998**).

1. Définition des nanoparticules

Les nanoparticules, également appelées particules ultrafines, sont des molécules dont la taille varie entre 1 et 100 nanomètres (1 nm ou 10^{-9} m) (**Lucie, 2011**) Ils sont donc plus grands que les atomes et plus petits que les cellules. Il est possible de distinguer entre les nanoparticules «élaborées» qui sont fabriquées artificiellement et les émissions accidentelles qui sont des sous-produits d'une réaction, telles que la fumée de cigarette ou les émissions de diesel. (**Masaya et al., 2002**).

Les nanoparticules artificielles sont fabriquées soit par fractionnement d'un matériau massif (approche descendante), soit par agglomération d'atomes (approche ascendante). Elles se présentent sous la forme de poudres, de gel ou de solutions. Leur intérêt réside dans leur taille qui leur confère des propriétés physico-chimiques inédites. Une même molécule peut d'ailleurs être inactive à l'échelle microscopique (6-10m), et devenir très efficace à l'échelle nanoscopique (**Malinski, 1998**).

Il existe des nanoparticules de n'importe quel matériau, y compris le carbone, la céramique, le métal, etc. On ne peut donc pas parler de façon générique des nanoparticules

Chacun a des qualités uniques, en particulier en termes de toxicité et de pénétration. (**Malinski, 1998**). Ils sont utilisés à la fois en tant que tels (en tant que catalyseurs pour les réactions chimiques, porteurs pour les médicaments pour atteindre les cellules cibles, pour le polissage dur des vapeurs et des disques dans la microélectronique, etc.) et comme moyen de production de matériaux dans une variété de domaines, y compris: électroniques, cosmétiques, voitures, ordinateurs, textiles, pharmacies, agrochimiques et optiques. (**Malinski, 1998 ; Eric, 2008**).

Les nanoparticules peuvent représenter un risque pour la santé à cause de leur petite taille. Les nanoparticules ont une taille qui les place entre la matière macroscopique et l'échelle moléculaire, elles sont dangereuses pour l'organisme, car elles sont plus petites que nos cellules. Elles sont si petites qu'elles traversent notamment sans difficulté la barrière encéphalique chez les humains (**Malinski, 1998**).

2. Description des nanoparticules

La totalité des nanoparticules peut être décrite selon de nombreux facteurs :

- Leur source : naturelle ou anthropique.
- Leurs dimensions et formes : objets à 1, 2 ou 3 dimensions nanométriques.
 - Une dimension : films ou couches minces.
 - Deux dimensions : nanotubes, nano filaments.
 - Trois dimensions: fullerènes, nanoparticules sphériques ou autres formes géométriques à 3D.

Leur composition chimique comprend les particules carbonées, organiques, métalliques, sulfates, nitrates, céramiques, polymères, etc (CPP, 2006).

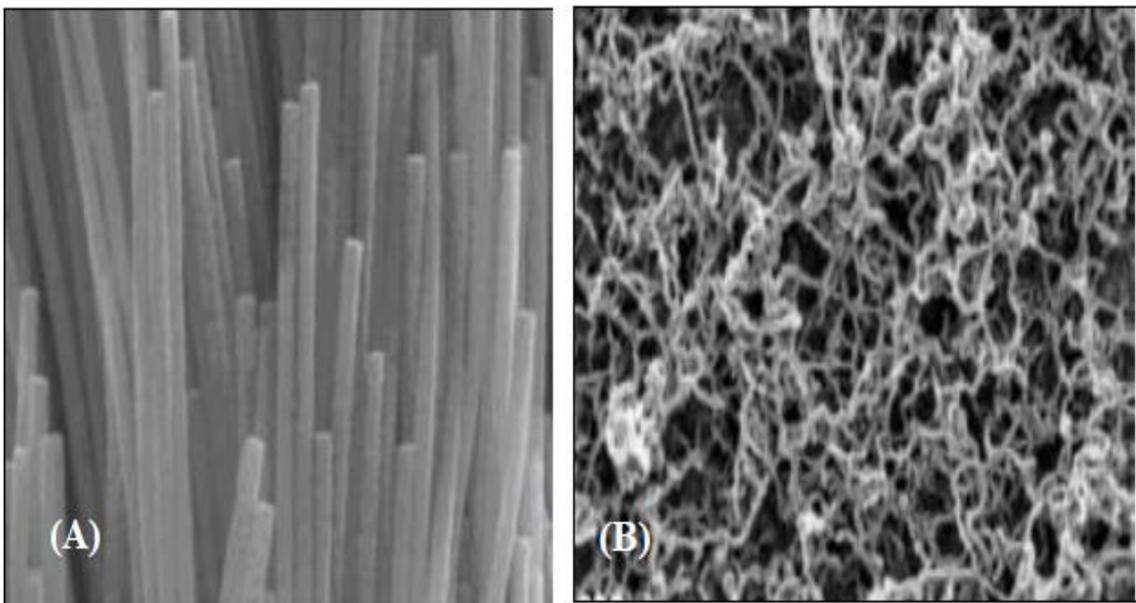


Figure 01. Schéma représente des formes des nanoparticules(A) Les nanotubes (B) Nanoparticules sphériques (Masaya, 2002).

3. L'origine des nanoparticules

On distingue plusieurs types d'origine pour les nanoparticules :

3.1. Les nanoparticules d'origine naturelle

Ils sont causés par une variété de phénomènes, tels que la condensation des gaz atmosphériques, ainsi que l'activité volcanique, les feux, les marées et l'érosion (Lucie, 2011).

3.2. Les nanoparticules d'origine anthropique

Produits du fait des activités humaines (**Lucie, 2011**). Ils peuvent eux-mêmes être divisés en catégories :

3.2.1. Nanoparticules non manufacturées

Ils peuvent avoir une origine non intentionnelle et peuvent être produits par des processus industriels, la combustion des moteurs et des techniques de traitement des métaux constituent une part importante de l'aérosol atmosphérique produit lors de la combustion, qui se compose principalement de carbone non brûlé et d'impuretés provenant du tabac, des moteurs diesel, de la biomasse, et des réactions atmosphériques "gas-solides" telles que la condensation du gaz de radon et autres gaz radioactifs (**Masaya et al., 2002**).

3.2.2. Nanoparticules manufacturées

Produits qui sont principalement destinés à être utilisés. Cette étude se concentrera plus spécifiquement sur ce type de nanoparticules (**Lucie, 2011**).

Les nanoparticules métalliques manufacturées (NPs) sont des polluants émergents dont la concentration augmente dans les sols en raison de leur utilisation croissante dans de nombreux produits commerciaux de la vie courante (**Marie, 2015**). Des études in vitro ont montré la toxicité des NPs pour les microorganismes, mais il existe encore peu de données sur l'écotoxicité et le devenir de ces contaminants dans les sols (**Marie, 2015**). Ils ont taille et forme contrôlées pour remplir une fonction métaux, semi-conducteurs, oxydes métalliques, carbone, polymères composites céramiques, différentes formes : nanosphères, fils, aiguilles, tubes, anneaux, plaquettes, Molécules (fullerènes) et complexes agrégats moléculaires ou atomiques, non traités ou enrobés (nanotechnologie appliquée à de nombreux produits : cosmétiques, médicaments, peintures, textiles, électronique, afficheurs, etc...) (**CPP, 2006**).

4. Caractéristiques des nanoparticules

Toutes les grandes familles de matériaux sont incluses, y compris les métaux, les céramiques, les charbons, les polymères et les silicates. Ils ont caractéristiques différentes par rapport aux mêmes matériaux à l'échelle macroscopique ou micrométrique, ainsi que concerne de très nombreux secteurs industriels pour de multiples applications dont certaines sont en phase de production industrielle :

- Nanotubes de carbone 100 fois plus résistants et 6 fois plus légers que l'acier.
- Nanoparticules de titane (cosmétiques).
- Nanoparticules de silice (pneumatiques) (**AFSSET, 2006**).

5. Mécanismes d'action des nanoparticules

L'entrée des NPs dans la cellule se fait généralement par un processus d'endocytose classique et elles vont se retrouver dans le compartiment cellulaire dans des vésicules entourées d'une membrane. Les NPs pénètrent donc dans la cellule « masquées » par les protéines et autres molécules biologiques qu'elles ont adsorbées et qu'elles transportent. Cette entrée déclenche une cascade d'événements moléculaires qui peut être à l'origine de la toxicité et de la mort cellulaire ou de réponses adaptatives telles que la réponse pro-inflammatoire, l'activation des enzymes antioxydantes, les processus de réparation, les effets sur le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération. Ces événements sont directement ou indirectement associés à l'internalisation des NPs, leur persistance au niveau cellulaire, leur capacité à libérer des radicaux libres et d'induire un stress oxydant. En effet, une réponse qui est commune à un grand nombre de NPs manufacturées est la production directe ou indirecte de radicaux libres associée à la taille, la composition chimique et à la réactivité de surface des NPs (**Nel, 2009**) Quand elle n'est pas contrôlée par les systèmes de protection de la cellule, enzymes ou petites molécules antioxydantes, elle conduit au stress oxydant. Le niveau de production de radicaux libres serait à l'origine d'une réponse par étape. À un niveau mineur la protection anti-oxydante est activée, quand la production de radicaux libres atteint un niveau plus important elle induit une réponse inflammatoire niveau très élevé les dommages cellulaires peuvent conduire à la mort par nécrose ou apoptose (**Marano, 2011**).

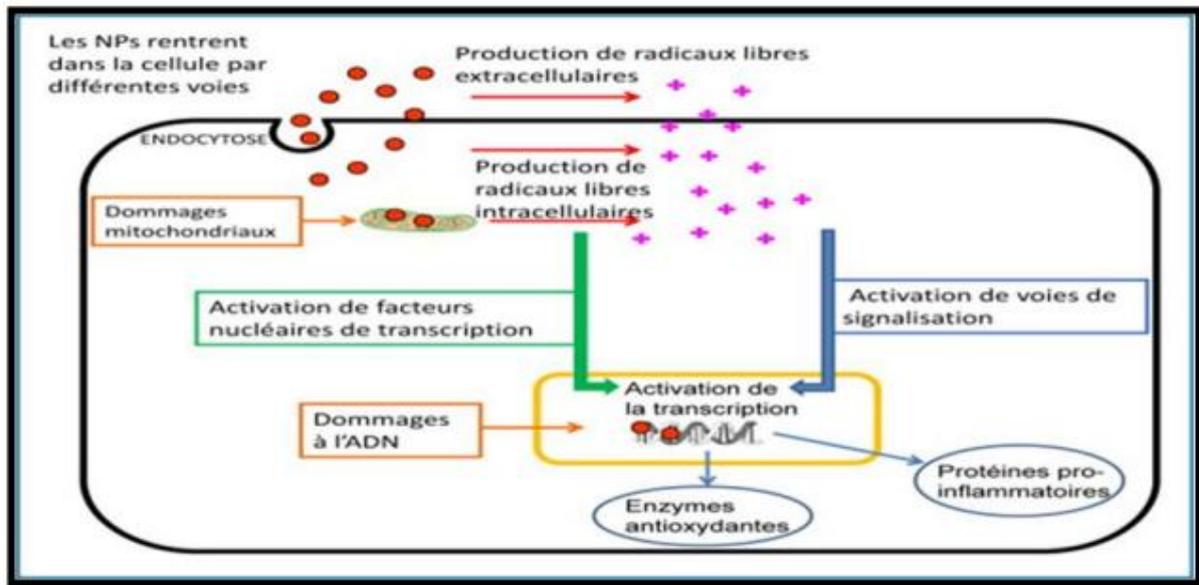


Figure 02: Mécanismes d'action des nanoparticules (NPs) manufacturées, (Marano F ,2011).

En particulier les NPs métalliques peuvent entrer dans la cellule par endocytose, produire des radicaux libres extracellulaires ou/et intracellulaires, activer des voies de signalisation et des facteurs de transcription, agir sur la transcription de divers gènes. Cela peut conduire à la synthèse d'enzymes antioxydantes et de protéines pro-inflammatoire. Le stress oxydant peut être à l'origine de dommages à l'ADN.

6. Propriétés des nanoparticules

Parmi les principales propriétés des nanoparticules ; les propriétés biologiques dont leurs réactivité chimique est susceptible d'être fortement modifiée lorsqu'ils sont comparés à leurs pendants de taille micrométrique ou supérieure. Le nombre d'atomes en surface du nano-objet est fortement supérieur à l'état nanométrique comparé à l'état micrométrique (Faklaris et al.,2009 ; Ophélie, 2008). La Réactivité en particulier chimique dépend de sa surface. Les autres propriétés des NP sont :

- Composition chimique du coeur de la NP (exemple : TiO_2) et cristallinité (exemple: rutile/anatase).
- Enrobage : fonctionnalité chimique de surface (exemple : $-\text{COOH}$, polyéthylène glycol, etc.), couronne protéique, qui reflète les milieux biologiques traversés par la NP, et/ou nature et densité des éventuels ligands.

- Taille, forme et surface spécifique, surface d'échange responsable de la réactivité, mesurée en m²/g, qui augmente notamment avec la rugosité et la porosité du matériau.
- Charge de surface, qui dépend du pH du solvant dans le cas d'une suspension colloïdale.
- Etat d'agrégation/agglomération (**Bruinink et al., 2015 ; Fu et al., 2014 ; Rauch et al., 2013**).

7. production des nanoparticules

Les méthodes actuelles pour la production de nanoparticules synthétiques comprennent: Agglutination des atomes (bottom-up) ou des matériaux de dégradation, y compris

➤ Synthèse chimique

- En phase vapeur (carbures, nitrures, oxydes, alliages métalliques, etc.).
- En phase liquide (la plupart des métaux et oxydes)
- En milieu solide (la plupart des métaux et oxydes).
- En milieu mixte (sol-gel, pour la plupart des oxydes).

➤ Synthèse par des méthodes physico-chimiques.

- Par évaporation/condensation (sous pression partielle inerte ou réactive) pour (Fe, Ni, Co, Cu, Al, oxydes).
- Par pyrolyse laser (Si, fullerènes, suies carbonées, etc.).
- Par flammes de combustion, les particules étant récupérées dans les vapeurs, fumées et Sous micro-ondes (Ni, Ag).
- Par irradiation (ionique ou électronique), par exemple pour produire des nanopores. Dans un matériau de dimensions macroscopiques ou pour produire une nanostructure intégrée dans une matrice).
- Par recuit à basse température (alliages métalliques et intermétalliques complexes avec trois à cinq éléments à base de (Al, Zr, Fe.).

➤ **Synthèse par méthodes mécaniques**

Mécano synthèse et activation mécanique dans le domaine de la métallurgie des poudres (ex: broyage à haute énergie pour tout type de matériaux (métalliques, céramiques, polymères, semi-conducteurs).

➤ **Synthèse par méthodes biologiques**

Production expérimentale de molécules organiques par des OGM (organismes génétiquement modifiés) (CPP, 2006 ; Marois, 2005 ; INRS, SD).

8. Détection des nanoparticules dans l'environnement.

➤ **Détection dans l'air**

Le plus difficile est de séparer les neuropeptides (NPs) qui se produisent réellement et créés de manière trompeuse en les mesurant presque ou pour la plupart. Un autre type d'estimation est le suivi (vérification du NP passé), qui est utilisé de temps en temps et nécessite une procédure flexible. (CPP, 2006 ; AFSSET, 2006).

➤ **Détection dans l'eau**

Mesures en labo ou au niveau de la production Difficultés en milieu naturel (CPP, 2006 ; AFSSET, 2006).

➤ **Détection dans le sol**

Par rapport à l'eau, une plus grande hétérogénéité du NP rend difficile de quantifier et d'identifier la quantité de NP fabriquée utilisée. Les avantages des nanomatériaux sont les suivants :

- Une fonction autonettoyante ou adhésive sur une surface augmenter la dureté d'un matériau.
- Améliorer la résistance au frottement.
- Améliorer la qualité des textiles.

Elles sont présentes dans les secteurs du bâtiment, de l'automobile, des cosmétiques, de la production énergétique, du textile, des produits chimiques et environnementaux, ainsi que dans les domaines de la chimie, la cosmétique et de la santé.

9. Utilisation et Recherche sur les nanoparticules

Les applications potentielles de la nanotechnologie couvrent un large éventail de domaines :

Les économies d'énergie des véhicules de transport, le développement des énergies renouvelables, la réduction des pollutions, la filtration de l'eau potable, les matériaux de construction, les applications médicales, la cosmétique, la pharmacie, les technologies de traitement de l'information, l'optique, les textiles, le marquage, les peintures, les encres, etc. (CPP, 2006). Ainsi, il est possible d'anticiper une augmentation rapide de l'utilisation des nanoparticules dans un large éventail de secteurs (Sylvie, 2015). On peut donc s'attendre à un développement rapide de l'usage des nanoparticules dans un grand nombre d'industries (Sylvie, 2015), notamment dans l'agro-alimentaire, l'automobile et tous les domaines prédominant. Les plus grandes utilisations industrielles actuelles sont liées à la fabrication des pneumatiques (oxyde de silicium) et pour la formulation des cosmétiques, avec une consommation dépassant 1000 tonnes par an (principalement d'oxyde de titane). Les autres usages actuels semblent ne pas dépasser chacun 10 tonnes par an, mais sont promis à une forte croissance (CPP, 2006). Dans le cas contraire que l'Homme cherche à former des nanomatériaux, c'est parce qu'ils montrent exceptionnellement curieusement des caractéristiques à un niveau mécanique et ouvrent des voies d'entrée à un large éventail d'applications (Christophe, 2015).

10. Impacts des nanoparticules

Avec les nanomatériaux, Il est possible de rester généralisé. Ils doivent être vérifiés cas par cas, élément par élément, utilisé par utiliser. En fonction de la définition et de la grille dans laquelle elle est jointe, chaque nanomatériau assure une réactivité et un comportement divers (Sylvie, 2015). Mais les études toxicologiques démontrent clairement que la très petite taille des nanoparticules est un élément-clé au niveau de la toxicité, surtout au niveau des particules non ou peu solubles (Ostiguy et al. 2006). Leur influence est trop susceptible de changer en fonction de leur caractère hydrophile, lipophile, de leur charge électrique, leur propension à agglutiner ou non qui va ou ne peut pas avancer leur entrée des frontières organiques (cellulaire, peau, muqueuses, poumon, intestin, barrière hémato encéphalique, placentaire, etc.) (Ostiguy et al., 2006 ; Chouly et al., 1996).

11. Nanoparticules d'oxydes de titane (TiO₂)

11.1. Définition d'oxydes de titane

L'oxyde de titane appartient à la famille des oxydes métalliques de transition (**Mahmoudi, 2014**). Il est composé de titane et d'oxygène (**Jean, 2015**). Il est utilisé comme une couleur blanche dans la peinture, le plastique et le papier, ainsi qu'une substance ajoutée dans l'alimentation en plus dans le domaine pharmaceutique. (**Mahmoudi, 2014**). Le dioxyde de titane est selon l'arrangement des atomes, il peut prendre plusieurs formes cristallines dont la forme rutile qui est la forme naturelle et l'anatase. D'autre part, il absorbe les rayons ultraviolets, d'où son utilisation dans des crèmes solaires. Enfin, il est photo catalytique (sous la forme anatase surtout) (**Jean, 2015**).

Dioxyde de titane ultra-fin forme nanométrique composé principalement de particules primaires de taille < 100 nm (nanoparticules) dont le diamètre est généralement compris entre 10 et 50 nm avec une surface spécifique (**INRS, 2013**).

Le dioxyde de titane pur est un solide blanc réfringent, thermostable, cristallin sous deux formes allotropiques principales, l'anatase et le rutile (**INRS, 2013**). Des particules de dioxyde de titane de 25 nanomètres disponibles commercialement (**Sylvie, 2015**), sous forme de poudre ou de dispersion dans un liquide. Il est inodore, insoluble dans l'eau, dans l'éthanol et autres solvants organiques (**INRS, 2013**).

11.2. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de titane

Il existe de plus différents procédés permettant de synthétiser du TiO₂ nanométrique, comme par exemple le procédé sol-gel, qui consiste en une suite de polymérisations /hydrolyses à partir d'un précurseur inorganique (**Wilson et al., 2009**). On peut également citer le procédé sol, qui consiste en une série de réactions non hydrolytiques entre un précurseur de chlorure de titane et des molécules donneuses d'oxygène, ou encore un procédé par oxydation directe de titane pur. Le choix du procédé de fabrication ainsi que les conditions de production comme la nature du précurseur ou les conditions de température peuvent donner lieu à du TiO₂ de caractéristiques physicochimiques différentes (**Wilson, 2009**).

11.3. Propriétés structurales de dioxyde de titane

Les trois formes cristallographiques différentes du dioxyde de titane, ou TiO₂, qui peuvent être trouvées dans la nature sont l'anatase (1801), le rutile (1803) et le brookite (1825), dans l'ordre chronologique de leur découverte.

11.3.1-a Structure cristalline de L'anatase

Le rutile et le brookite aussi bien que l'anatase ont des structures différentes. L'anatase est stable jusqu'à environ 800 °C, puis il se transformera automatiquement en rutile. (Plusieurs propriétés sont identiques pour l'anatase et le rutile tel que la dureté et la densité. L'anatase se cristallise sous la structure tétraédrique allongée avec des octaèdres d'oxygène irrégulier, mais les distances moyennes Ti–O (1,917 Å) sont sensiblement égales aux autres côtés et à celles du rutile. Cette structure est stable à des températures plus basses contrairement aux celles de la formation du rutile et du brookite. La phase anatase est largement utilisée pour sa compatibilité avec les azurants optiques. Ils sont également moins abrasifs que les rutiles.

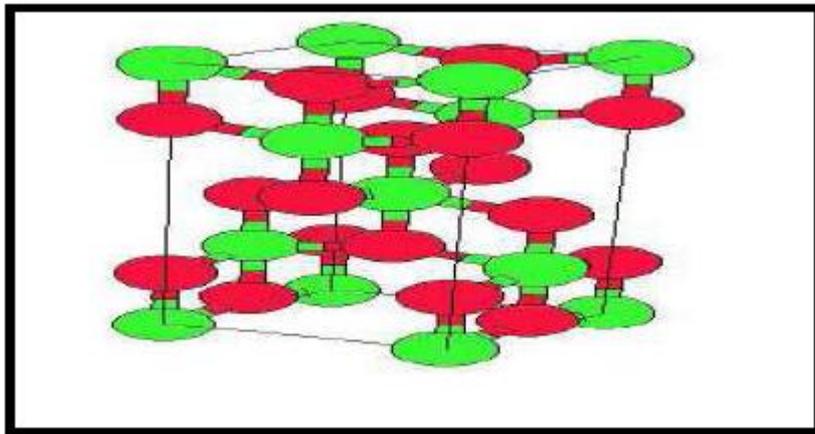


Figure 3 .structure de l'anatase (Kertesz, 1991).

11.3.2-b Structure cristalline de brookite

La phase de la brookite est orthorhombique d'une structure plus complexe, cependant les distances Ti–O soient similaires aux celles des autres structures. La brookite montre une stabilité à des températures plus basses que celles du rutile. A température élevée, environ 800 °C, la brookite se transforme en rutile. La brookite et le rutile montrent presque les mêmes propriétés, telles que : la couleur, la dureté et la densité ; jusqu'au l'année 2002, cette phase n'est pas largement étudiée.

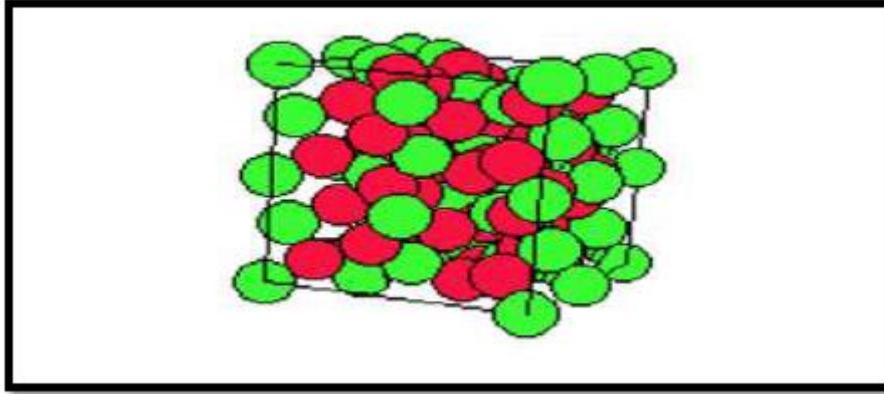


Figure 4 :structure du Brookite (Kertesz, 1991).

11.3.3 Structure cristalline de rutile

La structure la plus stable du dioxyde de titane est le rutile, qu'il se produit à haute température. Il est synthétisé et commercialisé depuis 1941. Il a un réseau tétraédrique de cations, des octaèdres d'oxygène entourent les cations. L'octaèdre TiO_2 partage une arête commune le long de l'axe $[001]$ et un sommet commun avec un autre octaèdre adjacent.10

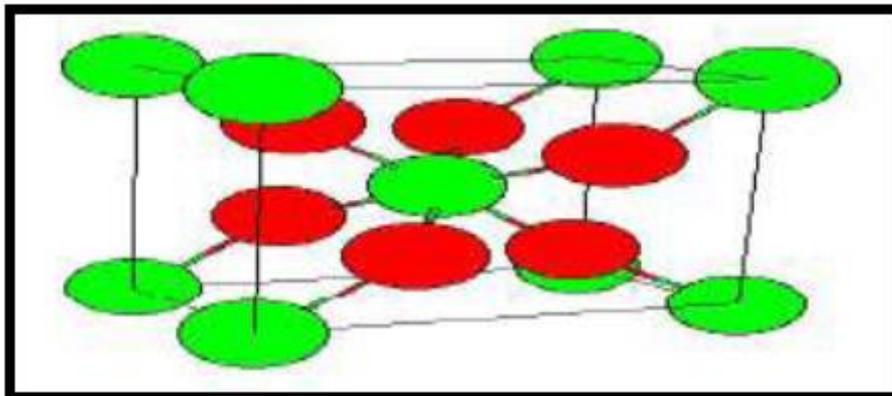


Figure 5 : structure du rutile (Kertesz, 1991).

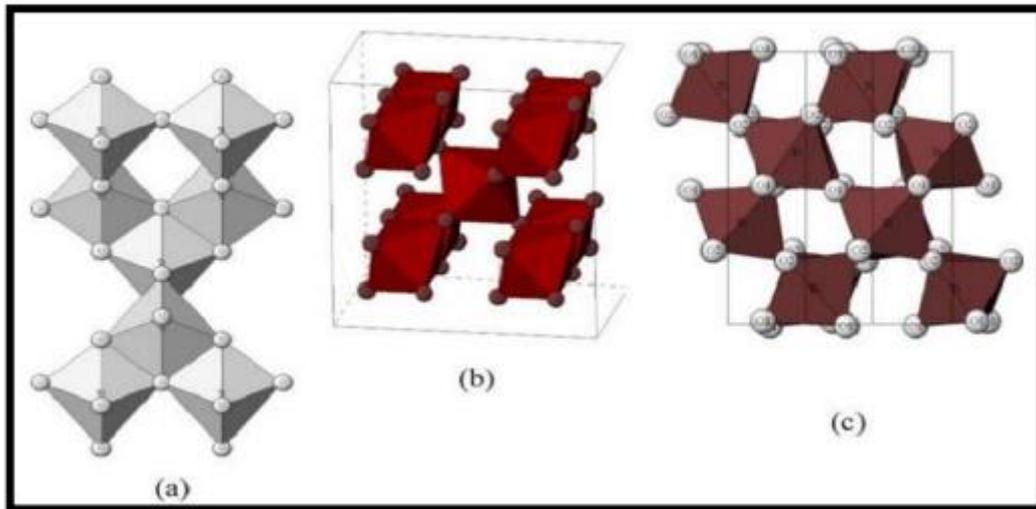


Figure 06: Les structures cristallines du TiO₂ anatase (a), rutile (b) et brookite (c), (Pelaez, 2012).

11.4. Propriétés physiques

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

11.5. Propriétés chimiques de dioxyde de titane

Le dioxyde de titane non « ultrafin » est un produit très peu réactif. Il n'est pas attaqué par les acides chlorhydrique ou nitrique, mais attaqué par l'acide sulfurique concentré chaud ainsi que par l'acide fluorhydrique avec lequel il forme l'acide fluotitanique, Il peut également être attaqué par les bases concentrées. Le lithium, le magnésium et le zinc peuvent réduire le dioxyde de titane (J argot et al., 2013). En raison de leur surface spécifique plus élevée, les nanoparticules de dioxyde de titane présentent des propriétés photocatalytiques améliorées par rapport aux particules de plus grande taille : elles sont susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singlet, radical superoxyde) après exposition aux rayons ultraviolets et réactions avec l'eau ou l'oxygène (J argot et al., 2013).

12. Toxicocinétique

Le dioxyde de titane pénètre dans l'organisme essentiellement par inhalation, et dans une moindre mesure, par voie orale. Que ce soit sous forme micrométrique ou nanométrique, les données disponibles à ce jour ne sont pas suffisantes pour pouvoir conclure quant à la présence d'une absorption percutanée, à la suite d'une exposition par voie inhalatrice, l'accumulation se fait principalement au niveau des ganglions lymphatiques alors que par voie orale, les particules micro et nanométriques s'accumulent au niveau du foie, de la rate, des poumons et des reins, suite à une translocation (migration des particules à partir de leur site de déposition) circulatoire. Sous forme nanométrique, elles sont majoritairement excrétées via les urines, après administration intraveineuse (**J argot et al. 2013**).

12.1. Absorption

12.1.1. Absorption broncho-pulmonaire

La rétention pulmonaire des particules nanométriques (20 nm, anatase) est plus importante que celle des particules fines (250 nm, anatase) : la demi-vie de rétention est estimée à 501 jours pour les nanoparticules et à 174 jours pour les particules fines. Après inhalation, le dioxyde de titane s'accumule dans l'appareil respiratoire, différemment selon la taille des particules sous sa forme nanométrique, il est retrouvé au niveau des ganglions lymphatiques et en très faible quantité dans le foie. Après instillation nasale, les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent subir une translocation neuronale et être retrouvées dans certaines régions du cerveau (**J argot et al.,2013**).

12.1.2. Absorption cutanée

L'absorption percutanée du dioxyde de titane a été étudiée chez des mini-porcs, exposés 4 fois par jour, 5 jours par semaine pendant 22 jours, au niveau du cou, du dos et du ventre, à trois formulations différentes de crèmes solaires. Après 22 jours d'application, les concentrations en dioxyde de titane mesurées dans les ganglions lymphatiques ne sont augmentées de façon significative, par rapport au groupe témoin, la majorité du dioxyde de titane est retrouvée dans l'épiderme. La très faible quantité de particules mise en évidence dans le derme pourrait être le résultat d'une contamination par des restes d'épiderme, lors de la préparation des échantillons de peau. Toutefois, la présence de dioxyde de titane dans les ganglions inguinaux, obtenue sur peau saine, ne permet pas de conclure quant à une absence totale d'absorption percutanée des particules de dioxyde de titane (**J argot et al.,2013**).

Absorption gastro-intestinale

Une étude récente met en évidence le faible taux d'absorption gastro-intestinale, les nanoparticules de TiO₂, localisées au niveau de la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle de rat, ne passant pas dans la circulation systémique. En effet, les nanoparticules se retrouvent sous forme d'agglomérats de taille importante (comprise entre 1702 et 2080 nm), limitant considérablement absorption et translocation (**J argot et al.,2013**).

12.2. Distribution

Par voie orale, les souris exposées à des particules de dioxyde de titane de taille nanométrique (25 et 80 nm) et micrométrique (155 nm) présentent une augmentation par rapport aux témoins, des concentrations en titane au niveau du foie, de la rate, des poumons et des reins, 2 semaines après l'exposition, à la suite d'une translocation circulatoire. Après une exposition par inhalation, les particules de TiO₂ sont retrouvées au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques après instillation nasale, une translocation neuronale est suspectée d'être à l'origine de l'accumulation de nanoparticules de TiO₂ dans certaines parties du cerveau (**J argot et al.,2013**). Une accumulation de nanoparticules de TiO₂ est observée dans le cerveau (principalement au niveau du cortex cérébral, du thalamus, de l'hippocampe et du bulbe olfactif), signe d'un passage de la barrière hémato-encéphalique. Après l'administration par voie intraveineuse de nanoparticules de TiO₂ dans du sérum (5 ou 10 mg/kg), les niveaux les plus importants sont retrouvés dans le foie, puis de manière décroissante, dans la rate, les poumons et les reins de rats exposés (**J argot et al.,2013**). À la suite d'une injection sous-cutanée de nanoparticules de TiO₂, les agglomérats les plus importants sont observés au niveau des ganglions inguinaux et, dans une moindre mesure, au niveau du foie, de la rate et des poumons (**J argot et al., 2013**).

12.3. Elimination

Chez le rat, la clairance alvéolaire des particules ultra fines est augmentée, par rapport à celle des fines, du fait d'une translocation plus importante de ces particules dans l'interstitielle pulmonaire. L'administration par voie intraveineuse met en évidence une excrétion rénale majeure pour les particules nanométriques : le 1 jour après l'injection, 16 % de la dose est retrouvée dans les urines contre 1 % dans les fèces. Aucune information quantitative n'est disponible pour la forme micrométrique (**J argot et al.,2013**)

13. Utilisation et applications d'oxyde de titane

Les applications du dioxyde de titane sont résumées dans le tableau ci-après :

Tableau 01 :Tableau récapitulant les différentes applications du TiO₂ (Bouhadoun, 2015)

Domaine	Applications	Propriétés
Environnement	Papier peint, peinture, enduits, rideaux, abat-jour de fenêtre, ciment, vitres, tuiles. murs de tunnel, lampes de tunnels, murs insonorisés, purificateur d'air, désinfection des eaux usagées	Autonettoyant, antibactérien purification de l'air et purification de l'eau
Médical	Carrelage, murs des salles d'opérations	Antibactérien Stérilisation Autonettoyant
Énergie	Cellules solaires, production d'hydrogène	Conversion de l'énergie solaire, hydrolyse de l'eau

14. Cytotoxicité des nanoparticules de dioxyde de titane

14.1. Etudes de survie/prolifération cellulaire

Les effets cytotoxiques aigus se traduisent par une altération de la survie des cellules quiescentes. Les effets toxiques sont fréquemment perceptibles sous forme d'une inhibition de la prolifération cellulaire. Diverses études ont été menées sur différentes lignées cellulaires comme les cellules respiratoires ; nerveuses, de peau, ou encore sanguines et intestinales. En fonction des études, il apparaît ou non une inhibition de la prolifération cellulaire en fonction des propriétés des nanoparticules de TiO₂. Les études de viabilité cellulaire sont généralement complétées par d'autres tests de Cytotoxicité (Manon, 2014).

14.2. Stress oxydant

Le stress oxydant est un type d'agression des constituants de la cellule, dû aux espèces réactives oxygénées. Les ROS sont des espèces chimiques extrêmement réactives regroupant les radicaux libres possédant un électron célibataire non apparié (les radicaux hydroxyl HO• ou alkoxy RO• par exemple) et également des dérivés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par exemple.

En effet, l'introduction d'espèces hautement réactives dans la cellule ou dans un organe, comme les nanoparticules, peut générer un stress oxydant. Si ces espèces sont nombreuses, les cellules n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme en provoquant une réaction inflammatoire exacerbée. L'étude de **Jiang et al. 2008** a évalué la relation entre certaines propriétés physico-chimiques des nanoparticules de TiO₂ (taille, surface d'activité, forme cristalline) et le potentiel de génération d'un stress oxydant. La forte activité de génération d'espèces réactives, observée pour les particules de 30 nm semblerait être corrélée aux propriétés photocatalytiques du TiO₂. Sous irradiation UV, les nanoparticules de TiO₂ produisent différentes quantités de radicaux hydroxyles en fonction de leur structure cristalline et leur taille. Il semble en effet que plus la particule est petite, et plus elle va créer des dommages oxydatifs (**Manon, 2014**).

14.3. Réponse inflammatoire

Un des effets notés suite à une exposition aux nanoparticules de dioxyde de titane est la réponse inflammatoire. Elle correspond à l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. Des facteurs pro inflammatoire s'activent les cellules immunitaires à l'origine de l'inflammation. (Palomäki et al. 2010)ont indiqué que le TiO₂ pur et enrobé de silice induisait une expression accrue des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques et dans les macrophages de rat. Durant une courte exposition, le TiO₂ active les leucocytes neutrophiles et modifient leur forme, tandis qu'après une plus longue exposition, il y a inhibition de l'apoptose et de la production de cytokines (**Manon, 2014**).

14.4. Internalisation cellulaire

Afin de comprendre leurs mécanismes d'action, la localisation de nanoparticules en interaction avec des cellules a été étudiée. La membrane cellulaire forme une barrière exerçant un contrôle du transfert transmembranaire des composés hydrophiles, naturellement imperméabilisants dans les bicouches lipidiques. Les molécules de petites tailles peuvent emprunter des transporteurs enzymatiques ou des pores passifs pour pénétrer dans les cellules. Les macromolécules ou particules polaires peuvent être internalisées par endocytose. Dans une étude, le TiO₂ a été trouvé à l'intérieur des cellules, sous plusieurs formes : en tant que gros agrégats liés à la membrane, ou sous forme d'agrégats plus petits et libres ou encore sous forme de particules individuelles dans le cytoplasme. En particulier il a été localisé par fluorescence (**Manon, 2014**).

Chapitre II

Neurotoxicité

I. Généralités sur neurotoxicité

La neurotoxicité est une altération structurelle ou fonctionnelle du système nerveux résultant de l'exposition à des agents biologiques, physiques ou chimiques (**Philbert et al., 2000 ; Bear et al., 2016**).

1. Le cerveau

Avec un adulte, le cerveau pèse environ 1,3 kg et est composé de milliards de cellules nerveuses.

Il est placé à l'intérieur du vaisseau crânien protecteur. Les membranes de la dure mère, de l'arachnoïde et de la pie-mère sont trois membranes protectrices qui entourent le cerveau (**Cambier, 2008**).

Il appartient à l'encéphale, qui comprend le diencéphale, le tronc cérébral et le cervelet en suspension dans le liquide céphalo-rachidien, un liquide amortisseur de chocs qui permet le transport de molécules et la récupération des déchets (**Pascal 2010**). Le cerveau est divisé en deux parties l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche. Chaque hémisphère contrôle une partie opposée du corps; l'hémisphère gauche contrôle le côté droit du corps, et inversement (**Cambier, 2008 ; Peterson et al., 2015**).

L'hémisphère gauche est typiquement associé à la logique et au langage, tandis que l'hémisphère droit abrite l'intuition, l'émotion et le sens artistique. (Bear et al., 2016)).

La surface des hémisphères est recouverte de cortex cérébral, c'est la substance grise car elle contient les corps cellulaires des neurones. Le cortex est parcouru de circonvolutions, qui sont des replis du tissu cérébral (**Peterson et al., 2015**).

1.1. Histologie du cerveau

Le groupe de systèmes qui maintient l'équilibre dans le corps est connu comme le système nerveux. (SN). Il est divisé en deux systèmes : le système central (SNC) et le système périphérique. (SNP).

- Le SNC : C'est le centre de régulation et de communication de l'organisme, il est formé de l'encéphale et de la moelle épinière (**Bear et al., 2016**).

- Le SNP : c'est la ligne de communication entre le SNC et l'organisme, et est situé à l'extrémité de SNC.

Il est formé principalement des nerfs (crâniens et spinaux) issus de l'encéphale et de la moelle épinière qui comprend deux types de voies (**Marieb, 2005**).

- La voie sensitive (afférente) : il transporte l'influx des récepteurs sensoriels (tels que la peau et les organes sensibles dans le muscle lisse) vers le SNC.

- La voie motrice (efférente) : cette relie également deux parties SN somatique(volontaire) et SN végétatif (autonome) qui est divisé en systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques à son tour. L'un est stimulé et l'autre est inhibé(**Marieb, 2005**).

1.2. Physiologie du cerveau

Le système nerveux est capable de détecter une variété de stimuli (internes et externes) et de réagir rapidement et avec un degré élevé de coordination. Les impulsions électriques sont composées de potentiels d'action, qui se déplacent rapidement le long des axons d'un neurone à un autre ou d'une neurone dans une cellule effecteur (**Imbert, 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007 ; Bear et al., 2016**).

2. Cellules du système nerveux

Les cellules du système nerveux sont divisées en deux classes de glyocytes et de neurones.

- **Les neurones :**

Un neurone est une cellule SN fondamentale spécialisée dans le traitement et la communication de l'information. Les neurones qui reçoivent des informations des récepteurs sensoriels du corps sont faits d'un corps cellulaire entouré de dendrites et d'axones et terminés par l'arborisation des boutons synaptiques (**Gasmi S., 2018**).

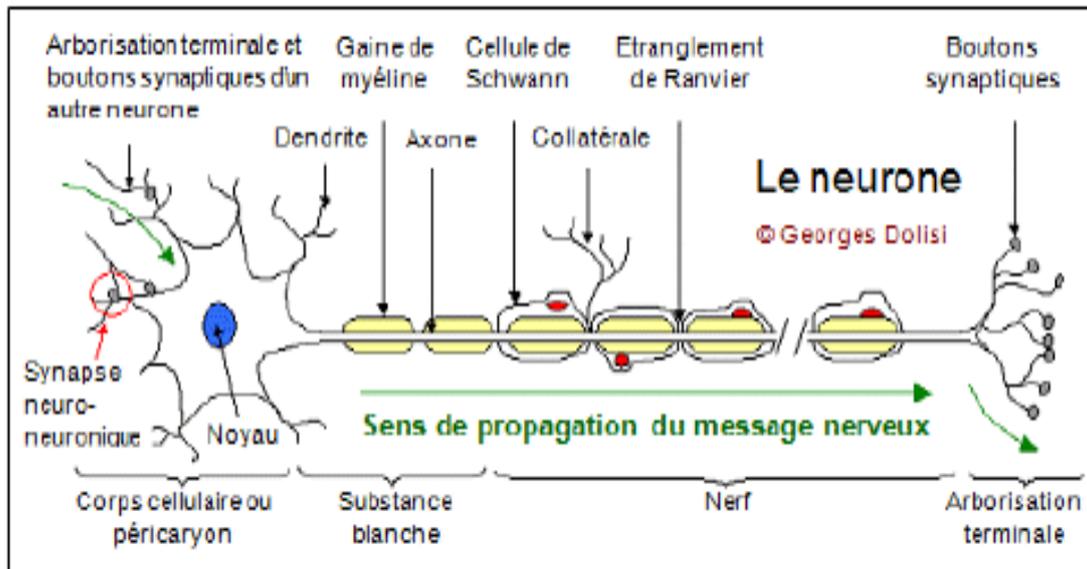


Figure 07 : Structure d'un neurone (Jean-François et *al.*, 2005).

La fonction principale des neurones est de transmettre des signaux nerveux, tandis que les cellules gliales sont chargées de protéger, nourrir et optimiser leurs performances.

Les cellules gliales

Les cellules gliales sont des cellules de soutien qui assurent une variété de fonctions nécessaires au bon fonctionnement du système nerveux il existe quatre types différents de cellules gliales :

Oligodendrocytes : plus petits que les astrocytes et avec moins d'extensions, ils jouent le rôle d'un réseau de soutien pour les neurones mais surtout assurent la myélination de leurs axones pour les isoler et accélérer les impulsions nerveuses (kierszenbaum, 2006).

Microglia: petites cellules généralement mobiles et en forme d'étoile, elles appartiennent au groupe des macrophages formant ainsi le principal système immunitaire actif de défense du système nerveux central (Gasmi S., 2018).

Cellules endothéliales : ils ont une forme cubique ou cylindrique, ils sont souvent ciliés et forment un épithélium simple qui ligne les cavités centrales du cerveau ; ils sont utilisés pour créer du liquide cérébral et favoriser sa circulation. (Minabe et *al.*, 2015).

Astrocytes : Ce sont les cellules les plus abondantes et les plus volumineuses d'origine gliale, elles ont une forme d'étoile avec plusieurs extensions; une distinction est alors faite entre les astrocytes de type I, qui sont en contact avec les capillaires sanguins, et les astrocytes de type II, qui entourent les neurones et les fentes synaptiques, empêchant ainsi la dispersion des neurotransmetteurs en les capturant et en les métabolisant (Sun et *al.*, 2012).

(William, 1981; Block et Hong, 2005). Ils entourent les neurones et aident à réguler l'environnement chimique et électrique en les nourrissant et en se débarrassant de leurs déchets. (William, 1981). Ils produisent des facteurs de croissance et réutilisent des neurotransmetteurs, c'est pourquoi ils sont connus sous le nom de cellules de soutien neuronal (Christensen et al., 2013). Les cellules gliales jouent un rôle important dans la pathologie du système nerveux (Koistinaho and al., 2004; Pihlaja and al., 2011) Par exemple, de la maladie d'Alzheimer.

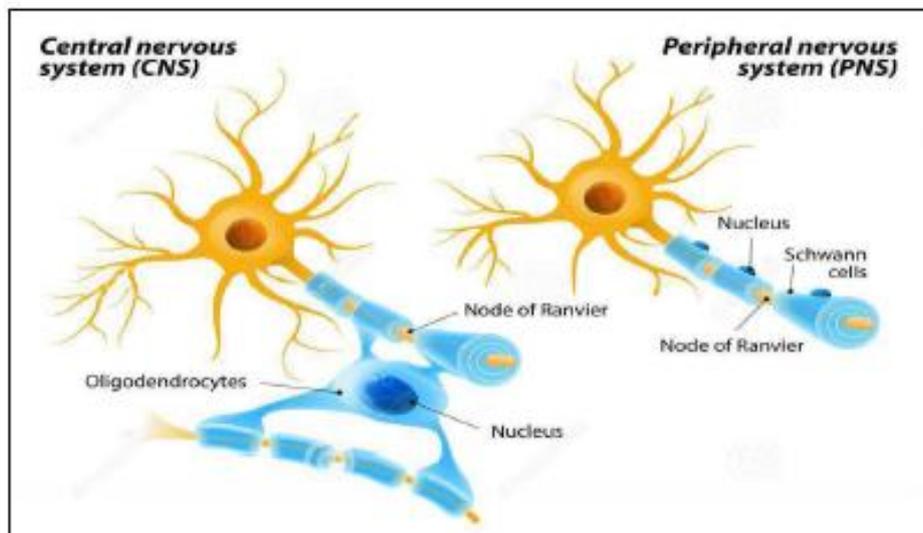


Figure 08: Structures et formes des cellules gliales (Jean-François et al., 2005).

En outre, les astrocytes sont considérés comme une source majeure de production de peroxy-nitrite, qui interfère avec plusieurs voies de signalisation et perturbe la respiration en provoquant la nitration des protéines, y compris les amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Mitochondriale et provoque la mort cellulaire (Gasmi S., 2018).

2 Fonctionnement du système nerveux

2.1 Le flux nerveux et l'intégration synaptique

Les propriétés électrochimiques plasmatiques des membranes des cellules nerveuses sont responsables de la transmission de l'afflux nerveux. Le signal se transmet d'une cellule nerveuse à une autre par des jonctions qu'on appelle synapses (**Purves et al., 2004 ; Brooker et al., 2001**), un type bien particulier de ces synapses est celui qui relie le neurone à une cellule effectrice telle qu'une fibre musculaire, cette synapse est alors dite jonction neuromusculaire (**Gerard et al., 2002 ; Ganong et al., 2005**). Le passage de l'information dans une synapse est assuré par des molécules chimiques appelés neurotransmetteurs (**Kolb et al., 2002**). Au niveau des synapses, lorsque l'influx nerveux atteint les terminaisons présynaptiques déclenchent des événements qui aboutissent à la libération d'un neurotransmetteur à travers la fente synaptique qui modifie la perméabilité de la membrane post-synaptique (**Marieb, 2005**). Les canaux Na^+ voltage dépendants sont responsables de l'initiation et la propagation de ces potentiels d'action sur le long de l'axone, le canal de sodium forme un pore dans la membrane qui est hautement sélectif pour les ions Na^+ . A l'état de repos, les canaux sont fermés. Lorsque la membrane est dépolarisée, ces canaux sont ouverts (**Guéguen et al., 2005 ; Imbert, 2006**).

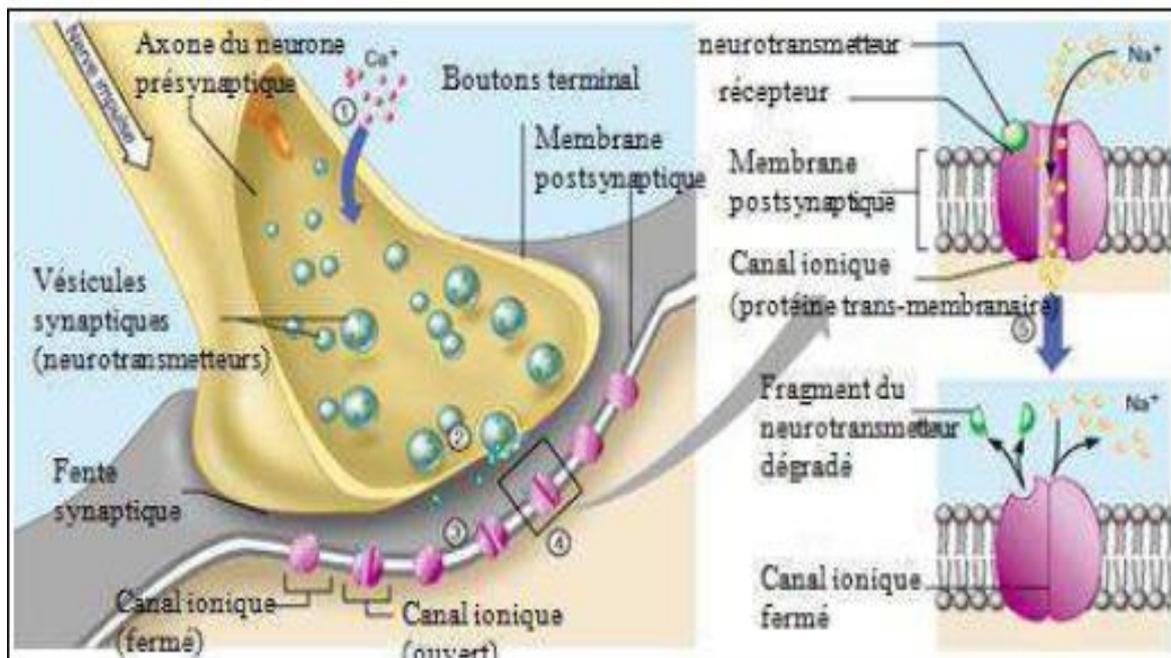


Figure 09 : Mode de transmission des signaux nerveux (**Marieb, 2005**).

La capacité d'un neurone à recevoir et à transmettre des informations est d'abord le résultat de variations de la distribution des ions sur la membrane cellulaire. (Bear et al., 2016). Ce qui crée une différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule au repos (Lacombe, 2006), et deuxièmement de modifications momentanées de la perméabilité de cette membrane à certains ions ce qui engendre une dépolarisation électrique de la membrane. Cette dernière se transmet de proche en proche le long de l'axone et constitue la transmission de l'information nerveuse ou influx nerveux (Siegel et al., 2005). Après avoir été dépolarisée, la membrane retrouve rapidement son état initial polarisé, mais jusqu'à ce que les ions soient revenus à leur place, l'axone ne peut conduire de nouvel influx, cette période est nommée réfractaire (fig.08) (Cambier, 2008 ; Lacombe, 2006).

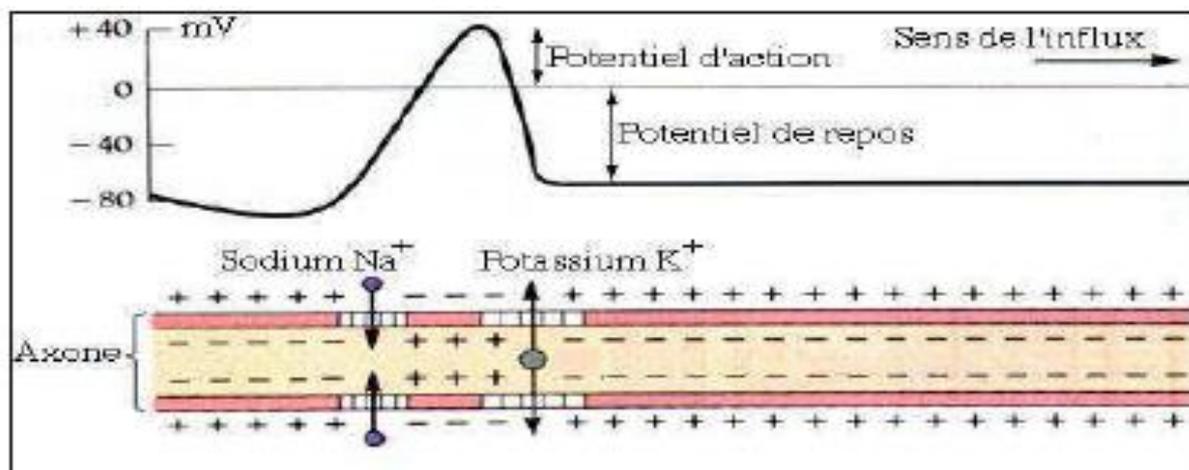


Figure 10 : Variation du potentiel électrique du cytoplasme d'un axone par rapport à l'extérieur, et origine de la dépolarisation (Bernard et al., 2007)

Par rapport aux fibres myéliniques, qui peuvent atteindre des vitesses de 100 m/s, les fibres amyéliniques n'atteignent qu'une vitesse d'environ 1,5 à 2m/s. (Cambier, 2008). Dans ce cas, la gaine de myéline est électriquement isolante, permettant à la dépolarisation électrique de se déplacer par sauts, du nœud Ranvier au nœud Ranvier (Gasmi S., 2018). Les premières gaines de myéline n'apparaissent qu'à la fin de la vie fœtale et au cours de la première année, et la quantité de myéline augmentant jusqu'à la maturité, il est aisé de comprendre pourquoi les réactions d'un enfant et surtout d'un nouveau né ne sont pas aussi rapides et aussi coordonnées que celles d'un adulte (Brailon, 2002; Guéguen et al., 2005 ; Bernard et al., 2007).

Une jonction synaptique ou synapse est l'endroit où l'afflux de synapses doit fréquemment transférer d'un neurone à l'autre. (Cambier, 2008; Lacombe, 2006). Les petites vésicules synaptiques constituées de neurotransmetteurs ou de neuromédiateurs, que le neurone produit, se trouvent dans les boutons terminaux. (Tritsch et al., 1999). La libération de neurotransmetteurs se produit lorsque la conduction nerveuse atteint le bouton synaptique, une distance de 20 à 50 nm (la fenêtre synaptiques) entre les neurones pré- et post synaptiques. (Cambier, 2008). Selon leur composition chimique, ces neurotransmetteurs provoquent un certain nombre de réactions lorsqu'ils s'attachent à certains récepteurs de membrane post synaptique. (Tritsch et al., 1999).

2.2 Neurotransmetteurs

Bien que ce ne serait que entre 1,10 et 6 s dans le cas d'une transmission entièrement électrique, la transmission chimique de l'information nerveuse-signal à la synapse impose un retard de transmission de 0,5 millisecondes. Cependant, la nature chimique de cette méthode de transmission permet la manipulation de l'afflux d'impulsions nerveuses. (Gasmi S., 2018). Les neurotransmetteurs sont des substances qu'un neurone libère au niveau d'une jonction synaptique et qui modifient particulièrement l'activité d'une autre cellule. (Gasmi S., 2018). Ils sont rapidement éliminés après avoir été libérés dans la zone post-synaptique pour activer leurs récepteurs (Guénard, 2001), soit par diffusion hors de la fente synaptique, soit en étant dégradés par une enzyme puis réabsorbés par le bouton terminal (Guéguen et al., 2005).

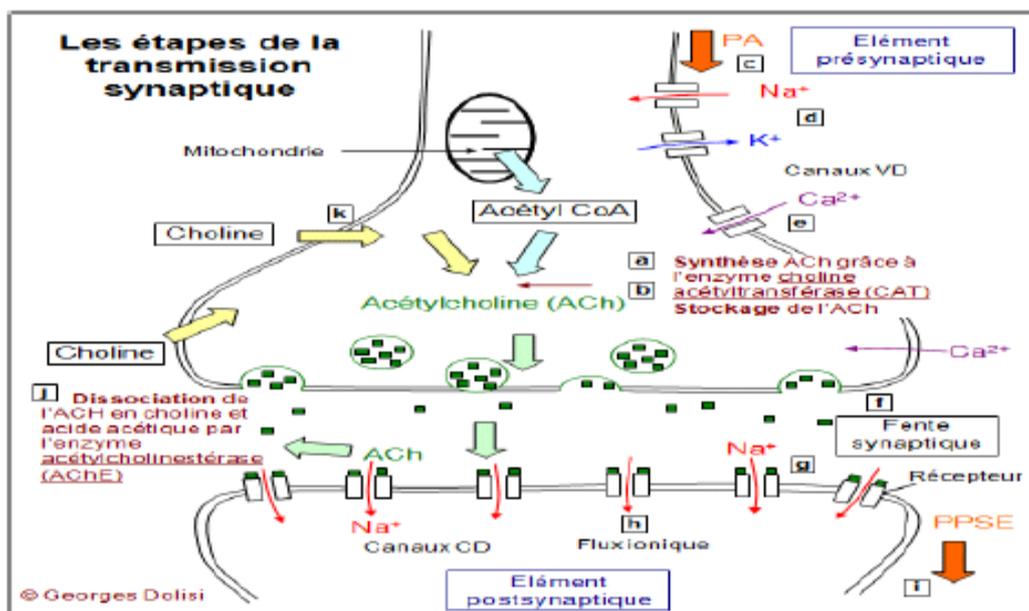


Figure 11 : Mécanisme du transmission synaptique de l'influx nerveux (Chuiko et al., 1997).

Une fois à l'extrémité nerveuse, l'afflux moteur provoque l'ouverture des canaux de calcium, ce qui provoque ensuite une entrée massive d'ions de Calcium dans la cellule. Le Ca^{2+} favorise la sécrétion d'Ach dans la fente synaptique (**Guénard, 2001 ; Kolb et al., 2002**). Chaque deux molécules d'Ach diffusent de l'autre côté et liées avec un récepteur cholinergique (**Lodish, et al., 2005 ; Martin et al., 2006**), ce dernière provoque l'ouverture d'un canal sodique, ce qui favorise l'entrée des ions du sodium à l'intérieur de la fibre musculaire, dépolarisant ainsi la membrane post-synaptique et créant un potentiel de plaque (**Lodish, et al., 2005**). Selon le nombre de récepteurs actifs, ce potentiel peut dépasser un certain seuil, déclenchant un potentiel d'action musculaire qui s'étendra sur l'ensemble de la membrane et provoquera une contraction des fibres musculaires. L'enzyme AchE, qui est présente au niveau de la fenestration synaptique à deux molécules chacune de l'acétylcholine et de l'acétate, détruit rapidement les molécules Ach. (Martin et al., 2006)

- **Adrénaline (Ad)**

En cas d'événements stressants ou nocifs (danger, traumatisme, maladie, refroidissement), l'adrénaline joue un rôle crucial dans la régulation de l'ensemble du système organique et dans la réponse de l'organisme au stress (**Gasmi S., 2018**). La libération de ce neuromédiateur entraîne également toute une série de réactions nerveuses incontrôlables, comme l'augmentation du rythme cardiaque et respiratoire pour préparer l'organisme au combat ou à la fuite (**Martin et al., 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007**).

- **Dopamine (Da)**

est un neurotransmetteur qui est produit à partir de la tyrosine par certaines cellules nerveuses (Bear et al., 2016). Elle est le neurotransmetteur inhibiteur d'un nombre limité de neurones qui a un impact sur la fonction du système immunitaire, la fonction musculaire et le développement des tissus. Il contribue à la libération de l'hormone de croissance (**Kazushige et al., 2000 ; Meiser et al., 2013 ; Dias et al., 2014**).

- **GABA Acide gamma-aminobutyrique:**

Le GABA ou acide g-aminobutyrique est un neurotransmetteur inhibiteur, dont le récepteur se lie aussi au valium. Le GABA et le valium aident à soulager l'anxiété et diminuent l'angoisse. (**Gasmi S., 2018**)

Il est le principal neurotransmetteur inhibiteur et il joue un rôle critique dans la régulation de l'activité neuronale (hyperpolarisation membranaire) chez les vertébrés et les invertébrés (**Buckingham et al., 2005 ; Verkhatsky & Butt, 2007**).

- Sérotonine (5-HT)

La sérotonine, également connue sous le nom de 5-HT, est un neurotransmetteur inhibiteur qui peut affecter des phénomènes tels que le sommeil, la conscience et les états émotionnels (Gasmi S., 2018).

Le neurotransmetteur 5-HT, qui est considéré comme le plus important neurotransmetteur impliqué dans l'anxiété, est un composant du système synergique. Il a été démontré qu'une substance induisant l'anxiété qui agit sur le système neuronal somatosensoriel cérébral abaisse le niveau de 5-HT dans le cerveau (Hoyer et al., 2002; Caramaschi et al., 2007; Meneses et al., 2007).

- Morphine

Les endorphines et les enképhalines sont les neuropeptides que le corps humain produit naturellement sous forme de morphine. Les enképhalines sont des concurrents et des inhibiteurs qui on trouve cela dans les synapses qui gèrent le flux d'humeur, d'émotion et de douleur : en se concentrant sur les récepteurs post-synaptiques au lieu des neurotransmetteurs, ils bloquent la propagation de l'afflux nerveux (Guéguen et al., 2005; Nieuwenhuys et al., 2008).

3. Majeurs pathologies neuronales

- Maladie d'Alzheimer :

La maladie neurodegenerative la plus répandue, la maladie d'Alzheimer, est la plus grande illustration des maladies du cerveau. Nous voyons une perte généralisée de neurones cérébraux pendant cette maladie (Gasmi S., 2018). Bien qu'étendue, cette dégénérescence affecte de préférence le cortex cérébral et l'hippocampe. La perte de neurones provoque l'atrophie cérébrale, ce qui est une réduction de la quantité de tissu du cerveau (Figure 03) (Meziani, 2011).



Figure 12: Difference between a normal brain and an atrophy brain (Alzheimer's disease) (Serge, 2008)

- Maladie de Parkinson:

Maladie neurodégénérative qui résulte de la mort lente et progressive des neurones d'une zone du cerveau qui joue un rôle important dans le contrôle de nos mouvements. C'est pourquoi les personnes atteintes font peu à peu des gestes rigides, saccadés et incontrôlables (**Defebvre et Vérin, 2006 ; Verkhatsky & Butt, 2007**).

- Tumeur cérébrale : multiplication dans le cerveau de cellules anormales. La tumeur peut être bénigne ou maligne (**Peterson et al., 2015**).

Chapitre III

Stress oxydatif

I. Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des radicaux libres, ces derniers sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, formés par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (Berger, 2006; Fontaine, 2007).

1. Les Sources des radicaux libres:

1.1. Les radicaux libres

Sont souvent des molécules possédant un électron non apparié à son orbite externe ce qu'il le rend instable, donc il va augmenter son pouvoir oxydant et tentera de prendre un électron des substrats biologiques environnants. Les ROS possèdent deux sources de production, exogène comme les produits de radiation, les médicaments, les polluants d'air, les pesticides et les solvants organiques (Vergely et Rochette, 2005 ; Flora et al, 2008), et les sources endogènes notamment résident dans la mitochondrie, via sa chaîne respiratoire (.En effet, environ 2 à 5 % de l'oxygène font l'objet d'une réduction monovalente suite à une fuite des électrons dans la matrice mitochondriale au cours de leurs transfert du complexe I au cycle des quinones(Balaban et al., 2005; Vergely et Rochette, 2005). Cette fuite est plus importante dans le cerveau à cause de ses demandes énergétiques élevées (20% de l'O₂ consommé)(Halliwell, 2006). En effet, pendant la réduction de l'oxygène par les cytochromes ils se forment les ROS comme l'O₂[•], H₂O₂ et HO[•] sous l'effet complexes I et III considérés comme générateurs potentiels du ces radicaux libres.

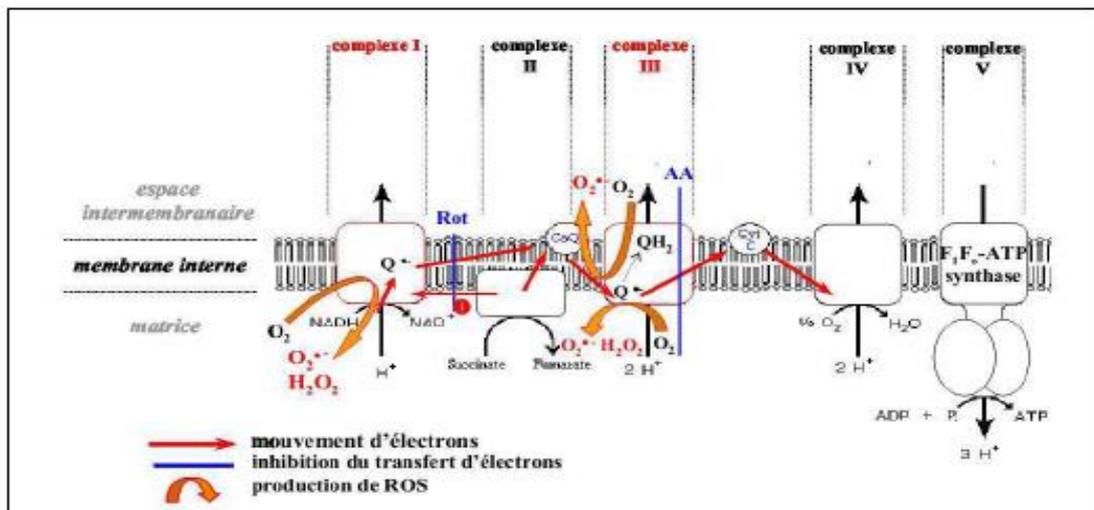
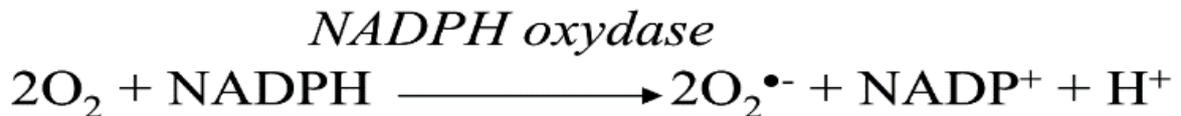


Figure 13: Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).

Par ailleurs plusieurs systèmes enzymatiques sont entraînés dans la production des ROS, entre autres la *NADPH* oxydase, xanthine oxydase, *NO* synthase, Myéloperoxydase.

- **NADPH oxydase** présente notamment dans les cellules phagocytaires, et est susceptible de produire de l'anion superoxyde lors de la phagocytose, en catalysant la réduction monoélectrique du dioxygène en utilisant le *NADPH* ou le *NADH* comme donneur d'électrons selon la réaction suivante :



Cette enzyme peut être activée par une voie de signalisation cellulaire intégrant la sensibilisation d'un récepteur membranaire associé à la protéine *G* suite à la fixation des facteurs cytosoliques tels que les Interleukines, le *TNF* ou encore les polysaccharides bactériens et médiée par les seconds messagers *DAG* et *IP3*.

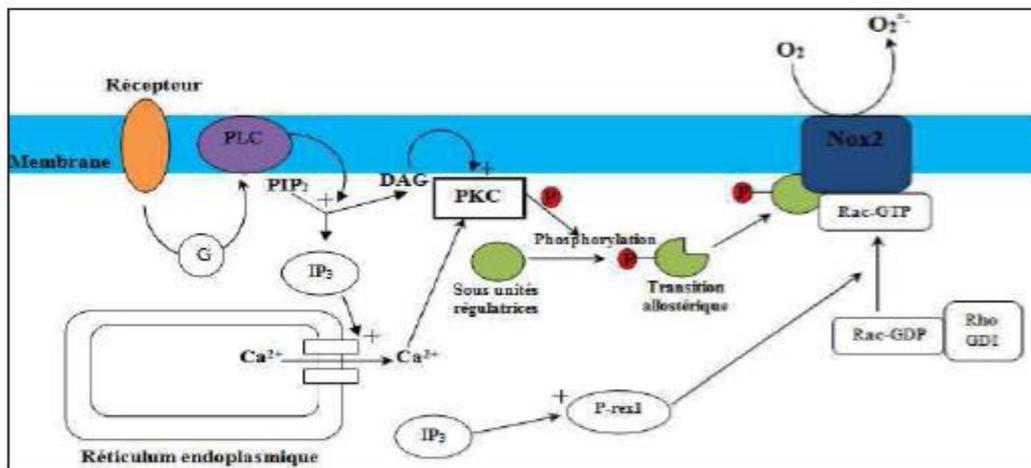
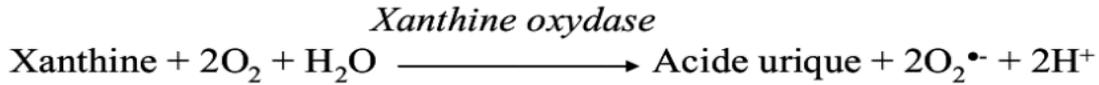


Figure 14 : Cascade d'activation de Nox2 et formation d'anion superoxyde (**Barouki, 2006**).

- **La xanthine oxydase (XO)** catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'*ATP* et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi des radicaux superoxydes selon la réaction suivante (**Barouki, 2006 ; Fontaine, 2007**)



La *XO* possède un complexe de cofacteur d'oxydoréduction *FAD* ; *Fe/S* et *MO*. Le *FAD* peut être réduit soit en *FADH2* soit partiellement en *FADH*. Ces deux derniers subissent encore une fois une ré-oxydation par l'*O2* selon l'illustration schématique suivante :

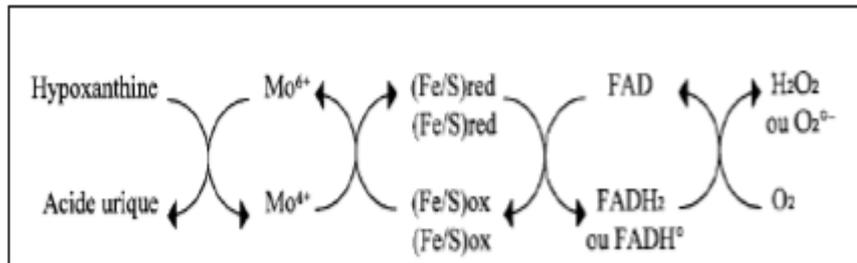
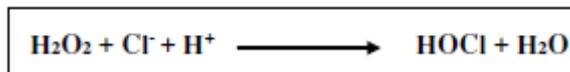


Figure 15. Chaîne de réactions lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (**Barouki, 2006**).

- **La NO synthase** est présente dans la cellule nerveuse et plus abondante chez la cellule phagocytaire et endothéliale. Sa structure est formée de deux sous unités (*fig.16*). La première sous unité représente le domaine réductase qui se trouve à l'extrémité C-terminale, et la deuxième sous unité représente le domaine oxydase qui se trouve à l'extrémité N-terminale. Le domaine réductase possédant 2 flavines *FMN* et *FAD* et un autre site pour la fixation de *NADPH* qui est le générateur d'électron, et un domaine oxydase possédant un hème et un coenzyme particulier le *BH4* et un autre site pour la L-arginine (**Vamecq et al, 2004**).

Les deux domaines sont reliés par un pont protéique qui fixe une molécule de calmoduline qui est indispensable aux fonctionnements de complexe

- **La myeloperoxydase (MPO)** de son côté catalyse la réaction suivante :



En utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat oxydant, la myeloperoxydase sous forme pro-MPO et MPO mature exerce une activité de peroxydase et une activité de chloration (**Bossy-Wetzel et al., 1998 ; Barouki, 2006**).

Tableau 2 : Principales espèces réactives oxydantes (ERO) organiques (Mac Laren, 2007).

Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Devasagayam et al., 2004)

Espèces Réactives dérivées de l'oxygène		Espèces Réactives dérivées de l'azote	
ERO		(ERN)	
Radical hydroxyle	OH^\cdot	Oxyde nitrique	NO^\cdot
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Peroxynitrite	ONOO^\cdot
Hydro-peroxyde	ROOH	Acide proxy-nitreux	ONOOH
Radical Peroxyde	ROO^\cdot	Dioxyde de nitrogène	NO_2
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2		
Oxygène singulet	O_2^{-1}		
Oxygène Ozone	O_3		

1.2. Effets des radicaux libres sur l'organisme

1. 2.1. Les cibles lipidiques:

Peroxydation lipidique, correspond à la détérioration oxydative de doubles liaisons d'acides gras insaturés (AGI), dans des esters de glycérol (tissu adipeux), de phospholipides(membranes), ou de cholestérol (Valko et al., 2007).Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allylique facilement oxydable. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Le mécanisme radicalaire organisées en trois phases successives: L'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell et Gutteridge, 1989).La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras R à partir l'attaque par un RL d'un des groupes méthylène (CH_2 -) de l'acide gras adjacent à une double liaison par soustraction d'un atome d'hydrogène (H.). Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que HO. ou HOO. (Clarkson et al., 2000).Le radical lipidique R^\cdot subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable. (Esterbauer et al., 1992).qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxyde (ROO^\cdot). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un H. à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes. La

réaction en chaîne peut être heureusement interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (**Januels, 2003**).

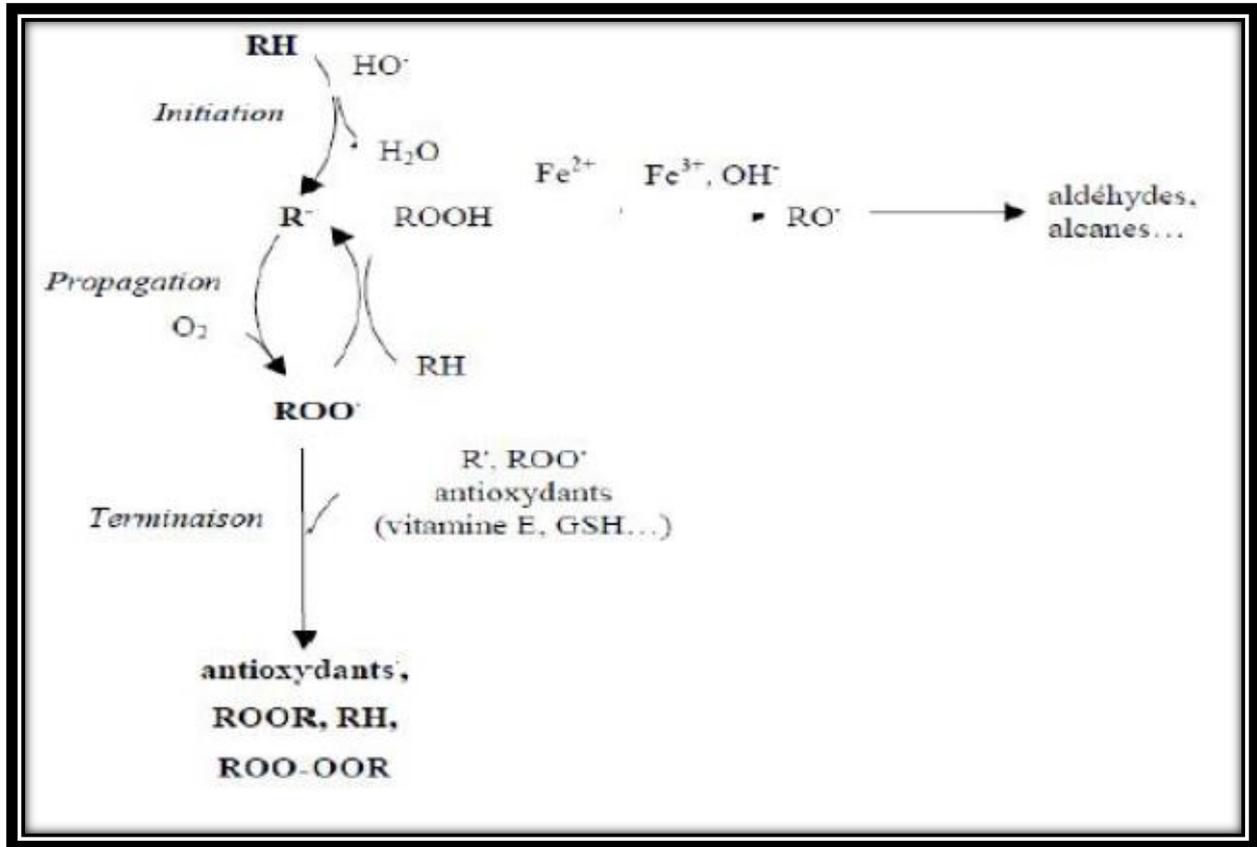


Figure16: La peroxydation lipidique non enzymatique (**Januels, 2003**).

1. 2.2. Les cibles non lipidiques

La production excessive de radicaux libres est responsable de lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides), mais aussi de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides (**Januels, 2003**).

1.2.3. Oxydation des protéines

Les radicaux libres oxygénés induisent des modifications dans les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines par la formation des dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (**Aurousseau, 2004 ; Baudin, 2006**).

1.2.4. Oxydation des glucides

Le glucose et les protéoglycanes du cartilage sont essentiellement les cibles glucidiques.

L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (Halliwell et Gutteridge, 2007):

➤ Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles. De réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG (AGEs en anglais pour « *advanced glycation end-products* »).

➤ Soit par formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine: on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO• ou NO₃• pour former des PFG.

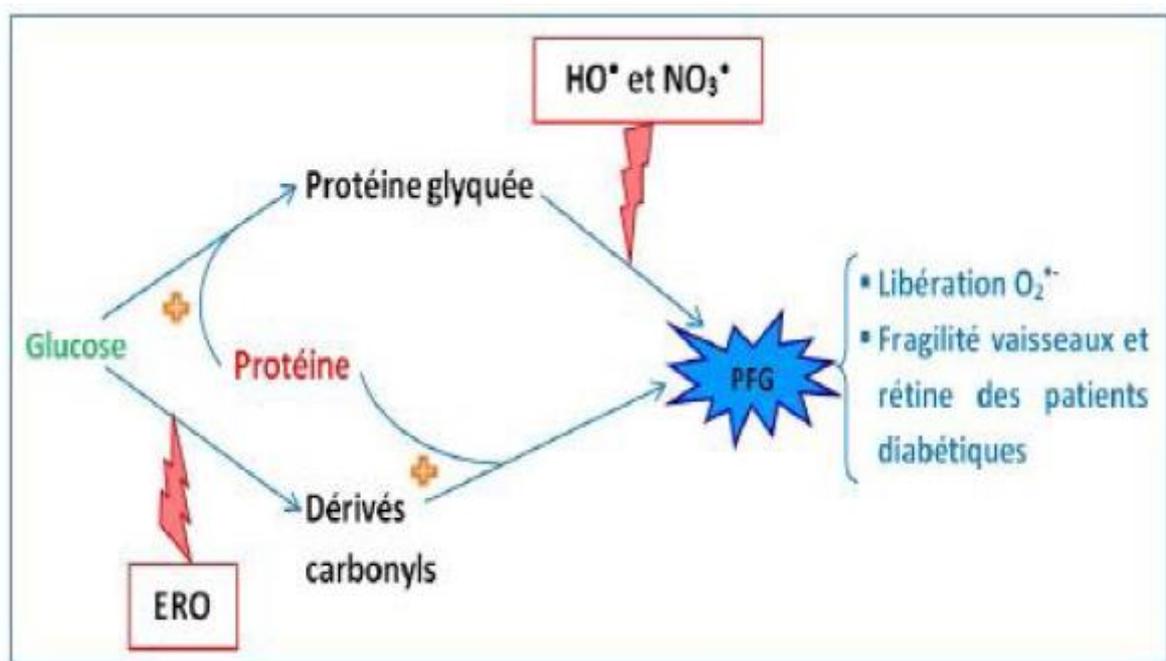


Figure17: Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », (Halliwell et Gutteridge, 2007).

1.2.5. Oxydation de l'ADN

Les ROS peuvent réagir avec la base de guanine (G) de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2'déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques dans l'ADN pouvant conduire au développement du cancer (Collins *et al.*, 1997).

2. Les défenses antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydants. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants.

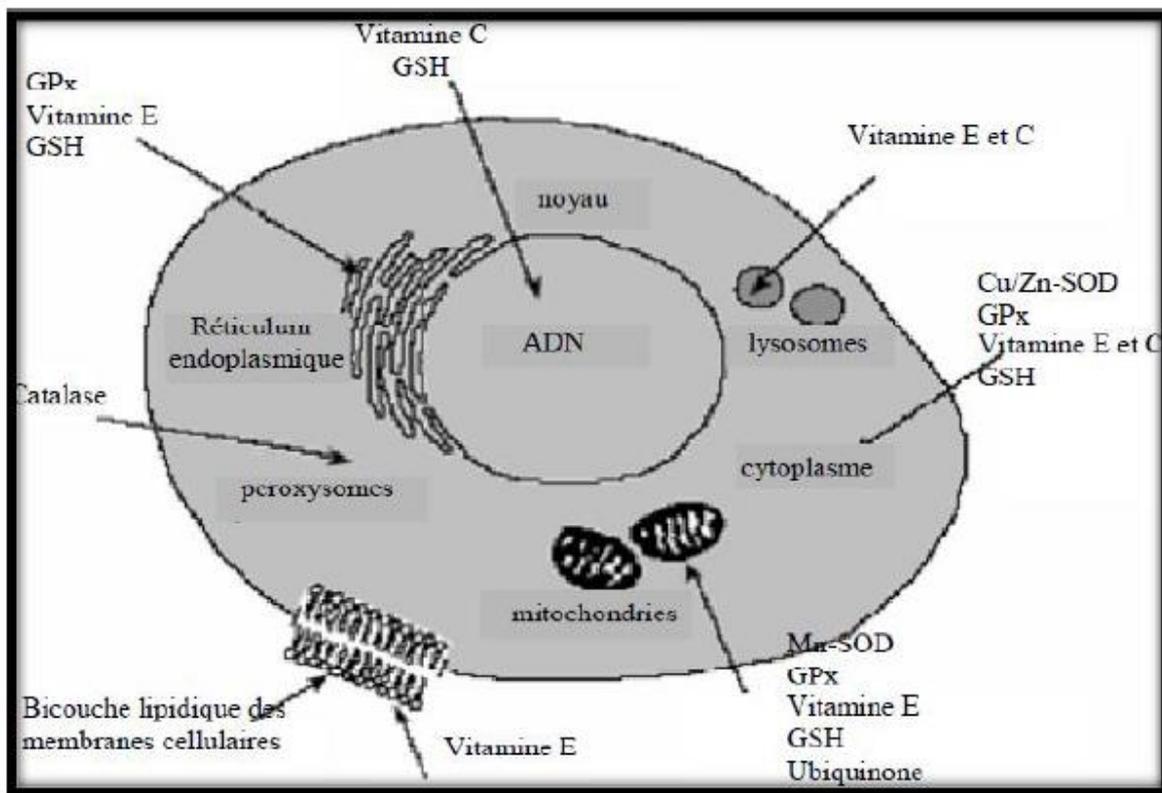


Figure18: Répartition des principales défenses antioxydants dans la cellule (Garait, 2006).

2.1. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent de différentes manières :

- ✓ Ils peuvent empêcher la formation directe des radicaux libres.
- ✓ Ils peuvent faire la liaison avec les radicaux libres et les détruire.
- ✓ Renforcer le système immunitaire de défense.
- ✓ Réparer les dommages résultants de radicaux libres. (Lamina *et al.*, 2013) .

2.2. Système antioxydant enzymatique

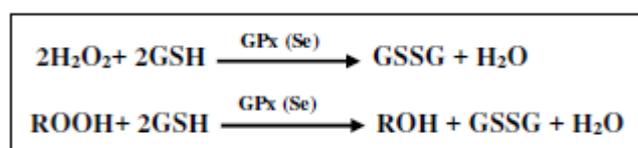
2.2.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine (Gasmi ., 2018).



2.2.2. Glutathion peroxydase (GPx)

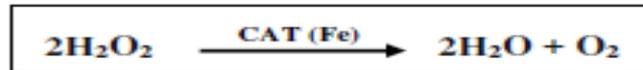
C'est la deuxième ligne de défense enzymatique, empêche la formation des radicaux libres, chez les mammifères. C'est une enzyme à sélénium présente dans le cytosol et la mitochondrie. Elle peut réduire d'une part l' H_2O_2 en H_2O et d'autre part les hydroperoxydes organiques(ROOH) en alcool (ROH) (Gasmi, 2018).



2.2.3. Les catalyseurs (CAT)

Le CAT est largement répandu dans les peroxysomes, les lysosomes et les mitochondries.

Il neutralise le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire. Cat et GPX avoir de faibles niveaux dans le cerveau par rapport aux taux de SOD, c'est pourquoi un effort Oxydant généré par un taux de métabolisme rapide peut induire des maladies neurodégénérative (Casetta et al., 2005).



2.3. Système antioxydant non enzymatique

2.3.1. Glutathion (GSH) et les protéines-thiols

Le glutathion réduit est un tripeptide caractérisé par la présence d'un groupement sulfidryle,

ce dernier est responsable de la réduction des radicaux libres (Gardès-Albert, et al., 2003), selon la réaction :



Le glutathion peut également réagir avec les ions Fe^{3+} et Cu^{2+} et ainsi limiter leur participation à la génération des radicaux libres par la réaction de Fenton :

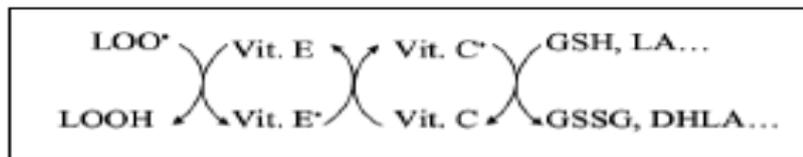


2.3.2. La vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA (HO• ou O₂•-). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer. (Gasmi., 2018)

2.3.3. La vitamine E

Chez l'homme le α -tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E, sa fonction principale est de protéger contre la peroxydation lipidique. Dans le système nerveux des mammifères, la vitamine E joue un rôle important et son insuffisance peut causer des maladies neurologiques (Atessahin et al., 2005). C'est une vitamine hydrosoluble importante et puissante à des concentrations très élevées dans le cerveau particulièrement dans les compartiments vésiculaires des neurotransmetteurs mono-aminergiques (Lee et al., 2004). Les réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines comme suivant :



Les systèmes producteurs de ROS et antioxydants doivent exister en équilibre pour maintenir les cellules neuronales dans un état fonctionnel normal et les prévenir des effets délétères des espèces radicalaires

2.3.4. Les oligoéléments

Des oligo-éléments participent également à la défense de l'organisme en permettant aux systèmes anti-oxydatifs protecteurs d'être constamment actifs pour faire face au stress oxydatif. Certains oligo-éléments sont nécessaires à l'activité d'enzymes qui vont lutter contre ce stress oxydatif. Parmi ces systèmes enzymatiques anti-radicalaires, on trouve notamment les superoxydes dismutase à cuivre et à zinc, ou à manganèse et les glutathion peroxydases séléno-dépendantes. Ainsi, le cuivre, le zinc, le manganèse et le sélénium sont appelés oligo-éléments antioxydants (Favier, 2006).

2.3.5. Ubiquinones et cytochrome c

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme

"Ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxylys. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Packer et al, 1997). Le cytochrome c présent dans l'espace inter membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\bullet-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du Cyt-c oxydé et de l' H_2O (Gasmi, 2018).

3. Les conséquences biologiques du stress oxydant

Seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant: mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2003**).

Partie

Pratique

I-Matériel et Méthodes

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche de toxicologie à l'université l'Arbi Tébessi-Tébessa. Et au cours de cette étude, nous sommes intéressés à évaluer l'effet e nanoparticules a base de l'oxyde de titane TiO_2 .

I-1-Matériel

I.1.1. Les animaux de laboratoire

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles *Rattus* de la souche Wistar au nombre de 18 rats, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 08 à 010 semaines pesant environ 160-240g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs. Largement utilisés dans divers domaines de la recherche expérimentale.



Figure19 : rats mâles *Rattus* de la souche Wistar

I.1.2. Produits chimiques

Dans ce travail, nous avons utilisé d'une part les nanoparticules à base dioxyde de titane pour le traitement des rats sous forme d'une solution.



Figure20: dioxyde de titane TiO₂

I.2. Méthode

1.2.1. Entretien des animaux

Les rats ont été répartis en trois (03) lots à raison six (06) rats par lot. Ils ont été soumis à une période d'adaptation de 30 jours dans l'animalerie de département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Tébéssa. La température ambiante est de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode naturelle 12/12H avec une hygrométrie de 60 %. Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène (06 rats pour chaque cage) qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages sont nettoyées et la litière est changée une fois par deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les animaux ont été nourris d'un concentré de croquets énergétiquement équilibré.

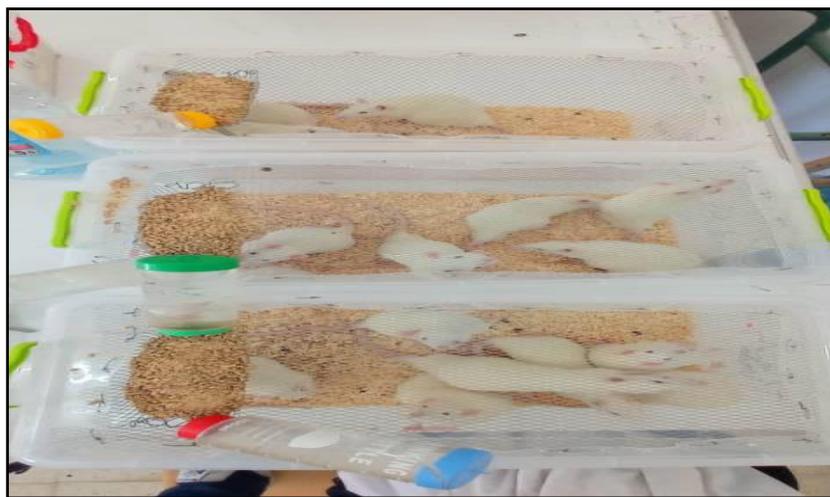


Figure21: photo représente les conditions d'élevage des rats.

I.2.2. Choix des doses et préparation du TiO₂

10000 mg de nano- TiO₂ ont été dissous dans 500 ml d'eau de robinet administrer par voie oral par un gavage intragastrique a l'aide d'une sonde de gavage, à des doses consécutives de 5000/100, 2150/100 mg/kg de poids corporel/jour pendant 90 jours à un volume de dose de 2.5, 1.25 ml/kg de poids corporel respectivement chez les lots (LOT 01, LOTS 02) a une dose quotidienne à peu près au même moment de la journée par gavage oral.



Figure22: le gavage intragastrique a l'aide d'une sonde

I.2.3. Répartition et traitement des rats

La répartition et le traitement des animaux est illustrés comme suit :

Lots Témoin	lot témoin (T) reçoit l'eau distillée par gavage 0,5ml/jour pendant 90jours
Lots L1 Dose 01	traités par TiO ₂ recevant 2,5 ml/kg/jour pendant 90jours.
Lots L2 Dose02	traités par TiO ₂ recevant 1,25 ml/kg/jour pendant 90jours (Figure 02/05).

Remarque : trois rats de chaque lot a été utilisé pour l'étude des mitochondries par l'oxygraph et les trois restants ont été utilisés pour les dosages des différents paramètres biologiques.

1.3. Evaluation de la neurotoxicité de dioxyde de titane

Après 3 mois de l'exposition des animaux aux nanoparticules de TiO₂, deux méthodes d'approches ont été appliquées pour évaluer l'impact de cette nanoparticule sur le neurocomportement des rats.

1.3.1 .Mesure de poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats tout jour pendant la durée d'élevage, soit au cours de l'adaptation (pour l'évaluation des changements possibles par la nourriture ou le lieu (facteurs externes)) ou au cours de traitement (pour évalue les effets des xénobiotiques) à l'aide de petit balance de 500g. Le poids relatif des cerveaux extraits des rats (PRR [g/100g de poids corporel]) est calculé par rapport au poids total du rat selon la formule suivant :

$$\text{PRR (g/100g de PT)} = \text{PR/PT} \times 100$$

PR : poids du cerveau (g).

PT : poids total de rat (g).

PRC : poids relatif des cerveaux (g)



Figure 23 : mesure du poids chez les rats

1.3.2 Etude neurocomportementale

I.3.2.1. Tests comportementaux

Cette approche ayant pour but d'évaluer les effets neurotoxiques induits par l'exposition aux polluants sur le comportement global des animaux en l'occurrence la mémorisation, l'apprentissage et l'anxiété, sous l'effet d'oxyde de titane Pour atteindre cet objectif, plusieurs tests ont été élaborés tels que : le test de la piscine de Morris, test d'Open Field, The light/dark test.

A. Test de la piscine de Morris

- **Principe du test**

La piscine de Morris (tenant son nom de Richard Morris qui l'a conçu en 1984), est un dispositif aquatique circulaire très utilisé en neurosciences comportementales pour évaluer la mémoire spatiale du rongeur. Le but de ce test est d'évaluer si les animaux sont capables de s'orienter et de nager rapidement vers une plate-forme, rendue invisible après opacification de l'eau, pour échapper à une situation aversive qu'est l'eau froide en s'aidant de repères visuels (Morris, 1984). Des signaux (plus, moins, points noirs, ...), sont répartis aux alentours de la piscine pour permettre à l'animal de se diriger vers la plate-forme plus facilement. La position de la plateforme reste inchangée (Daubié-Albanese, 2011).

- **Dispositif du Test**

Le dispositif adapté au souris est constitué d'un bassin circulaire en plastique, de 50 cm de diamètre et de 30 cm de profondeur, rempli d'eau à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sur une hauteur de 15 cm (**Figure 05**). L'eau est opacifiée avec du lait en poudre. La plate-forme mesurant 20 cm de diamètre est immergée à 1 cm sous la surface de l'eau et a été placée à équidistance du bord et du centre du bassin. Le bassin est virtuellement divisé en 4 quadrants et la plate-forme est placée au centre du quadrant nord-est. Des formes géométriques (plus, moins, points roses et verts), ont été disposées aux alentours du bassin (nord, est, sud, ouest respectivement), constituent des repères visuels permettant à l'animal de se repérer et de mémoriser l'emplacement de la plate-forme (Daubié-Albanese, 2011).

- **Procédure**

Le test a été réalisé sur 4 jours consécutifs d'entraînement suivi d'un test de mémoire. Nous avons commencé le test 5 jours avant le sacrifice des animaux. Dans chaque test, des rats ont été placés dans l'eau pour une durée de nage maximale de 3 minutes. Une fois les rats trouvent la Platform, ils y sont maintenus pendant 15 secondes. Si les souris ne trouvent pas la plateforme durant les 3 minutes, le test est terminé. Les rats ont été séchés à l'aide d'une serviette éponge et remis dans sa cage après chaque essai (Daubié-Albanese, 2011).

Vingt-quatre heures après la dernière séance d'entraînement, un test de la mémoire d'éréférence spatiale a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales avec opacification de l'eau (ajout de lait en poudre) pour rendre la plate-forme invisible.

- **Variables mesurées**

Les variables mesurées sont le temps nécessaire en seconde pour atteindre la plate-forme (Daubié-Albanese, 2011).

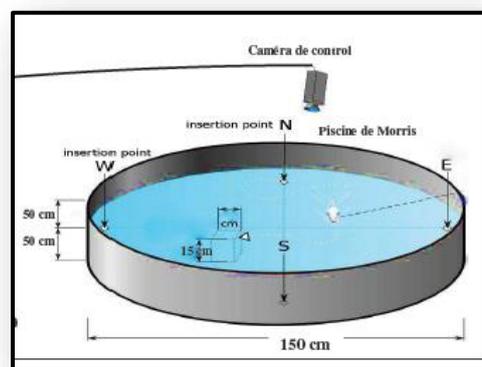


Figure24 :Les instruments du test de Piscine de Morris.

B. Test d'Open Field

- **Principe du test**

Le test d'Open-Field permet d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire ainsi que l'état émotionnel de l'animal (Zhang *et al.*, 2007). L'Openfield est caractérisé par les mouvements horizontaux et verticaux des animaux dans la cage d'expérimentation. L'Openfield constitue un environnement stressant pour le rat. Il s'agit en effet d'un animal

nocturne qui préfère les espaces confinés, clos et peu éclairés, et est effrayé par les grands espaces, où il va peu au centre et longe les murs(Daubié-Albanese, 2011).

- **Dispositif du Test**

L'Openfield utilisé était une boîte transparente en verre carrée et ouverte (50×50×40cm)

- **Procédure**

L'observation des souris commence quelques secondes après l'introduction des souris dans la cage d'observation. Une souris anxieuse évite le centre du terrain qui est ouvert, et reste à la périphérie. Chaque souris était initialement placée dans le coin supérieur gauche (Carré n°1 dans la photo), la tête orientée vers le coin. Son comportement a été observé pendant 3 minutes pour mesurer la distance parcourue, entre chaque essai on nettoie la cage avec l'éthanol 10%.

- **Variables mesurées**

La variable qui peut être mesurée est le nombre redressement réalisés par l'animal.

C. Test the light/dark test

- **Principe du test**

Le test Dark-light est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les endroits lumineux.

- **Dispositif du Test**

Le dispositif comprend deux compartiments un compartiment sombre (box noire fermé) et un autre lumineux (box blanc ouvert) séparés par une cloison dans laquelle il y a une ouverture centrale.

- **Procédure :**

Les souris ont été individuellement placées au milieu du compartiment sombre. Leur comportement est enregistré pendant 5 minutes en prenant en considération le nombre d'entrées dans le compartiment lumineux et le temps passé dans ce dernier.

- **Variables mesurées**

Mesure le nombre d'entrées dans le compartiment lumineux et le temps passé dans le compartiment sombre.

I.4. Etude de la toxicité de TiO₂

I.4.1. Sacrifice et extraction du cœur

A la fin de la période d'administration de TiO₂, les rats sont sacrifiés après un prélèvement sanguin intracardiaque et les cerveaux ont été rapidement prélevés et rincés dans le tampon de lavage à froid, puis séchés par un papier semi absorbant. Les échantillons à conserver à -80°C pour le dosage des paramètres biochimiques (protéines, lipides, glucides) et du stress oxydatif tels que le GSH, GST, GPx, CAT et MDA.



Figure 25 : Sacrifice et prélèvement de cerveau

I .4.2. Détermination de la Formule de Numérotation Sanguine

L'hémogramme ou numération de la formule sanguine (FNS) permet de comptabiliser tous les éléments du sang : globules rouge (hématies), globules blanc (leucocytes) et les plaquettes. Cet examen permettant d'apprécier des paramètres qualitatifs du sang, est l'un des examens biologiques les plus courants prescrit dans le cadre d'un bilan sanguin. Il permet d'évaluer l'état de santé général de l'animal en cas de suspicion d'anémie ou d'infection, ou pour vérifier l'état nutritionnel et l'exposition à des substances toxiques.

L'hémogramme automate est réalisé par l'appareil électro médical (compteur coulteur); il ne demande aucune intervention manuelle pour l'aspiration de l'échantillon. Les dilutions, les mesures ; les calculs, l'affichage et la sortie des résultats. La dilution se fait automatiquement à partir d'un sang total prélevé sur EDTA dans un liquide isotonique et tamponné, dépourvu de particules.

I .5.Evaluation des paramètres biochimiques

I .5.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959)** L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100ul d'homogénat dans des tubes à essai puis à ajouter 4ml d'Anthrone (dissoudre 150mg d'Anthrone dans 75ml d'acide sulfurique puis ajouter 25ml d'eau distillée, couleur verte, stockée à l'obscurité) ,en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 80°C pendant 10 min . Après refroidissement, on procède à la lecture à une longueur d'onde de 620nm. Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose.

I .5.2. Dosages des lipides

Les lipides tissulaires sont évaluée selon la méthode, **(Goldsworthy et al., 1972)** on utilise 100µl d'homogénat dans 1ml de TCA 20% (20g TCA+100ml d'eaux distillée), on broyé et ont filter ce mélange ; et directement ont appliqué une centrifugation à 5000tours/min pendant 10min. Le culot est gardé dans tube contient 100ml du mélange Ether/Chlorophorme, et après centrifugé ce mélange a 5000tours/min pendant 10min, on prélève 100µl du surnageant, auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et en met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophosphanillinique à 85% (0.38g vanilline+195ml acide orthophosphorique+55ml H2O) et laissé ce mélange 30min à l'obscurité, la lecture à une longueur d'onde 530nm. Le calcul

des concentrations réelles se fait à partir de l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol (**Annexes**).

I.5.3. Dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de (**Bradford, 1976**) qui utilise la BSA comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (10%) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (100mg BBC +50ml d'éthanol à 95%+ 100ml d'acide phosphorique à 85% et on complète à 500ml avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm. Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf

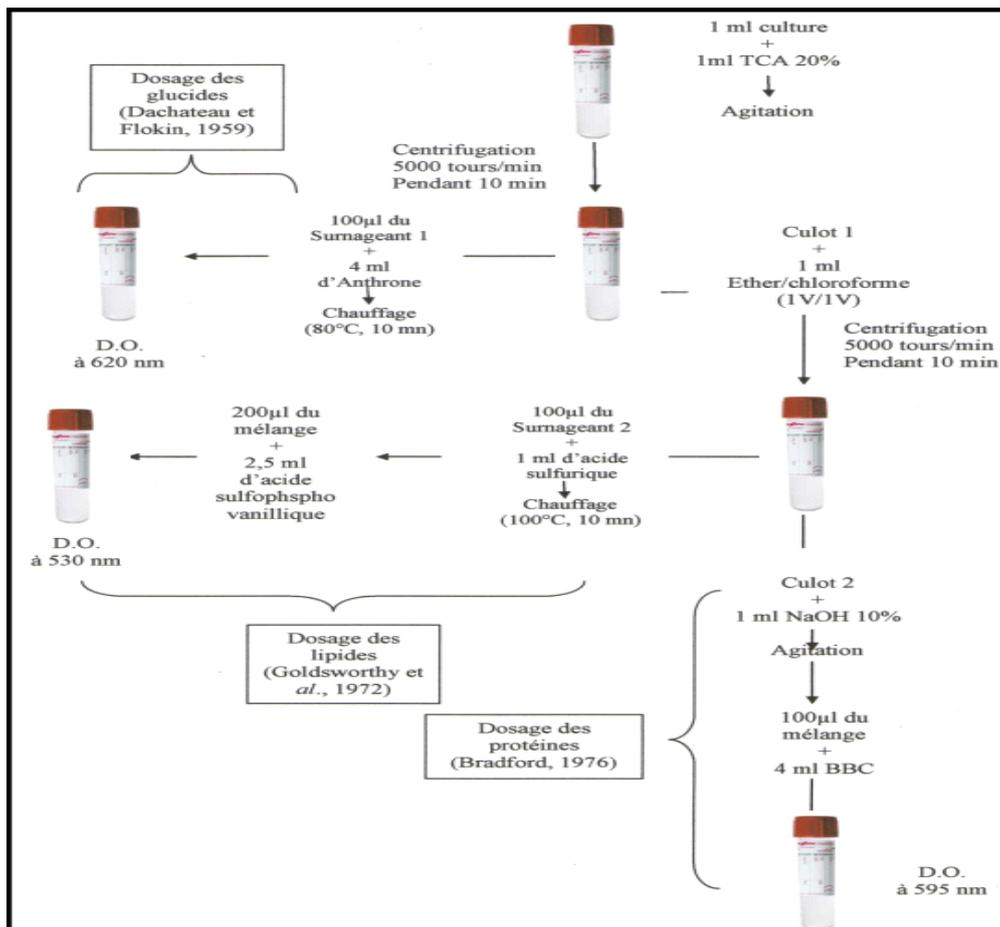


Figure 26 : protocole de dosage (Protéines, Lipides, Glucides)

I.6.Evaluation des paramètres de stress oxydatif

I .6.1.Dosage du MDA :

1/Préparation de l'homogénat et solutions

- 1/200 mg d'organe broyer a froid dans 2 ml de tampon TBS
- TBS ph= 7.4 (ajuster par NAOH ou HCL)

Dissoudre 8.775 (1.755) g NaCl dans 1l ED (200ml)

Poser 6.057g (1.2114) Tris et compléter le volume a 1ml (200) par la solution NaCl préparer avant

- 2/TCA-BHT = déposer 20g TCA dans un becher et compléter par 100 ml ED après poser 1g de BHT dans un b cher et compléter par solution TCA a 100 ml agiter a chaud
- 3/HCL (0.6M) = dans un b cher déposer 1 ED (10ml) puis verser délicatement 51.56 ml (515  l) HCL
- 4/ tris-TBA = déposer 3.149 (0.09447) g Tris dans 1L (30 ml) ED après déposer 17.299 (0.51897) g de TBA dans un becher et compléter par la solution Tris jusqu'à 30 ml

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de **(Buege and Aust, 1984.)**. Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment rose. Une quantité de 375 l de surnageant est prélevée dans un tube sec, auquel est ajouté un volume de 150 l de la solution TBS (tris 50mM, NaCl (150mM ; pH7.4) et 375 l de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%), le mélange est Vortex  et centrifugé à 1000t/min pendant 10min. Un volume de 400 l est prélevé du surnageant auquel on ajoute 80 l du HCL 0.6M et 320 l de la solution tris-TBA (Tris 26mM, TBA120mM). En fin, le mélange est vortex  et est ensuite incubé au bain marie à 80 C pendant 10minutes. La lecture de la densité optique des échantillons est mesurée par spectrophotométrie à 530 nm.

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

$$[C] \left[\frac{\text{nmo}^l}{\text{mg}} \text{ de protéines} \right] = \frac{DO \times 10}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

- **C** : la concentration en nmole/mg de protéines.
- **DO** : densité optique lue à 530 nm.
- **ϵ** : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1,56.10⁵ M⁻¹/cm.
- **L** : Longueur de la cuve utilisée (1cm).
- **X** : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- **Fd** : Facteur de dilution (Fd = 0.2083).

I.6.2. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)

1/Préparation de l'homogénat et solution

1/ 200 mg d'organe broyer a froid dans 2 ml de tampon phosphate **TP 1** (0,1 M ; pH 6) **avec saccharose**

- TP = (A) = 17.9g **NA₂HPO₄** dans 500ml ED

(B) = 6.9 g **NAH₂PO₄** dans 500ml ED

-TP = 61.5 ml (A) +438.5ml (B) + 21.39 g

TP 1= 100 ml + Saccharose ----- PH = 6

TP 2= 100 ml sans saccharose

2/ CDNB/ GSH = dissoudre 20.26 mg CDNB + 153.65 mg GSH dans 1ml d'éthanol absolu + 100 ml tampon phosphate **TP 2** (0,1 M, pH 6) **sans saccharose**(préparer le même jour de dosage).

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2,4-dinitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraine la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Dinitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST. La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST .Les échantillons sont homogénéisés dans 1ml de tampon phosphate (0.1M, pH6). L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM). La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15sec à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

I.6.3. Dosage de glutathion (GSH)

1/Préparation de l'homogénat et solutions

- -(200mg de tissu) dans 8 ml de solution d'EDTA à 0,02 M Le mélange mis dans des glaçons est broyé
- -EDTA = [7,448 g EDTA, 1000 ml eau distillée]
 - ASS (l'acide sulfosalicylique) = [0,25 g ASS, 100 ml eau distillée]
- -tampon tris/ EDTA = (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] **PH=9.6**
 - **DTNB** [3,96 g (**200 mg**) DTNB, 1000 ml (**50ml**) méthanol absolu].

I.6.4. Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de (Weckbeker et Cory, 1988).

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique, ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'échantillon (cytosol/matrice) doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion. Brièvement ; les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 0,8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0,02M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. L'homogénat est ensuite déprotéinisé en prenant 0.8ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) à 0.25%. Le mélange est vortexé et laissé pendant 15min dans un bain de glace, et centrifugé ensuite pendant 5min à 1000tours/min. 0.5ml du surnageant est prélevé auquel est ajouté 1ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), pH 9.6. Au mélange est ajouté 0.025ml de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu. Le mélange est laissé reposer pendant 5min à température ambiante et l'absorbance (A) est mesurée à 412nm.

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

$$\text{GSH} \left[\text{M} \frac{\text{GSH}}{\text{mg}} \text{ GSH/mg des protéines} \right] \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5}$$

- **DO** : la densité optique.
- **1**: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml de l'homogénat + 0,2ml de l'acide salicylique).
- **1,525** : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).
- **13100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à 412 nm) .
- **0,8** : Le volume de l'homogénat.
- **0,5** : Le volume du surnageant trouvé dans un 1,25ml

I.6.5. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

1/Préparation de l'homogénat et solutions

- 200 mg d'organe dans 2ml de tampon phosphate PH=7.4
- GSH = (0,1mM) (3.073 mg GSH + 100ml ED)
- la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4)
- H₂O₂ = (1, 3 mM) (36 ml H₂O₂+ 100 ml ED)
- TCA = (1g + 100 ml ED)
- NA₂HPO₄ =
- DTNB = 100 mg dans 250 méthanol absolu

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**, en utilisant H₂O₂ comme substrat. Un volume de 0.2ml de cytosol/matrice est récupéré dans un tube contenant 0.4ml de GSH 0.1mM et 0.2ml de tampon phosphate 0.067M, pH 7.8. Le mélange est incubé au bain marie à 25°C pendant 05min. 0.2ml d'H₂O₂ 1.3mM est ajouté pour initier la réaction. Après 10min 1ml de TCA 1% (acide tri chloro-acétique) est rajouté dans le but d'arrêter la réaction et le mélange est mis dans la glace pendant 30min et centrifugé durant 10min a 3000t/mn. Un volume de 0.48 ml de surnageant est placé dans une cuve auquel on ajoute 2.2ml de Na₂HPO₄ 0.32M avec 0.32ml de DNTB 1mM. Ce mélange formé un composé coloré et sa densité optique est mesurée à 412nm chaque 30sec pendant 05min.

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

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

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

I.6.6. Dosage de l'activité Catalase □ CAT □

1/Préparation de l'homogénat et solutions

-200 mg Echantillon broyer dans 2 ml de tampon phosphate (100 Mm, pH 7.4) centrifugés à 3000 tours/10mn,

-H₂O₂ (0.3ml + 100ml ED)

Le dosage spectrophotométriques de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de **Cakmak et Horst (1991)**. La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon=39400 \mu\text{M}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl de l'extrait enzymatique brut, 50 μl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3% et 2850 μl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

II. Analyses statistique

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme (moyenne \pm écartype), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft office 2013. Nous avons déterminé les paramètres statistiques pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance avec un taux de signification de $\alpha \leq 0.05$, et comparés par rapport aux témoins par test de dunnnett et tukay. Ces calculs ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB® 18.01.

❖ le résultat de comparaison comme suivant :

- **p > 0,05** = la différence n'est pas significative,
- **(*) 0,05 > P > 0,01** = la différence est significative,
- **(**) 0,01 > P > 0,001** = la différence est hautement significative,
- **(***) P < 0,001** = la différence est très hautement significative

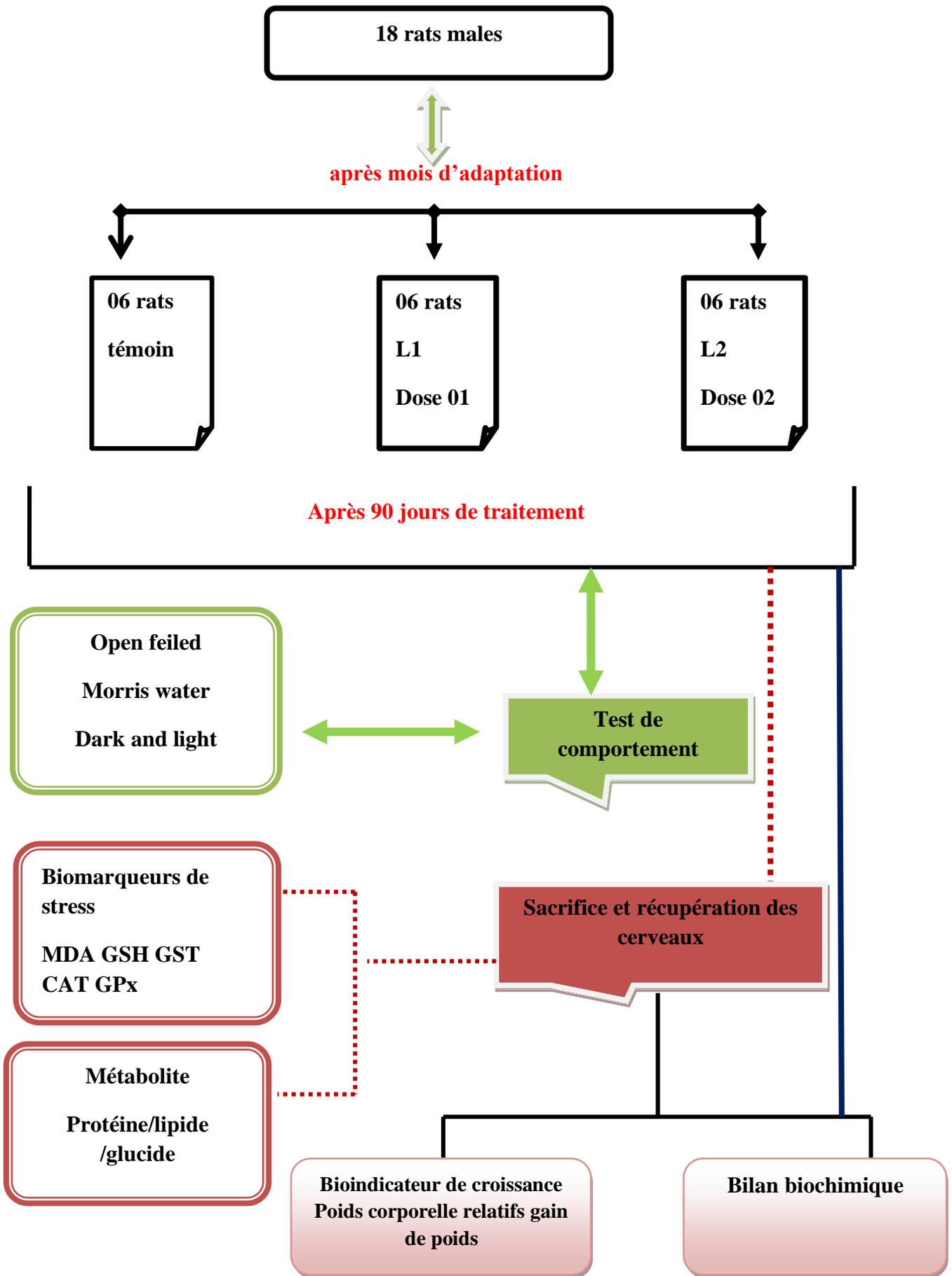


Figure27 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

Résultats

1. Effet du TiO₂ sur les paramètres de la croissance globale des animaux

Les résultats de l'évaluation des paramètres de croissance en termes de poids corporel, et le poids relatif durant les 28 jours de traitement des différents groupes d'animaux, sont représentés dans les figures 27 et 28.

1.1 Poids corporel

Pour le suivi des changements des poids corporels chez les rats témoins et les rats traités. Nous constatons une diminution hautement significative ($P < 0,01$) des rats traités au nano-TiO₂ (0.5 mg/kg/jour) par rapport aux rats témoins. D'autre part on observe qu'il y a une diminution significative ($P < 0,05$) des rats traités de nano-TiO₂ (0.25 mg/kg/jour) en comparaison avec les rats témoins.

Tableau 03: Variation de poids corporel chez les différents groupes expérimentaux.

Lots expérimental	témoin	Lot 1 (1.25 ml/kg)	Lot 2(2.5ml/kg)
Poids corporelle (g)	(242,75± 31,91)	(233± 28,16)	(217,5± 31,82)

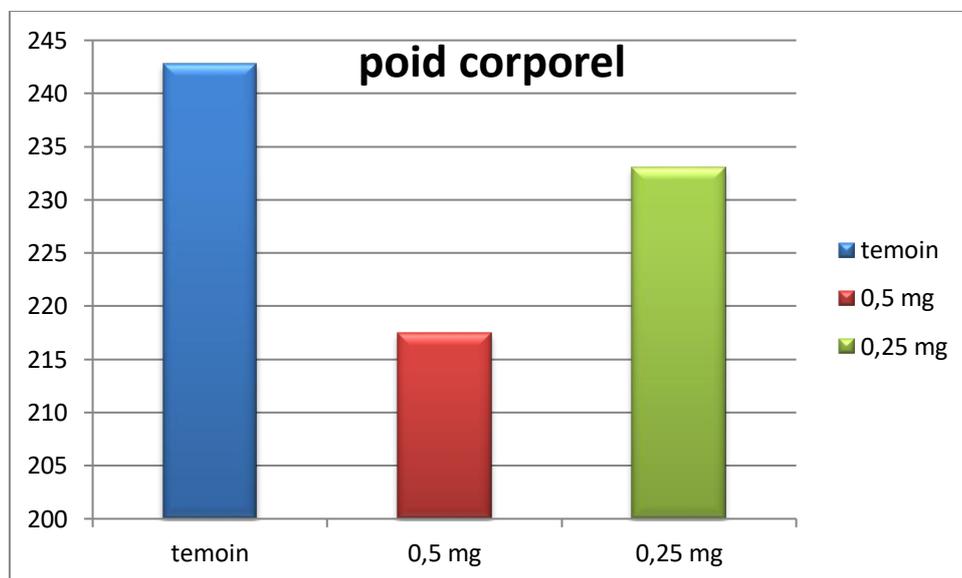


Figure 28 : Changements des poids corporels chez les rats témoins et traités par TiO₂, après 90 jours de traitement

1.2. Poids relatif du cerveau (PRP)

Pour le suivi des changements des poids relatif du cerveau des rats pendant la période du traitement. Nos résultats montrent, d'une part, une augmentation non significative ($P > 0,05$) du poids relatif du cerveau dans le lot 01 (0.5mg/kg/jour) traité au dioxyde de titane TiO_2 par rapport aux rats témoins et d'autre part nous observons qu'il y a une diminution hautement significative ($P < 0,01$) chez le lot traitée par TiO_2 NPs à dose (0.25mg /kg/jour) par rapport au groupe témoins.

Tableau 04 : Variation de poids relatif chez les différents groupes expérimentaux.

Lots expérimental	témoin	Lot 1	Lot 2
Poids relatifs de cerveau (mg)	(0,41± 0,04)	(0,41 ± 0,04)	(0,40 ± 0,10)

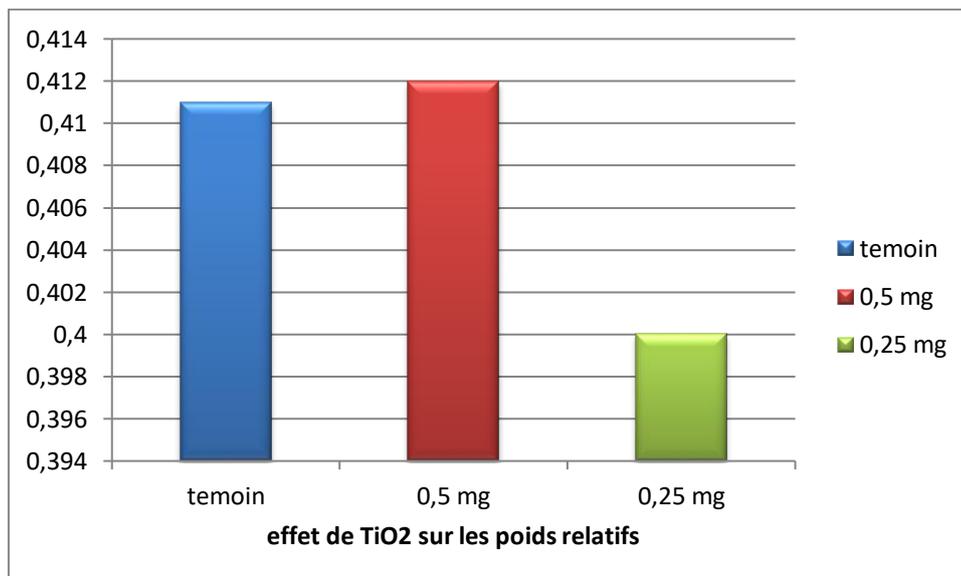


Figure 29 : évaluation des poids relatif du cerveau chez les rats témoins après 90 jours de traitement

2. Effet du TiO₂ et la curcumine sur les paramètres biochimiques dans les poumons chez les rats

2.1. Effet sur le taux des glucides

La variation du taux des glucides dans les cerveaux chez les rats témoins et les rats traités sont représentées dans la figure 29.

Les résultats obtenus montrent une diminution en glucide avec une différence significative ($p < 0.05$) chez le lot 01 (0.25 mg/kg/jour) comparé par le témoin et on constate une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les rats traités par TiO₂ lot 02 de dose (20.5 mg/kg/jour).

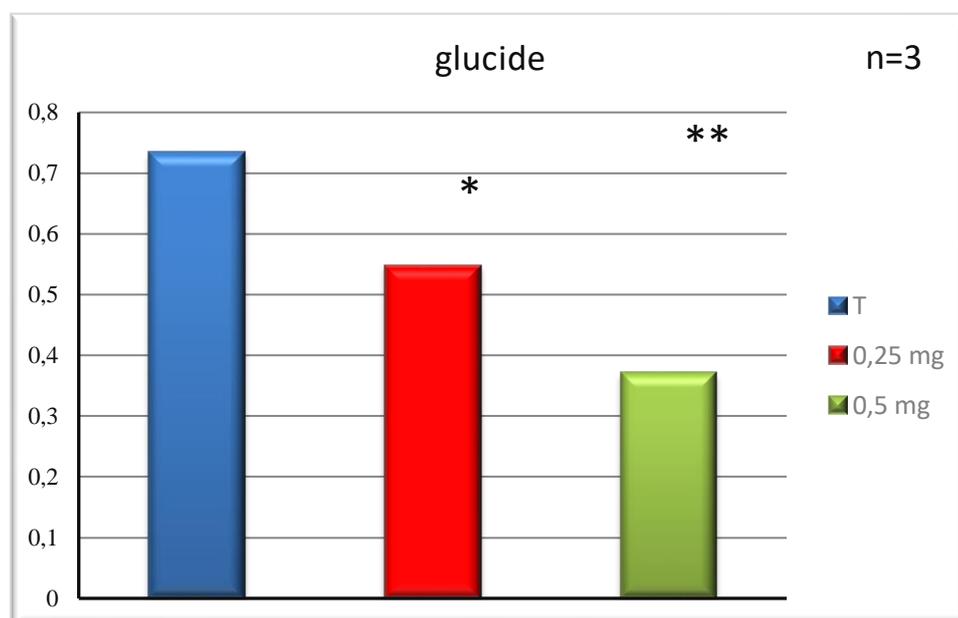


Figure 30 : Variation de la teneur de cerveau en glucides chez les rats témoins traités par TiO₂ après 90 jours de traitement

2.2. Effet sur le taux des lipides

Variation de la teneur de cerveau en lipide chez les rats témoins, traités par TiO₂ représenté dans la figure 30.

Les analyses statistiques obtenues enregistrent une diminution hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les rats traités par TiO₂ NPs à dose (0.5 mg/kg/jour) et une diminution significative ($p < 0,05$) chez les rats traités par TiO₂ NPs à dose (0.25 mg/kg/jour) comparé par le lot de témoin.

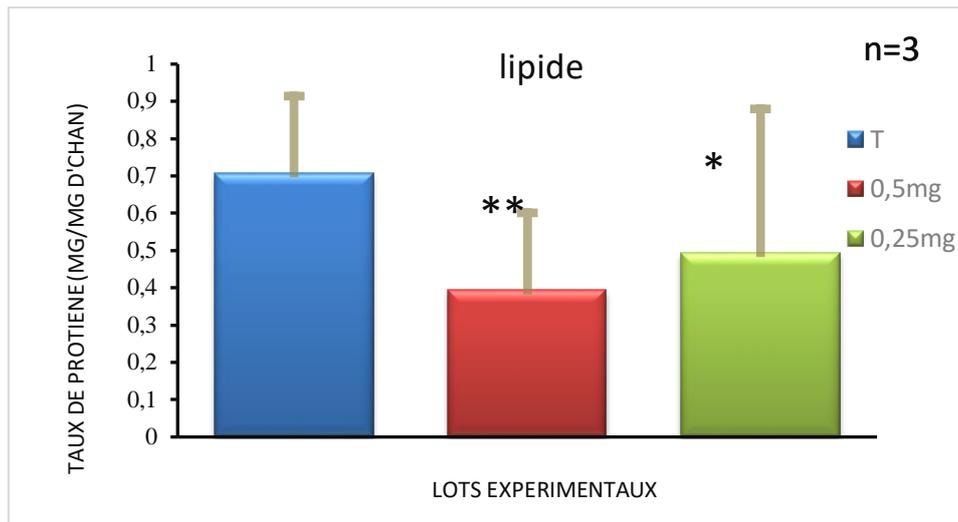


Figure 31: Variation des taux de lipide de cerveau chez les rats témoins et traités par TiO₂, après 90 jours de traitement

2.3. Effet sur le taux des protéines

Selon les résultats de la figure 31 le xénobiotique étudié (NPs de dioxyde de titane) a provoqué une augmentation de taux des protéines hautement significative (supérieure) ($p \leq 0,01$) chez les rats traités avec le nano-TiO₂ (0.5 mg/kg/jour) à celui du groupe témoin. Par contre on observe une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez le lot traités de TiO₂ (0.25 mg/kg/jour) par rapport au groupe de témoin.

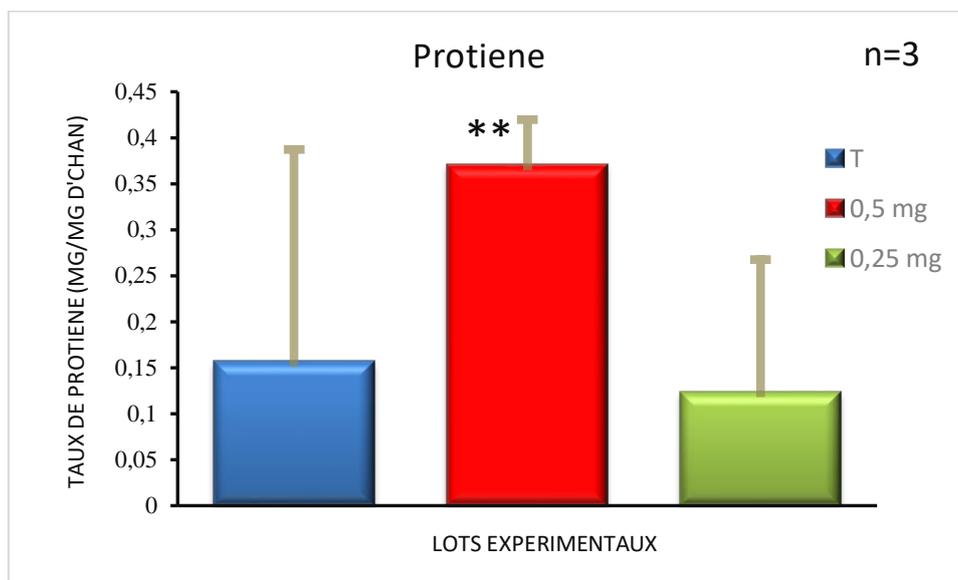


Figure 32: Variation des taux de protéine de cerveau chez les rats témoins et traités par TiO₂, après 90 jours de traitement

3. Effet du TiO₂ sur les paramètres de stress dans le cerveau chez les rats

3.1. Effet sur les paramètres non enzymatiques

3.1.1. Effet sur la teneur en MDA

Notre résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les rats de lot 01 (2.5ml/mg/jour) comparé par le témoin. Par contre on a marqué une diminution significative ($p \leq 0,05$) chez le groupe des rats lots 02 (1.25ml/mg/jour) par rapport au groupe de témoin

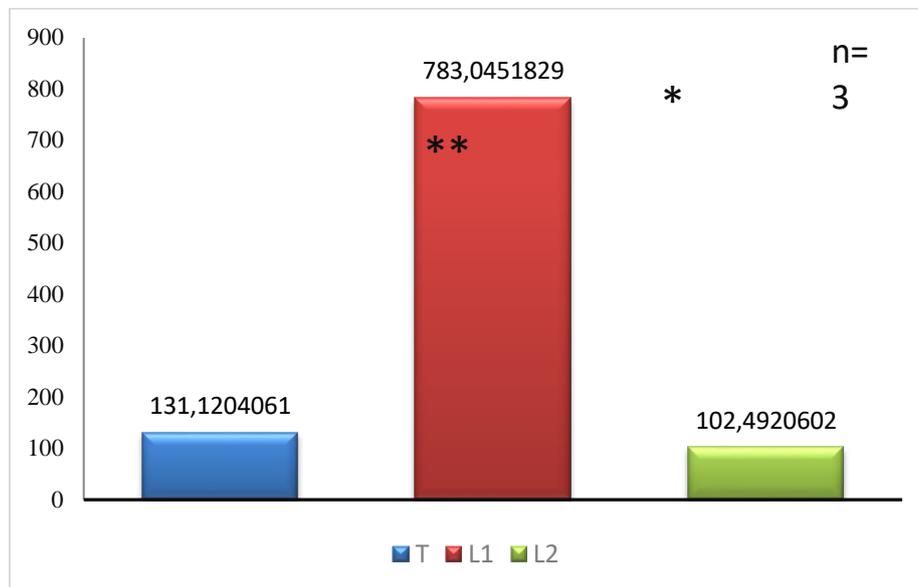


Figure 33 : Variation du taux de MDA chez les rats témoins après 90 jours de traitement

3.1.2. Effet sur le taux de GSH

La variation de taux de GSH de cerveau chez les rats traités et témoins est présentée dans la figure 33.

La présente étude sur l'effet de la dioxyde de titane TiO₂ montre une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) de taux de GSH chez les groupes traités par la dioxyde de titane

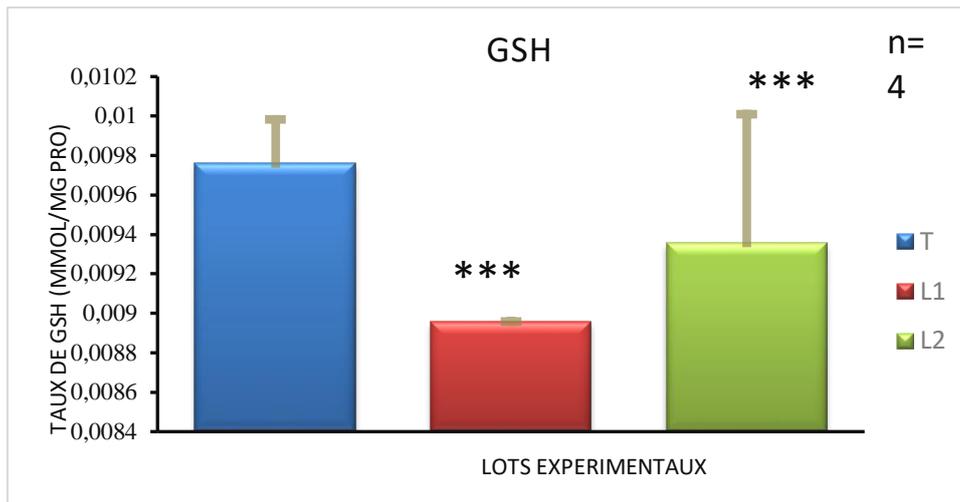


Figure34 : Variation de teneur de cerveau en GSH chez les rats témoins et traités par TiO₂ après 90 jours de traitement

3.2. Effet sur les paramètres enzymatiques

3.2. 1.Effet sur l'activité de GPx

La figure 34 présente la variation de l'activité enzymatique de GPx dans le cerveau des rats témoins et traités par TiO₂.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($p \leq 0,05$) au niveau de lot 01(1.25ml/kg/jour) et une autre hautement significative ($p \leq 0,01$) au niveau de lot 02(2.5ml/kg/jour) comparé au témoin

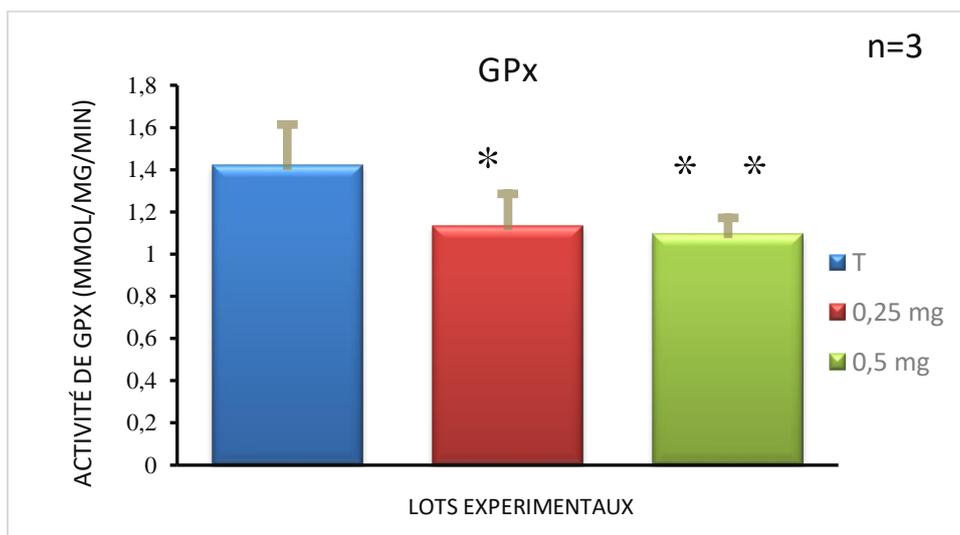


Figure34 : Activité enzymatique de GPX de cerveau chez les rats témoins et les rats traités parTiO₂ après 90 jours de traitement.

3.2.2. Effet sur l'activité de Catalase

Les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative ($p \leq 0,01$) chez les rats de lot 01 (0.25mg/kg/jour) comparé par le témoin. D'autre part une diminution très hautement significative ($p \leq 0,001$) chez les rats de lot (0.5mg/kg/jour) par rapport le groupe de témoin.

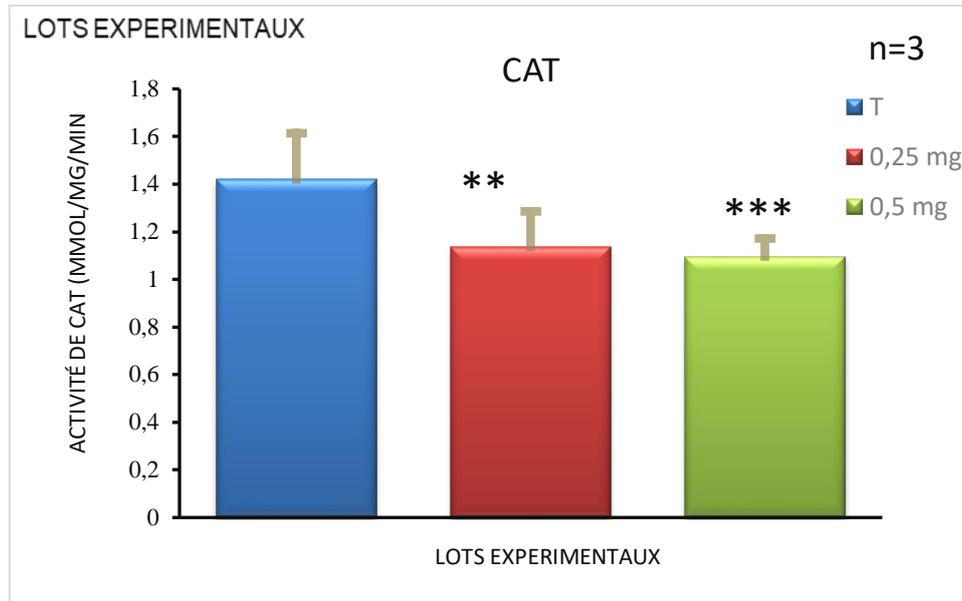


Figure 35 : Activité enzymatique de CAT de cerveau chez les rats témoins et traités par après 90 jours de traitement

3.2.3. Effet sur le taux de GST

La variation de taux de GST chez les rats traités et témoins est présentée dans la figure 10. La présente étude sur l'effet de dioxyde de titane montre une augmentation hautement significative ($p \leq 0,01$) de taux de GST chez le groupe traités par le dioxyde de titane (0.5mg/g/jour) par rapport au témoin. Le reste de lot qui a traités de nano-TiO₂ (0.25mg/kg/jour) ne montre aucune variation significative de GST comparé au témoin.

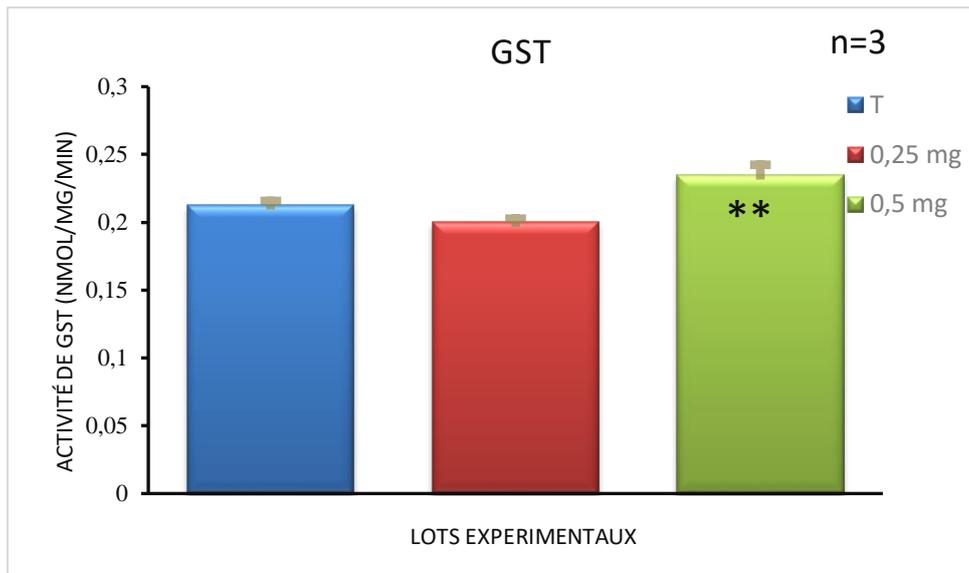


Figure36 : Activité enzymatique de GST de cerveau chez les rats témoins et traités par après 90 jours de traitement

4. Effets de nanoparticule de dioxyde de titane sur le neurocomportemental chez le rat

4.1. Effet sur le Test de «Open Field »

Les variations du nombre de redressements effectués par les rats témoins est traités sont présentées dans la **Figure37**.

Nos résultat présente une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$).du mouvement des rats traités par dioxyde de titane avec des doses différentes dans la zone central par rapport aux témoins.

D'autre part ont observe qu'il y a un augmentation hautement significative ($P < 0,01$). du mouvement des rats traites par TiO_2 (0.5mg/kg/jour) dans la zone périphériques, chez les rats traités par la nano- TiO_2 (0.25mg/kg/jour) on a enregistré également une augmentation très hautement significative dans la zone périphérique en comparaison avec le témoin ($P < 0,001$).

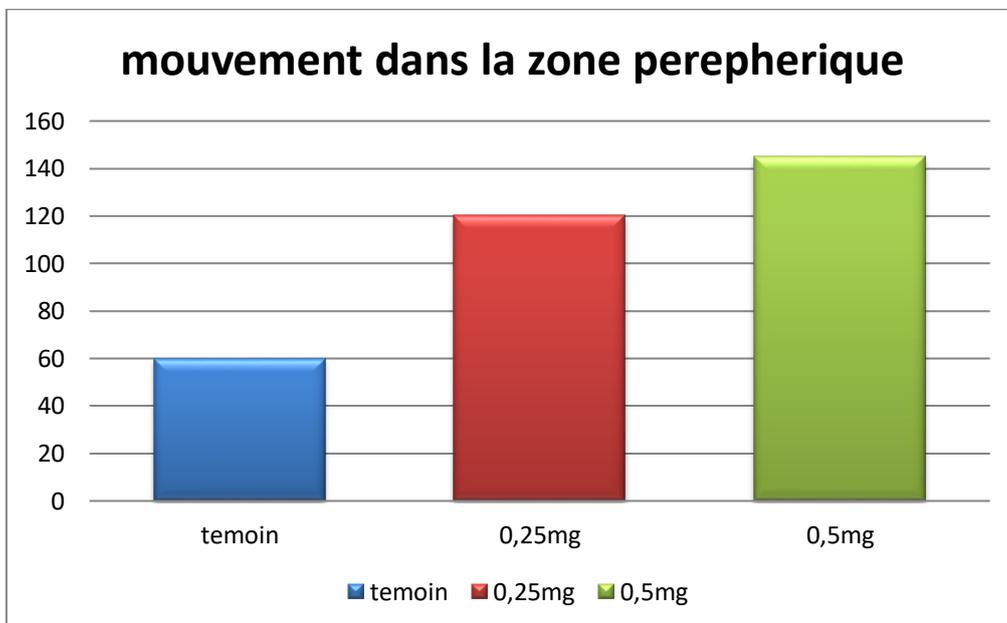
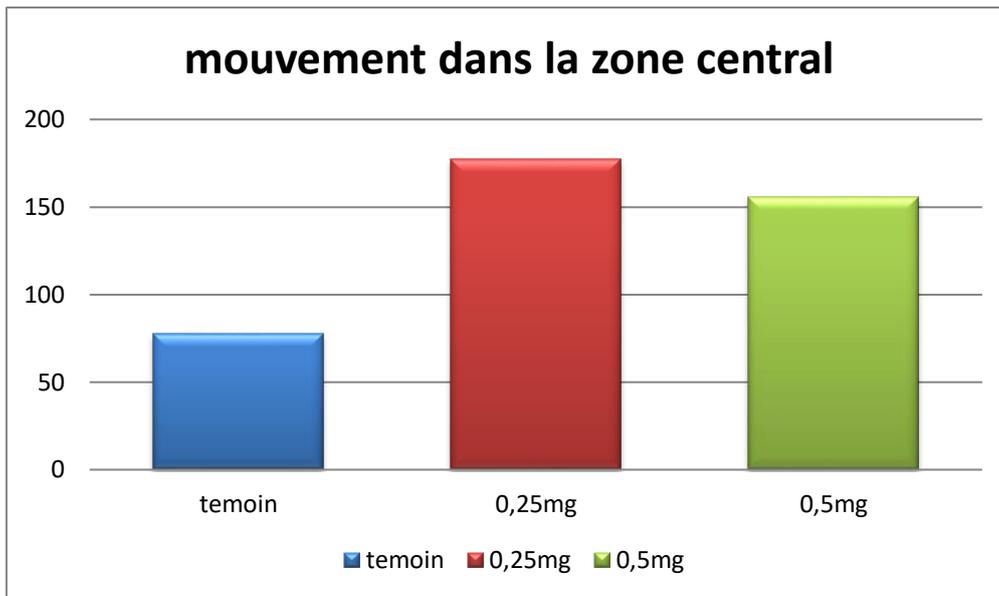


Figure37 : Variations du temps rearing enregistré chez les rats témoins et traités après 90j de traitements.

4. 2.Effet sur le test de Piscine de Morris

Les variations du taux moyen de temps écoulé (s) pour atteindre la plateforme dans la piscine de Morris chez les rats témoins et traités sont présentées dans la **Figure38**.

Nos résultats montrent que l'administration de nanoparticule TiO_2 (Lot01 0.5mg/g/jour) provoque une augmentation hautement significative du temps moyen de la nage ($P < 0,01$) par rapport aux rats témoins. Par ailleurs, chez le lot 02 traité (0.25mg/g/jour), nous avons enregistré de une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) du temps de la nage en comparaison avec le témoin.

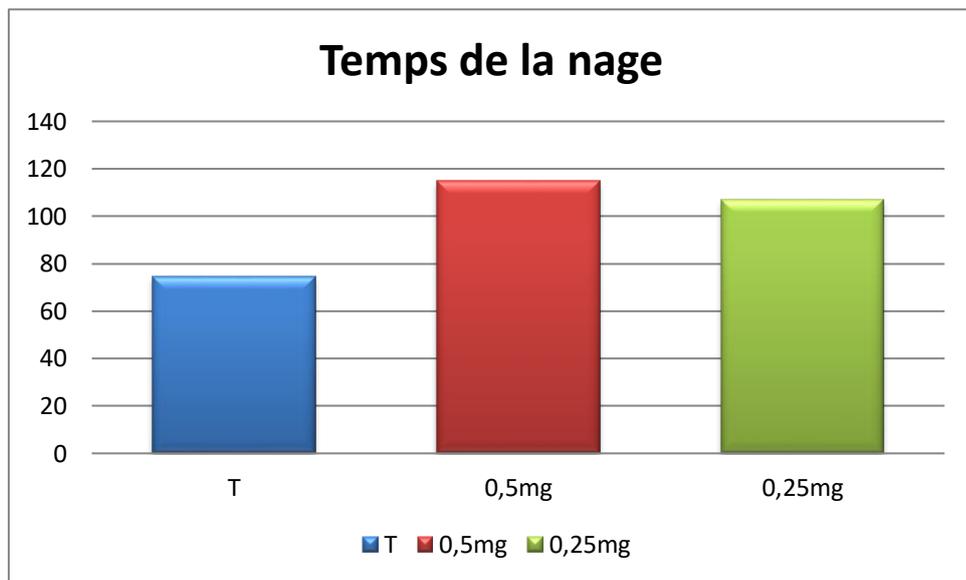


Figure38 : Variations du temps passé dans la piscine de Morris (s) chez les rats témoins et traités après 90j de traitements.

4. 3. Effet sur le test de Dark –Light

Les variations du temps moyen passé dans le box noir(s) chez les rats témoins et traités sont représentées dans la **Figure 39**.

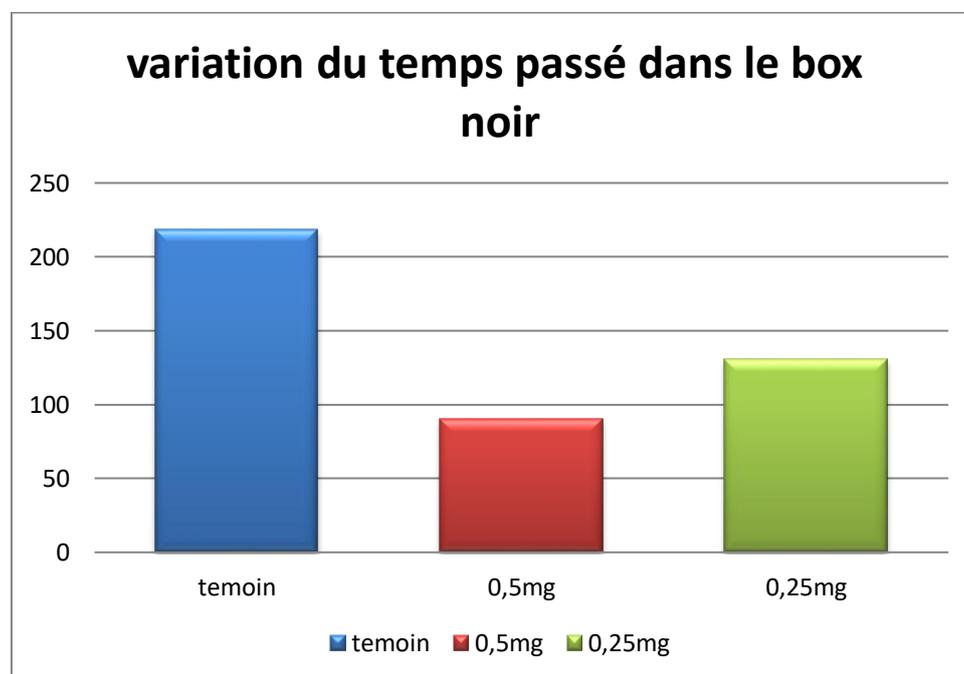
Nos résultats signalent une diminution très hautement significative ($P < 0,001$) du temps moyen passé dans le compartiment noir chez le lot traité par les nano- TiO_2 Lot 01 (0.5mg/kg/jour) comparée aux témoins par contre on observe qu'il ya une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) dans la lumière par rapport aux rats témoins.

L'administration de TiO_2 Lot 02 (0.25mg/g/jour) est associée à une diminution hautement significative ($P < 0,01$) du temps moyen passé dans le box noir comparée aux

témoins ,et on a enregistré une augmentation hautement (P <0,01) significative du temps m passé dans la lumière en comparaison au témoin.

Tableau 05 : les variations du temps passé dans le box noir et avec la lumière chez les rats témoins et traités avec deux doses différentes (0.5mg/kg/jour et 0.25mg/kg/jour).

témoin		Dose 0.5mg/kg/jour		Dose 0.25mg/kg/jour	
noir	Lumière	Noire	lumière	noir	lumière
225	115	107	233	140	200
251	89	60	240	166	174
180	120	103	237	86	201
Moyenne noir =218.666667		Moyenne Noir=90		Moyenne Noir=130.667	
Moyenne Lum=108		Moyenne Lum=236.66		Moyenne Lum=191.66667	
Ecart noir= 35.9212101		Ecart noir=26.05762		Ecart noir = 40.8084	
Ecart Lum=16.643317		Ecart Lum=3.51188		Ecart Lum= 15.30795	



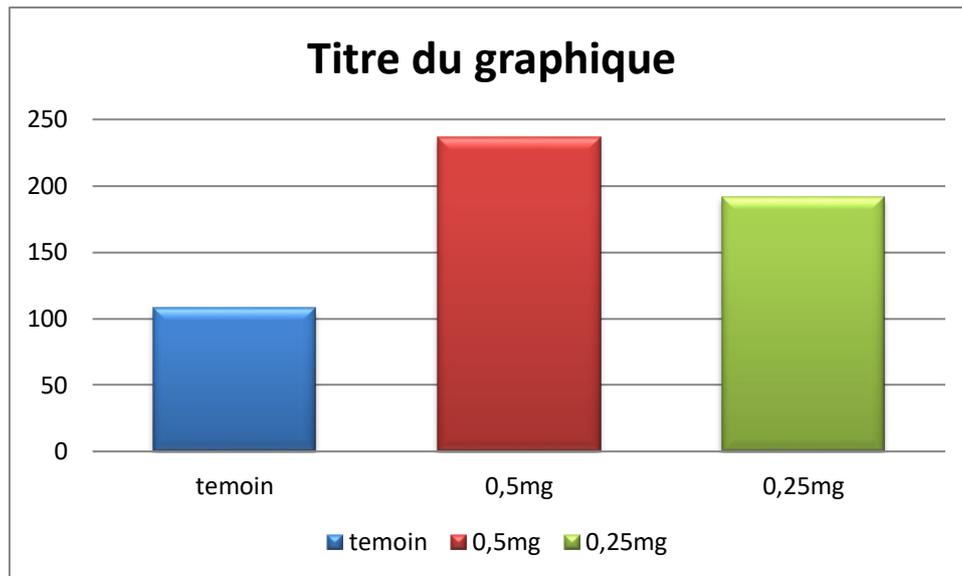


Figure39 : Variations du temps passé dans le box noir et la lumière (test Dark-Light) chez les rats témoins et traités après 90j de traitements

5. Evaluation des paramètres biochimiques (urée ; créatinine ; Bilirubine)

Les résultats représentés dans le **tableau(05)** montrent que l'administration de TiO_2 NPs induit une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) chez les lots traités par TiO_2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) du taux d'urée et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les rats traités par TiO_2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoin. Et une diminution significative ($p < 0.05$) du taux de créatinine chez les lots traités par TiO_2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une diminution hautement significative ($p < 0.01$) chez les rats traités par TiO_2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoin. Et aussi une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) du taux de Bilirubine chez les lots traités par TiO_2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les rats traités par TiO_2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoin.

Tableau06: Concentration de Bilirubine urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètre	Groupes des rats		
	Témoin	TiO ₂ (2,5 ml/kg/jour)	TiO ₂ (1,25 ml/kg/jour)
urée (g/l)	0,4±0,0707	0,476±0,085**	0,453±0,055*
créatinine(mg/l)	3,815±0,19	2,82±0,54*	1,743±0,82**
Bilirubine (mg/l)	0,615 ±0,247	5,306 ±1,93***	1,29±0,142*

6. Effet des nano- TiO₂ la FNS

6.1. Effet sur le taux des globules blanc

Les variations du taux sanguin moyen des globules blanc (WBC) chez les rats témoins et traités par les nano- TiO₂ est représentée dans le **Tableau 06**. Les résultats montrent que l'administration des nano- TiO₂ (Lot 01 2.5ml/kg/jour) est associée à une augmentation significative ($p>0,05$) du taux du moyen des globules blanc comparé aux témoins ($13,05 \times 10^9$ vs $6,58 \times 10^9$ cellules/ml respectivement). L'administration de TiO₂ (lot02 1.25l/g/jour) quant-à-elle diminue significativement le taux du moyen des globules blanc ($4,60 \times 10^9$ cellules/ml).

6.2. Effet sur le pourcentage des lymphocytes

Le **Tableau 07** représente les variations du pourcentage des lymphocytes dans le sang des rats témoins et traités par les nano- TiO₂. Les résultats de cette étude indiquent que l'administration des nano- TiO₂ est associée à une augmentation significative du pourcentage des lymphocytes comparé aux témoins (91,65% vs 75,60%). L'administration de nano- TiO₂ (lot02 1.25ml/kg/jour) quant-à-elle ne modifie pas significativement le pourcentage des lymphocytes par rapport à celui des témoins (79,05% vs 75,60%).

6.3. Effet sur le pourcentage des granulocytes

Les résultats montrent que l'administration des nano- TiO₂ (Lot 01 2.5ml/kg/jour) est associée à une augmentation significative du pourcentage des granulocytes comparé aux témoins (15,70% vs 8,50% respectivement). L'administration de nano- TiO₂ (Lot 02 1.25ml/kg/jour) seul ne modifie pas significativement le pourcentage des granulocytes par rapport aux témoins (9,9% et 10,9% respectivement).

6.4. Effet sur le taux des globules rouges

Les résultats indiquent que l'administration des nano- TiO₂ est associée à une augmentation significative du taux du moyen des globules rouges (RBC) comparé aux témoins (9,50x10¹² vs 7,37x10¹² cellules/ml respectivement). L'administration de nano- TiO₂ (Lot01 1.25ml/kg/jour) ne modifie pas significativement le taux du moyen des globules rouges (8,92x10¹² cellules/ml).

6.5. Effet sur le pourcentage de l'Hématocrite(HCT)

Nos résultats montrent que la moyenne du pourcentage l'HCT a diminuée chez les souris traités de nano- TiO₂ par rapport aux témoins (**Tableau 06**).

6.6. Effet sur le taux de des plaquettes

Le taux moyen des plaquettes sa significativement augmenté chez lot traités par le nano TiO₂ (Lot 01 2.5ml/kg/jour) comparée aux témoins (887x10⁹ vs 479x10⁹ plaquettes/ml respectivement) alors que l'administration de nano- TiO₂ (Lot02 1.25ml/kg/jour) ne provoque aucun changement significatif du taux des plaquettes (495x10⁹ plaquettes/ml).

Tableau07 : Moyenne et écart-types des paramètres de la Formule de Numérotation Sanguine des rats témoins et traités par nano- TiO₂ avec différentes doses (1.25ml/g/jour 2.5ml/kg/jour)

	GB(x 10 ⁹)	Lym (%)	GRA (%)	Mid (%)	GR (x 10 ¹²)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (x 10 ⁹)	VGM (fl)	TCMH (pg)	CCMH (g/l)
T	6,58 ^a ± 0,20	75,6 ^a ± 3,39	8,5 ^a ± 0,61	6,87 ^a ± 0,95	7,37 ^a ± 1,12	13,90 ^a ± 2,5	46,65 ^a ± 8,74	479 ^a ± 48,27	48,83 ^a ± 5,6	18,93 ^a ± 1,6	301 ^a ± 25,53
TiO2 Dose 01 (2.5ml)	13,05 ^b ± 0,25	91,65 ^b ± 1,85	15,7 ^b ± 2,90	10,4 ^b ± 2,20	9,50 ^b ± 0,12	14,45 ^a ± 0,2	45,4 ^a ± 0,20	887 ^b ± 19,00	47,95 ^a ± 0,7	15,17 ^b ± 0,4	318 ^a ± 4,00
TiO2 Dose 02 (1.25ml)	9,7 ^c ± 0,10	79,05 ^a ± 0,55	9,9 ^a ± 1,10	7,8 ^c ± 0,40	8,92 ^a ± 0,79	14 ^a ± 0,1	45,05 ^a ± 1,25	595 ^a ± 28,00	48,75 ^a ± 0,3	15,73 ^b ± 1,2	310 ^a ± 6,51

Les moyennes affectées de lettres différentes dans la même colonne sont statistiquement différentes (p<0,05).

WBC : white bloodcells = globules blanc ; **LYM** : lymphocytes ; **GRA** : granulocytes ; **MID**: autres types de globules blancs ; **RBC** : redbloodcells = globules rouges ; **HGB** : hémoglobines ; **HCT** : hématocrites ; **PLT** : plaquettes ; **MCV** : mean corpuscular volume = volume globulaire moyen ; **MCH** : mean corpuscular hemoglobin = teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ; **MCHC** : mean corpuscular hemoglobin concentration = concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

Discussion

Le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés à une panoplie de xénobiotiques dans l'environnement, parmi lesquels, on retrouve les nanoparticules (**Lauvverys et al., 2007 ; Lukaszewicz, 2008 ; Michael et al., 2016**). Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés, à priori à la mise en évidence d'un éventuel effet neurotoxique sur le cerveau chez le rat exposé chroniquement à des petites doses plus réalistes possibles du dioxyde de titane.

Des travaux biochimique, biologique et neurocomportemental étaient plus qu'indispensables pour cerner, d'une manière scientifique satisfaisante, la question posée dans la problématique que l'on a posée dans l'introduction de cette étude.

Les nanomatériaux ont une grande variété d'applications dans de nombreux secteurs technologiques. La diffusion des nanoparticules, leur persistance dans l'atmosphère et leurs impacts sur le vivant sont totalement différents des particules de plus grande dimension et de même composition chimique. Plusieurs études documentées, y compris chez l'homme, conduisent à suspecter l'existence de leurs effets toxiques cutanés, pulmonaires, cardiovasculaires et cancérigènes. Des nombreuses études concernant les effets sur la santé et l'environnement sont en cours. Leurs conclusions définitives ne seront connues que dans quelques années. Les effets toxiques documentés issus de l'expérimentation animale et de l'épidémiologie, ainsi que les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules justifient, sur la base du principe de précaution, de prendre toutes les mesures utiles pour limiter l'exposition et protéger la santé des personnes potentiellement exposées (**Prosie et al., 2008**). Les nanomatériaux peuvent entrer dans le corps par voie orale, respiratoire, cutanée ou bien intraveineuse, puis ils peuvent être distribués dans les différents tissus (**Burch, 2002; Takenaka et al., 2001**). Y compris le cerveau, il y a plusieurs arguments que les nanoparticules peuvent traverser la barrière hémato encéphalique (**Begley, 1996**).

Cependant, la perturbation directe des membranes cellulaires neuronales par NPs permettrait leur entrée dans le cerveau. Par exemple, les nanoparticules métalliques par exemple Al, Ag, Cu ou Tio₂ qui mesurent entre 10 et 50 nm perturbent la barrière hémato encéphalique (**Sharma et Sharma, 2007**).

Dans une étude réalisée en 1970 par **De Lorenzo**, montre que les particules ultrafines Tio₂ sont transportées jusqu'aux bulbes olfactifs des singes. Aussi les nanoparticules d'oxyde de Mn, Cd, Ni et Co peuvent être transportées vers le cerveau via les neurones olfactifs (**Tallkvist et al., 1998; Elder et al., 2006**).

Oberdorster et al. , (2004), ont démontrés que l'inhalation des nanoparticules de taille 50 nm par les rats pendant 6 heures dans tout le corps et montrent aussi que les concentrations des nanoparticules sont significativement élevées dans le cerveau. **Elder et al., (2006)**, démontre que les nanoparticules d'oxyde de manganèse ont été trouvées dans les différentes parties du cerveau du rat après une exposition durant 6 jours.

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

Le stress oxydatif est l'un des principaux mécanismes de toxicité associés à une panoplie de xénobiotiques dans l'environnement, parmi lesquels, on retrouve les nanoparticules (**Lauvverys et al., 2007 ; Lukaszewicz, 2008 ; Michael et al., 2016**). Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés, a priori à la mise en évidence d'un éventuel effet neurotoxique sur le cerveau chez le rat exposé chroniquement à des petites doses plus réalistes possibles du dioxyde de titane.

Des travaux biochimiques, biologiques et neurocomportementaux étaient plus qu'indispensables pour cerner, d'une manière scientifique satisfaisante, la question posée dans la problématique que l'on a posée dans l'introduction de cette étude.

1. Effets de dioxyde de titane sur les paramètres de la croissance globale

Les résultats de l'évaluation des paramètres pondéraux suggèrent que l'administration de TiO₂ provoque une diminution significative de la croissance corporelle des différents groupes de rats traités. Cette diminution peut être traduite par la perturbation du métabolisme cellulaire sous l'effet du stress oxydatif engendré par les ROS (**Carole et Harve, 2011 ; Viviana, 2015**).

La réduction du poids corporel peut être le résultat du phénomène anorexique que les animaux peuvent subir avec le temps de l'exposition aux xénobiotiques et l'état de stress dans lequel ils vivent durant la période de cette exposition (**Viviana, 2015 ; Chakroun et al., 2016**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Monir Doudi et Mahbubeh Setorki, 2015**, qui ont signalé une réduction dans la consommation de la nourriture chez les rats mâles survenue à une toxicité subchronique.

Et aussi à cet égard (**Domingo, 1987**) a constaté une diminution significative de la prise de poids corporel associée à une réduction de la consommation alimentaire à 260 mg d'aluminium par kg de masse corporelle par jour.

La base physiologique de ce résultat est incertaine, mais il a été rapporté que les animaux exposés à des doses élevées d'aluminium dans l'eau potable consommaient moins de nourriture.

Cependant, les résultats n'ont montré une différence significative dans le poids relative entre les témoins et les groupe traité par l'oxyde de titane, Ces résultats sont en accord avec les travaux de (**Rong et al., 2010**) qui il a avait de changements significatifs de poids du foie, des reins et du cerveau chez des groupes des souris adultes après l'exposition au TiO₂.

2. Effet des nanoparticules d'oxyde de titane sur les paramètres biochimiques au niveau de cerveau

Protéine lipide et glucide

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

Les résultats de la présente étude indiquent que le mécanisme pour la toxicité induite par TiO₂ inclut une altération des substances biochimiques, des antioxydants et pourrait résulter du stress oxydatif causé par les nanoparticules (**Bheeman et al., 2014**). Nanoparticules TiO₂ augmentent la libération de molécules réactives d'oxygène et une oxydation accrue des protéines qui causent la mort cellulaire ou réduisant ainsi les cellules (**Carlson et al., 2008**). Nos résultats sont en parfait accord avec ceux cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux de tous les métabolites (augmentation du taux de protéines totales mais une diminution de taux du glucides et les lipides à la fin du traitement).

L'observation des résultats rend compte d'une toxicité plus évidente des nanoparticules TiO₂, puisque nous constatons une perturbation dans les le taux des lipides, glucides et protéines, ces variations par rapport aux témoins et qui mettent en évidence la perturbation de plusieurs systèmes enzymatiques à la fois selon les espèces. Ils seraient à l'origine d'une perturbation du métabolisme lipidique (**HENINE et al., 2016**). Les résultats ont montré que les nanoparticules de dioxyde de titane provoquent la production de radicaux libres dans les cellules et peut altérer la structure des protéines, (**Praetorius et al., 2007, Ghorbanzadeh et al., 2012**) produites sous forme d'anatase nanoparticulaire TiO₂ déclencher une cascade de réactions telles que la peroxydation lipidique, la diminution de la capacité d'anti oxydation totale et les activités des enzymes antioxydants (**Linglan et al., 2010**). L'augmentation de taux des protéines nous confirmait les résultats trouves sur les paramètres de stress oxydant

notamment l'activité enzymatique (**ROUABHI et al., 2006**) Ce qui concerne le taux lipides nous avons remarqué qu'il y'a une diminution ce qui concorde avec les résultats de (**Aurousseau, 2002**), qui a expliqué que la diminution du taux des lipides est provoqué par les radicaux oxygénés libres qui mènent a la peroxydation lipidique confirmé par le taux élevé du MDA.

3. Les paramètres de stress oxydatif(Enzymatique et non enzymatique) : MDA

L'effet biologique défavorable des nanoparticules est un problème scientifique inévitable parce que de leur petite taille et de leur grande activité de surface. Dans cette revue, nous concentrons sur le TiO₂ pour clarifier l'effet toxicologique et la réponse cytotoxique afin d'explorer les mécanismes de toxicité des NPs. Le MDA ou Malondialdéhyde plasmatique est un marqueur de la peroxydation des lipides. Il est considéré comme un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Les taux élevés de MDA signent donc un stress oxydatif, portant notamment sur l'oxydation des lipides (**Gasmi et al., 2017**). Le malondialdéhyde est un composé chimique de formule CH₂(CHO)₂, il est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés.

La présente étude montre une augmentation du taux de le MDA, cette dernière est en accord avec (**Ma et al., 2012**), l'élévation est causée suite a une peroxydation lipidique qui mène a une désintégration de la membrane cellulaire favorisant la mort cellulaire ce qui explique la phénomène de la neurotoxicité. Nos résultat ont révélé que une augmentation du taux de MDA chez les rats traités par TiO₂ rejoignent ceux **Aliabadi et al. (2016)** qui ont suggéré que l'exposition au TiO₂ a entraîné l'augmentation du contenu de MDA, selon **Smolinski et al. (1999)** la production de Malondialdéhyde (MDA) comme indice pour évaluer les lésions de la membrane cellulaire par peroxydation lipidique, Nous avons observé qu'il y avait une augmentation exponentielle de la production de MDA. Nos résultats ont montré que l'exposition au TiO₂ a augmenté le taux de (MDA) dans le cerveau, ce résultat s'accorde avec l'étude de (**Li et al.,2005**). On peut dire que le TiO₂ a un effet sur l'augmentation du taux de l'MDA.

Effet sur la GSH

En présence d'ERO, le glutathion réduit (GSH) s'oxyde pour former du glutathion oxydé (GSSG). La mesure de l'homéostasie redox du glutathion est un bon indicateur de l'état oxydatif cellulaire. Afin d'obtenir une représentation plus précise de l'importance du stress oxydant dans la toxicité des NPs, il importe de mesurer le rapport GSH/GSSG.

D'après les résultats nous avons observé une diminution du taux de GSH chez les rats traité par NPs-TiO₂ ce qui concorde avec les résultats de **(Fen, 2009)** qui ont mis en évidence une réduction de la teneur en GSH des cellules de cerveau humain en culture après exposition aux nanoparticules de silice 20 et 50 nm .

Effet sur la GPx

La GPX est une enzyme antioxydante clé qui régule le niveau des ROS (la GPX est capable de nos seulement de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydrox peroxydes résultant de l'oxydation de acides gras insaturées) et donc protégé les cellules contre les dégâts générés par l'oxyde de Fer (Weber et *al.*, 2002) et d'après nos résultats on observe une diminution de l'activité GP_x chez les rats traités par l'oxydes de titane. Cette diminution s'accorde avec (Olsson, 1986; Valko et *al.*, 2006) qui montrent une diminution claire de l'activité de cette enzyme dans le foie, le cerveau et les reins des rats exposés au cadmium en comparaison avec le lot témoin, cette diminution due par la surproduction de peroxyde d'hydrogène qui provoque une inhibition enzymatique de la GPx.

Effet sur la GST

Nos résultats montrent que l'exposition des rats à l'oxyde de titane(0.5 et 0.25ml/kg/jour) induit une augmentation hautement significative de l'activité des GST. L'augmentation de l'activité des GST est fortement corrélée avec la diminution du niveau de la GSH et une forme de défense qui traduit la désintoxication des xénobiotiques dans le corps pour permettre son élimination, et une réponse physiologique pour compenser les altérations qui sont dues aux radicaux libres et qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GST pour réduire son effet toxique, ces résultats sont confirmés par des études de (Ognjanović et al., 2008). La réponse de l'activité des GST dépend de plusieurs facteurs tels que le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et l'espèce **(Oruç et Üner, 2000)**.

CATALASE

La catalase est une enzyme qui permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et dioxygène.

La liaison oxygène-oxygène du peroxyde d'hydrogène est coupée par l'atome de fer du groupement hème, en créant une molécule d'eau et une liaison fer-oxygène très oxydante. Celle-ci peut oxyder une nouvelle molécule de peroxyde d'hydrogène, donnant du dioxygène. La réaction enzymatique en jeu est l'une des plus rapides connues.

Au sein de la cellule, la catalase permet de protéger l'organisme de l'action oxydante et néfaste du peroxyde d'hydrogène

L'activité de la catalase dépend spécifiquement de la transformation de l'hydrogène. Le peroxyde en oxygène et en eau (Federico and al., 2012). Il est principalement situé dans la du peroxyse. Il prévient donc les dommages oxydatifs à l'intérieur du peroxysome, et empêche son répandue dans le reste de la cellule (Fleming and al., 1999). En général, la nanoparticule dioxyde de titane a entraîné une diminution de l'activité catalase dans le cerveau. Ceci L'observation suggère que ce nanoparticule induisent indirectement une augmentation de l'H₂O₂ dans l'organisme mitochondries et le cytosol. En effet, la diminution des activités GPx et CAT augmente le H₂O₂.

Effet des Tio₂ sur le comportement des rats

Ces approches pourraient permettre d'expliquer la physiopathologie des maladies neurodégénérative induites par l'administration de TiO₂ sur un modèle animal et ce dans le but de pouvoir tester des molécules d'intérêt thérapeutique en prévention et/ ou en traitement de ces pathologies. Les différents tests effectués sont bien connus pour évaluer les effets neurotoxiques des corps vitaux.

De nombreux rapports de recherche ont montré que l'exposition au stress a un effet complexe sur l'apprentissage, l'activité locomotive, la mémoire et le développement mental (Rooszendalet et al., 2009 ; Cazakoff et al., 2010 ; Schwabe et al., 2012). Une perturbation comportementale a été observée suite à l'évaluation des différents paramètres liés à la biologie neurocomportementale en appliquant les différents tests chez les rats exposés TiO₂ afin d'évaluer leur activité locomotrice, émotionnelle, exploratoire, mémorisation et apprentissage.

Cette étude a indiqué que les rats traitées au TiO₂ Pour le test OF, on constate une activité motrice anormale par rapport aux rats témoins. Peut être L'effet de TiO₂ sur le cerveau dans le

locus responsable du mouvement (**Sana *al.*, 2018**), Ce qui explique le déclin au niveau du cerveau comme indiqué par une étude précédente (**Dumala, 2019**).

Pour le test PM qui sont responsables de évaluation du niveau de mémorisation et d'apprentissage Veux dire faible niveau de mémorisation et d'apprentissage Clairement. Pour un test DL nous avons enregistré une hautement diminution du temps que le rat passe dans la pièce sombre qui Signes d'anxiété (**Cylia et Tassadit. 2018 ; Daubié-Albanese, 2011**).

Effet des nano- TiO₂ la FNS

Les indicateurs sanguins ont montré une augmentation des niveaux et des GB HGB et GB, une diminution des niveaux de HCT. Ces changements dans les ratios de GR peuvent être dus à une interférence TiO₂ dans le processus de formation des érythrocytes (**Morsi *et al.*, 2016**) ou d'un autre point de vue, cela peut être dû à des lésions hépatiques associées Hypoxie (**Enwezor et Saki. 2005**). Les résultats de l'augmentation du GB correspondent aux déclarations précédentes de Dumal 2019. L'augmentation du nombre de globules blancs est une indication de l'activation du système immunitaire de défense interne présent dans le corps (**Gui *et al.*, 2011 ; Dumal, 2019**) une augmentation des plaquettes explique De son rôle est d'arrêter les saignements par agglutination et formation de bouchons en cas de lésion vasculaire Avec référence correspondante (**Lee *et al.*, 2016 ; Abasset *al.*, 2017**).

L'analyse des résultats a montré des changements qui touchent les rats traité par dioxyde de titane par rapport aux autres lots. Ces effets sont la réponse des résultats passés (GSH, CAT, MDA...), parce que le nano-TiO₂ capable d'induit un cas de stress par l'augmentation des radicaux libres, l'inhibition enzymatiques et la dégradation cellulaire, elle est capable de changer l'état de ces rats et causer par conséquence plusieurs symptômes et maladie neurologiques.

Conclusion

Les nanoparticules utilisées dans cette étude sont les NPs de dioxyde de titane TiO_2 , qui entraînent une perturbation des paramètres de croissance et de stress oxydant qui diffèrent en fonction de la dose d'administration de la neurotoxicité par ces nanoparticules. Nous avons étudié l'effet de dioxyde de titane TiO_2 sur quelques paramètres biochimiques des cerveaux tels que les protéines, glucides et lipides ; également sur les paramètres de stress enzymatiques et non enzymatiques (GPx, MDA, CAT, GST et GSH).

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la neurotoxicité chronique chez le rat de nanoparticule dioxyde de titane. À la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- Le gavage de dioxyde de titane respectivement à dose 0.5mg/kg/j et 0.25mg/kg/j du poids corporel chez les rats mâles adultes a induit des perturbations du comportement (test Open Field, test de piscine de Morris, test de dark and light, test de Sucrose) des rats.

- Aussi l'exposition au oxyde de titanium pendant 90 jours altérer le métabolisme glucidique, lipidique et protéique, procès accompagné par un déficit pondéral remarquable (les poids corporelles et le spoids relatifs).

- Le nanoparticule TiO_2 a provoqué également des altérations dans le bilan de stress oxydatif qui traduit par une perturbation de taux de GSH et MDA, l'activité de CAT, GPx, GST,.

Donc, les NPs dioxyde de titane TiO_2 changer ces paramètres de manière très claire, et provoquer une neurotoxicité. Il faut rechercher bien sur les détails de ces molécules pour éviter tous les formes d'intoxication ou des problèmes sanitaires liées avec ce nanoparticule.

À partir de ces résultats, il serait souhaitable de réaliser les perspectives suivantes:

Déterminer les effets de métabolites finals de la dioxyde de titane sur l'organisme après une exposition dans les mêmes conditions expérimentales.

Références

A

AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). 2006. Les Nanomatériaux, Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement. Paris.

Aurousseau B. 2002 . Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction et la physiologie et la qualité de leurs produits Badji Mokhtar Annaba. **INRAProd.Anim.15(1):** 67-82.

Aliabadi., Amir A., Aliabadi., Ralf M. Staebler., Michael Liu et Andreas Herber. 2016. Characterization and Parametrization of Reynolds Stress and Turbulent Heat Flux in the Stably-Stratified Lower Arctic Troposphere Using Aircraft Measurements. *Boundary-Layer Meteorol.* 161:99–126.

B

Bear MF., Connors BW., Paradiso MA (2016). Neuroscience, Exploring the Brain. Fourth Edition. New York. ISBN 978-0-7817-7817-6. 612.8-dc23. 1019pp.

Berger M (2006) . Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme* 20: 48-53

Block ML and Hong JS (2005). Microglia and inflammation mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Prog in neurobiology* 11-22.

Braillon G (2002) .le système nerveux central a l'usage des étudiants en médecine. Ed: doin. 123pp.

Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6: 826-836.

Bruinink A., Wang J., Wick P. 2015.Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Archives of Toxicology*,89(5): 659-675.

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

Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 72: 248-254

Buege JA ., Aust SD (1984). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105: 302-310.

C

Cakmak .,E.T., Horst Z. 1991 . Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*).

Cambier J., Masson M., Dehen H., Masson C .(2008) . Neurologie. 12 ème edition. Elsevier Masson. 540pp.

Christensen HL., Nguyen AT., Pedersen FD., Damkier HH (2013). Na⁺ dependent acid-base transporters in the choroid plexus; insights from slc4 and slc9 gene detection studies. *Front Physiol* 4 (304) .

Chuiko GM., Zhelnin YY., Gornaya PVA (1997). Seasonal fluctuations in brain acetyl cholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus L*): a freshwater fish from Northwest Russia. *Comp. Biochem Physiol* 107: 251-257.

CPP (Comité de la prévention et de la protection). 2006 . Nanotechnologies, Nanoparticules : Quels dangers, quels risques ?. Ministère de l'écologie et du développement durable Paris. PP: 12-32.

D

Defebvre I., Vérin M (2006) .la maladie de parkinson. Elsevier Masson. 220pp

E

Eric G. 2008. Nanomatériaux : différentes voies de synthèse, propriétés, applications et marchés. *Nanotechnologies et santé publique*. P: 18.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13: 341-349.

F

Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T., Tauc P., Sennour M. 2009. Photo luminescent diamond nanoparticles for cell labeling. Study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano.* 3: 3955-62.

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

Friedrich Walz, « The Verwey transition - a topical review », *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 14, no 12, 1er avril 2002, R285-340. In Wikipedia.

Flohe & Gunzler (1984). Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol* 105: 114-121.

Federico 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal Neurol Sci* 05: 30.

Fleming L., Mann JB., Bean J., Briggles T., Sanchez-Ramos JR (1999). Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann Neural* 4(36):100-103.

Fontaine E (2007) . Radicaux libres et vieillissement. *Cah Nutr Diét* 42(2): 110-115.

Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes EM., Panayiotidis MI (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research* 674: 3-22.

Freeman BA ., Crapo JD .1981. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256: 10986-10992.

Fontaine E (2007) . Radicaux libres et vieillissement. *Cah Nutr Diét* 42(2): 110-115

Franco R., Sanchez-Olea R., Reyes-Reyes EM., Panayiotidis MI. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research* 674: 3-22.

G

Gasmi Salim 2018. Neurotoxicité de deux pesticides (Acetamipride et Deltaméthrine) et la Prévention de cette toxicité par la quercétine chez le rat, 2018, Thèse Doctorat, Université de Tébessa. 217p.

Goldsworthy AC., Mordue W., and Guthkelch J. 1972. Studies on insect adipokinetic hormones *Gen.Comp.Endocrinol.* 18: 306-314.

Guéguen B., Chauvel P., Touchon J. (2005) . Neurophysiologie des mémoires. Elsevier Masson. 240pp.

Guillet-Pichon V., Verny C., 2016. Mitochondrie et maladies neurodégénératives. Centre national de référence des maladies neurogénétiques, service de neurologie, centre hospitalier universitaire d'Angers, 49933 Angers, France :117–122 pp120.

H

Habig WH., Pabst MJ., Jakoby WB. (1974). Glutathione-S-transferase the first step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry* 249: 7130-7139.

Halliwell., B., Gutteridge J. (2000). Reactive species as useful biomolecules. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 467- 481.

Hoyer D., Hannon JP., Martin GR .(2002).Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharma Biochem and Behavior* 71: 533-554.

I

Imbert M (2006) . Traité du cerveau. Odile Jacob. 532pp.

INRS. SD. Particules ultra-fines et santé.

J

Jean-françois V, Alain S, Marie-Claude LR, François B (2005) : Neurophysiologie de la physiologie à l'exploration fonctionnelle. *Neuro* 1(1): 03-25.

K

Kahli H, 2015 :Evaluation du stress oxydatif induit par les nanoparticules chez *Hélix Aspersa*: Cas du dioxyde de titane. Université Badji Mokhtar Annaba, P53.

Koistinaho M., Lin S., Wu X .(2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nature Medicine* 10: 719-726.

L

Lacombe M (2006) . abrégé d'anatomie et de physiologie humaine. 6ème édition. de boeck. 229pp.

Lauvverys R., Vincent H., Dominique L. (2007) . Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Masson 31-288pp.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Darnell J., Kaiser CA., Masson PL. (2005).biologie moléculaire de la cellule. Masson. 3ème édition. de-boeck university. 1096pp.

Lucie A. 2011 .Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métallo protéases, influence des paramètres physicochimiques. Thèse doctorat toxicologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. Paris. P: 8-10.

M

Ma .,Ma., X., Huang., J., Yang., L., Yang., Y., Li, W., Xue., L. 2012. NOPO Modulates Egr-induced JNK-independent cell death in Drosophila. Cell Res. 22(2): 425-431.

Mahmoudi S. 2014 . Etude des nanoparticules de dioxyde de titane élaborées par voies chimiques . Thèse doctorat. Université constantine 1. P: 06.

Malinski T. 1998:.Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. P: 1080-1085.

Marie S. 2015 .Dynamique, réactivité et écotoxicité des nanoparticules d'oxydes métalliques dans les sols : impact sur les fonctions et la diversité des communautés microbiennes. Ecotoxicologie. Université Claude Bernard - Lyon I. Français. P: 08.

Martin C., Riou B., Vallet B. (2006) ,physiologie humaine appliquée. Editions Arnette 1098pp.

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

Mohammedi Z. 2006 . Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Telemcen. Thèse Magister. Université Abou Bakrbelkaïd *Telemcen*.155p.

N

Nel A., Xia T., Madler L., Li N. 2006.Toxic potential of materials at the nanolevel .Science. 311(5761): 622-627.

P

Pascal H. 2010. Le système nerveux. 2ème édition. 44-62pp.

Peterson BS .(2015). Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood. *Jama psychiatry* 72(6): 531-540.

Philbert MA., Billingsley ML., Reuhl KR. 2000. Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* 28: 43-53. *Physiologia plantarum*. 83: 463-468

Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Coquery JM. 2004. Neurosciences. 2ème Ed. de boeck university. 752pp.

R

Roosendaal B., McEwen BS., Chattarji S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10: 423-433.

Rouabhi R., Djebbar H., Djebbar MR. 2016 Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, paramecium sp. *African journal of Biotechnology*. 045-048.

S

Smolinski., S., Maness., P.-C., Blake., D. M., Huang Z., Wolfrum., E. J., & Jacoby., W. A., 1999. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9), 4094–4098.

Sugimoto T., X. Zhou., and A Muramatsu. 2003. Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 3. Formation process and size control. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003. 259(1): p. 43-52.

V

Viviana., Viviana Peña. (2015). Keynote: "Revisiting the European maerl and rhodolith

beds in the 21 century".

W

Wang .,Y F Tsai., P J .,Chen C W., Chen D .,R Hsu .,D J .2010 .Using A Modified Electrical Aerosol Detector To Predict Nanoparticles Exposures To Different Regions Of The Respiratory Tract For Workers In A Carbon Black Manufacturing Industry.

Weeckbeker G.; Cory G. 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemial L1210 cells in vitro.Cacer letters 40 : 257-264.

William P (1981) . Anatomie et physiologie in organisation générale et physiologie humain 209-214.

WEB

www.inrs (Institut national de recherche et de sécurité) (2013). fr/fichetox. Dioxyde de titane.

Y

Yuan J and Yankner A (2016). Apoptosis in the nervous system. Nature 407: 802-809.

Z

Zhang HT., Huang Y., Masood A., Stolinski LR., Li YF., Zhang L., Dlaboga D., Jin SLC., Conti M., O'Donnell JM (2007). Anxiogenic-like behavioral phenotype of mice deficient in phosphodiesterase 4B. Neuropsychopharmacology 33: 1611-1623

Annexes

1-Matériel utilisé dans les différentes étapes de l'étude

1-1-Matériel chimique

- Eau distillée.
- TCA (Trichloro acétique).
- Anthrone.
- Acide sulfurique.
- Acide orthophosphorique (à 85%).
- Vanilline.
- BBC (Bleu Brillant de Coomassie).
- Ether.
- Chloroforme.
- Ethanol (à 95%).
- BSA (Albumine sérum de bœuf).
- Glucose.
- Sodium phosphate dibasique.
- ASS (Acide sulfosalicylique).
- Sodium phosphate monobasique.
- Tris.
- HCl.
- NaOH.
- Méthanol absolu.
- EDTA (Acide éthylène diamine tétracétique).
- DTNB (l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénoïque).

1-2-Grand matériel et appareils

- Centrifugeuse (SELECTA).
- Balance analytique
- Balance de précision (KERN).
- Etuve (HERAEUS).
- pH mètre.

- Agitateur magnétique (WITEG).
- Matériel de dissection.
- Centrifugeuse sigma 1-15.
- Réfrigérateur.
- Bain marie (MEMMERT).
- Agitateur Vortex (THERMOS).
- Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU).

1-3-Petit matériel

- Mortier + Pilon (Broyeur manuel).
- Pissette.
- Verre de montre.
- Spatule.
- Baromagnétique.
- Micropipettes de 100µl et 1000µl.
- Pipettes graduées.
- Portoirs.
- Tubes à essai.
- Tubes secs en verre et en plastique.
- Tubes eppendorf pour les centrifugeuses sigma.
- Cuves pour la spectrophotométrie (en plastique et en quartz).
- Papier d'aluminium.
- Papier Wattman N° 01.
- Becher.
- Erlenmeyers.
- Entonnoirs.
- Eprouvettes graduées.
- Fioles jaugées.
- Flacons en verre

II-Dosage des glucides

II.1.Réactif d'Anthrone

Dissoudre **150mg** d'Anthrone dans **75ml** d'acide sulfurique puis ajouter **25ml** d'eau distillée, le réactif est de couleur verte et il doit être stocké à l'obscurité.

II.2.Solution mère de glucides

Dissoudre **5mg** de glucose dans **5ml** d'eau distillée.

III. Dosage des lipides

III.1.Réactif SPV (Acide sulfophosphovanylique)

Dissoudre **0,38g** de vanilline dans **55ml** d'eau distillée et ajouter **195ml** d'acide orthophosphorique à **85%**, le réactif est de couleur rose clair, il doit être conservé dans l'obscurité.

III.2.Solution mère de lipides

Peser **25mg** d'huile dans un tube eppendorf et ajouter **10ml** éther/chloroforme (1V/1V).

IV. Dosage des protéines

IV.1.Solution NaOH 10%

Dissoudre **10g** de NaOH dans **100ml** d'eau distillée.

IV.2.Réactif BBC (Bleu brillant de Coomssie)

Faire dissoudre **100mg** du BBC dans **50ml** d'éthanol à **95%**, à cette solution 100ml d'acide phosphorique à **85%** a été ajouté. La solution obtenue est diluée dans un volume final de **1 litre**. Les concentrations finales dans le réactif de **0,01%** de bleu de Coomassie: **4,7%** d'éthanol et de **8,5%** d'acide phosphorique, le réactif obtenu est de couleur bleu clair, il faut qu'il soit conservé aux froides et utilisé dans un délai de **2 à 3 semaines**.

IV.3.Solution BSA (Albumine sérum de boeuf)

Dissoudre **5mg** BSA dans **5ml** d'eau distillée.-**Dosage du glutathion (GSH)**

A-PBS (Tampon phosphate salin) (0,2M, pH 6,4)

On ajoute **13,25ml** du sodium phosphate dibasique Na₂HPO₄ (**35,61g/l**) et **36,75ml** du sodium phosphate monobasique NaH₂PO₄ (**27,6g/l**), puis les deux solutions sont diluées à **100ml** d'eau distillée.

B-Solution d'acide sulfosalicylique 0,25%

Dissoudre **250mg** d'acide sulfosalicylique dans **100ml** d'eau distillée.

C-Solution Tris/EDTA (0,4M, pH 9,6)

Dissoudre **12,114g** de Tris et **1,871g** de l'EDTA (Acide éthylène diamine tétracétique) dans **250ml** d'eau distillée et ajuster le pH à **9,6** en ajoutant HCl ou NaOH.

D-Solution DTNB (Acide dithionitrobenzoïque) (10 mM)

Dissoudre **200mg** de DTNB dans **50ml** de méthanol absolu.

V. Courbes d'étalonnage pour le dosage des métabolites

V.1.Courbe d'étalonnage pour dosage des glucides

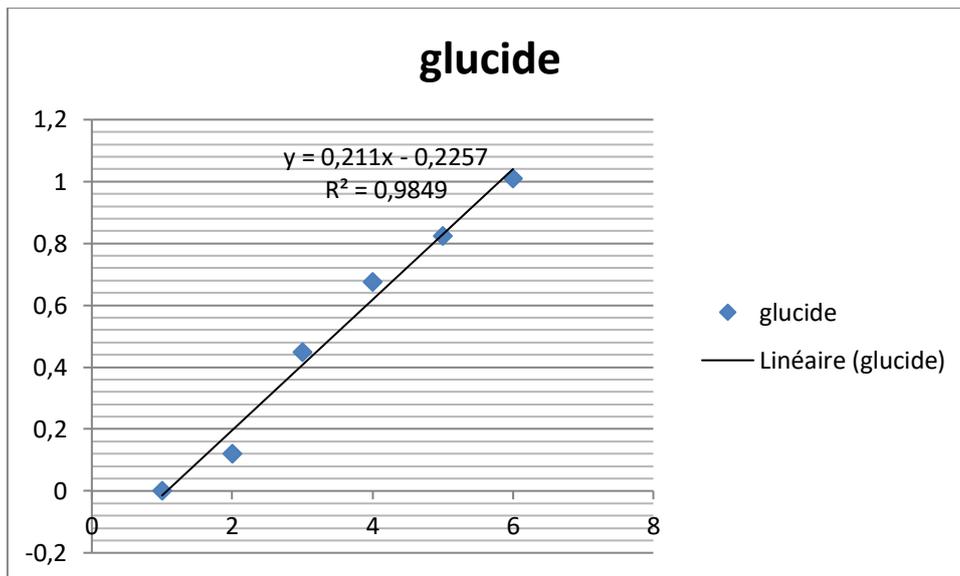


Figure A: Courbe d'étalonnage pour le dosage des glucides

V.2.Courbe d'étalonnage pour dosage des lipides

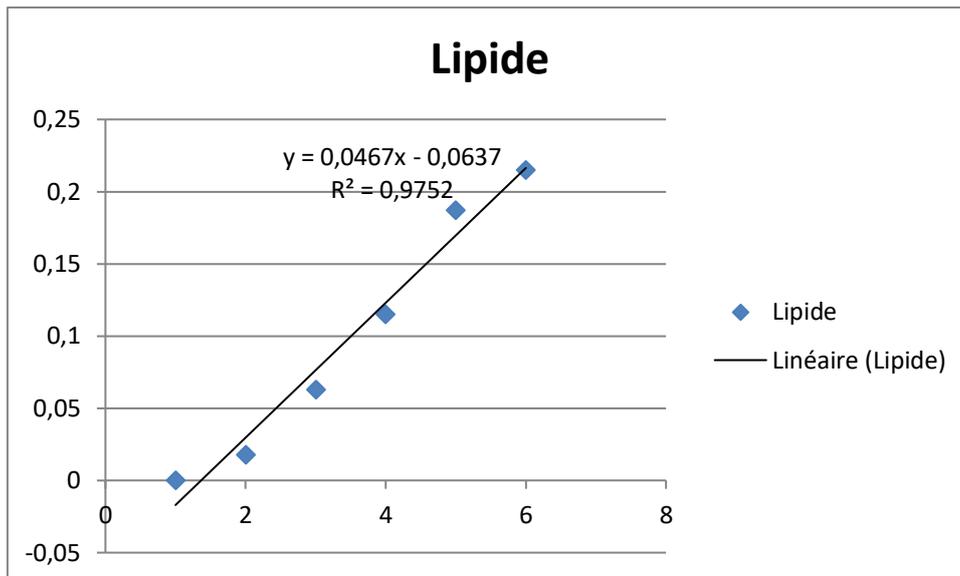


Figure B: Courbe d'étalonnage pour le dosage des lipides

V.3. Courbe d'étalonnage pour dosage des protéines

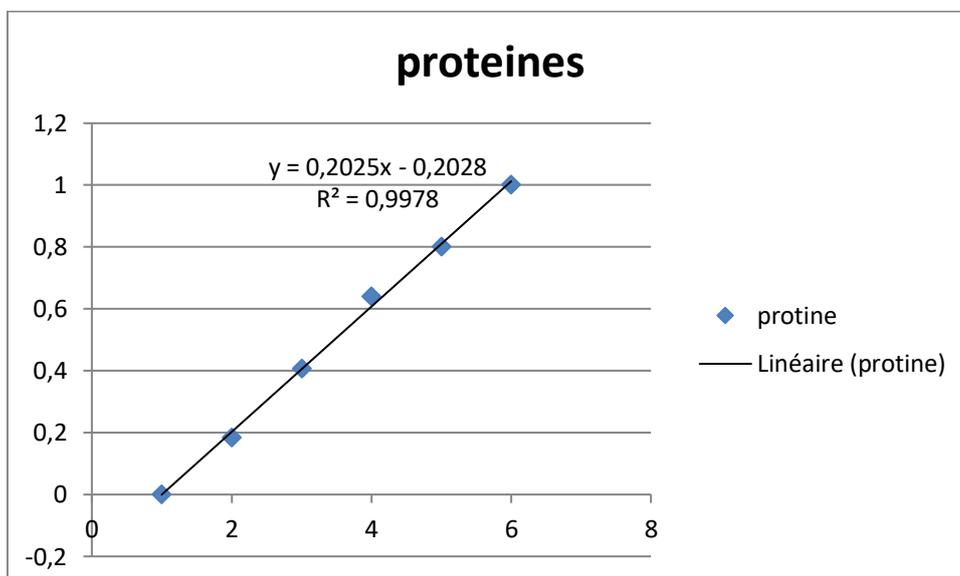


Figure C: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines