



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi -Tébessa-

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

Département : Biologie appliqués

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie

Thème

Nephrotoxicity of Titan Dioxide- Nanoparticalis on wistar rats

Présenté par :

- ★ Belaribi Souha
- ★ Bougessa Saif Eddin
- ★ Mansour Khaoula

Membres de Jury :

Pr. Rouabhi R	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Rapporteur
Dr. Goudjil Tahar	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Président
Dr. Benaicha brahim	U. Larbi Tébessi-Tébessa	Examineur

Année universitaire : 2022/2023

سورة

الملخص

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على التأثيرات السامة لجرعتين مختلفتين من ثاني اكسيد التيتانيوم (TiO₂) لمدة 90 يوم على مستوى الكلى .

أجريت التجربة على عينة مكونة من 18 فأر من نوع Wistar (ذكور) مقسمة الى ثلاثة مجموعات تحتوي كل مجموعة على 7 فئران .المجموعة الاولى شاهدة تلقت الماء المقطر و الطعام فقط طيلة مدة التجربة ،المجموعات الاخرى عولجت بثاني اكسيد التيتانيوم بجرعات مختلفة .

تم تقييم مستويات كل من الدهون و البروتينات و الغليسيديات و كذلك خصائص الاجهاد التأكسدي ، المؤشرات البيوكيميائية ، متغيرات فيزيولوجية

أظهرت النتائج ان ثاني اكسيد التيتانيوم بسبب تأثيرات ضارة على الجسم عن طريق زيادة نشاط المؤشرات البيولوجية للأكسدة ،ارتفاع ملحوظ في نشاط مضادات الاكسدة GST, MDA مع انخفاض في GPx ,CAT, GSH في خلايا الكلى مقارنة بالشواهد .كما لوحظ وجود تغييرات بشكل واضح لكل من الخصائص الحيوية ،كما ان شدة السمية تزداد مع زيادة الجرعة و هذا ما اظهرته النتائج بين الجرعتين كل هذه المؤشرات هي علامات السمية الكلوية المحتملة .

الكلمات المفتاحية : الاجهاد التأكسدي ، فئران ويستر ، ثاني اكسيد التيتانيوم ، الكلى ، تسمم كلوي .

Abstract

The objective of this work is to highlight the toxic effects of two different doses of titanium dioxide (TiO₂) for 90 days at the renal level. The experiment was conducted on a sample of 21 wistar rats (males) divided into three groups, each containing 7 rats. The first group was a control that received distilled water and food only for the duration of the experiment, the other groups were treated with titanium dioxide at different doses. Lipid, protein and glyceride levels were evaluated, as well as oxidative stress characteristics (), biochemical indicators () and physiological variables (). The results showed that titanium dioxide due to harmful effects on the body by increasing the activity of biological indicators of oxidation, a significant increase in the activity of antioxidants GST, MDA, with a decrease of GPx, CAT and GSH in renal cells compared to biological characteristics and severity of toxicity increase with increased dose, and this is shown by results between the two doses (). All these indicators are signs of potential nephrotoxicity. Keywords: oxidative stress, Wister rats, titanium dioxide, kidneys, nephrotoxicity.

Résumé

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les effets toxiques de deux doses différentes de dioxyde de titane (TiO₂) pendant 90 jours au niveau rénal. L'expérience a été menée sur un échantillon de 21 rats wistar (mâles) divisés en trois groupes, chaque groupe contenant 7 rats. Le premier groupe était un témoin qui a reçu de l'eau distillée et de la nourriture uniquement pendant la durée de l'expérience, les autres groupes ont été traités avec du dioxyde de titane à différentes doses. Les niveaux de lipides, de protéines et de glycérides ont été évalués, ainsi que les caractéristiques du stress oxydatif (), les indicateurs biochimiques () et les variables physiologiques (). Les résultats ont montré que le dioxyde de titane en raison d'effets nocifs sur le corps en augmentant l'activité des indicateurs biologiques de l'oxydation, une augmentation significative de l'activité des antioxydants GST, MDA, avec une diminution de GPx, CAT et GSH dans les cellules rénales par rapport à Les caractéristiques biologiques, et la sévérité de la toxicité augmentent avec l'augmentation de la dose, et c'est ce que montrent les résultats entre les deux doses () Tous ces indicateurs sont des signes de néphrotoxicité potentielle. Mots clés : stress oxydatif, rats Wister, dioxyde de titane, reins, néphrotoxicité.

Remerciements

“On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter, on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit, mais on peut croire à tout ce que l'on fait...”

Ellen MacArthur (2002), *Du vent dans les rêves*

Tout d'abord, nous remercions notre grand Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

Nous désirons adresser notre gratitude à notre enseignante et encadrante Monsieur Rouabhi.R pour l'aide qu'il nous a fourni. Son soutien indéfectible, ses conseils et sa rigueur nous ont accompagné tout au long de ce travail, et nous ont beaucoup apporté.

Nous souhaitons également remercier Monsieur pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

M. Pour nous avoir fait l'honneur de juger ce modeste travail et de nous faire ainsi bénéficier de ses compétences.

Nous tenons adresser un remerciement particulier plein de reconnaissance et de gratitude à Melle Sarra, nous n'oublions jamais sa bienfaisance.

Nous remercions tous les équipes de laboratoire de Toxicologie pour leur aide précieuse et leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants rencontrés tout au long de nos années d'étude.

Dedicace

Cher père

Je dédie mes recherches de fin d'études au défunt, qui reste dans mon cœur, à mon soutien et à la perle de ma vie, mon cher père Ahmed. Je te remercie pour ton grand amour pour moi et ta chaleureuse tendresse. Tu es le bien-aimé en tout lieu et en tout temps. Si la vie était un cadeau, ma vie serait sacrifiée pour toi. Avec toute fierté et fierté, tu es le meilleur des pères, le cœur le plus pur qui existe. O Seigneur, fais-le oublier dans sa tombe et place-le dans les rangs les plus élevés du Paradis et donne-lui une boisson agréable des mains de Ton Prophète et de Ton Bien-Aimé. Mon Seigneur, mon désir pour lui a dépassé l'immensité de ton univers, alors rassemble-moi avec lui dans ton paradis...

Khawla

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries » Marcel Proust

Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce modeste travail :

A mes parents salah et souaad et baba les plus chers à mon cœur qui ont donné sens à mon existence, qui ont été toujours là pour moi. J'espère que par ce travail, je vous rends un peu de sentiments et de fierté que j'éprouve d'être votre fille, « je vous aime ».

A mes très chers frères Taki eddine et kad et omar

A mes très chère sœurs malek, imen, doha, joujou et Aya

A toute ma famille et mes amis (Aymen Dhirar Meryem Ikram et Anfel) et tous ceux qui ont cru en moi

Souha...

Sommaire

SOMMAIRE

ملخص

Abstract.....	4
R ésumé.....	4
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
INTRODUCTION.....	
Chapiter 1.....	3
1. Généralités sur le stress oxydant	3
2. Radicaux libres.....	4
2.1. Endogène.....	4
2.2Exogène.....	4
3. Effets des radicaux libres sur l’organisme	5
3.1.1 Oxydation des protéines	5
3.1.2 Peroxydation lipidique	5
3.1.3Oxydation de l’ADN.....	6
4. Système Antioxydants	7
4.1. Système antioxydant enzymatique	7
4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	7
4.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)	7
4.1.3. Catalase (CAT)	8
4.1.4.GST	8
4.2. Système non enzymatique	8
4.2.1. Glutathion (GSH).....	8
4.2.2. La vitamine E.....	8

4.2.3. Vitamine C.....	9
4.1. Propriétés optiques	11
4.2. Propriétés électriques.....	11
4.3. Propriétés mécaniques	11
4.4. Propriétés physiques.....	11
5.1. Structure cristalline de L'anatase	11
5.2. Structure cristalline de rutile	12
1.1 Généralité.....	16
4.1. 1. Morphologie générale.....	17
4.2. Aspect macroscopique.....	18
4.3. Aspect microscopique	19
.5 Fonctions rénales.....	20
6. Franchissement de TiO ₂ NPs la barrière intestinale	21
I. Matériel et methods	22
I.1. Material.....	22
I.1.1. Les animaux de laboratoire	22
I.1.2. Produits chimiques	22
I.2.1. Entretien des animaux.....	22
1.2.1.2 Alimentation	23
I.2.2. Choix des doses et préparation du TiO ₂	23
I.2.3. Répartition et traitement des rats.....	24
I.2.4.1. La mesure de poids	25
B. Estimation du poids relatif des reins	26
C. Evaluation des paramètres de stress oxydatif	27
C.1 Dosage de malondialdéhyde (MDA)	27
C.2 Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST).....	28
C.3 Dosage du glutathion (GSH)	29

C.5 Dosage du GPx	31
D. Evaluation des paramètres biochimiques	32
D.1 Dosage de glucide.....	32
D.2 Dosage de lipide	33
D.3 Dosage des protéines	33
1 .2.4Analyse statistique	35
∅ des paramètres biochimiques, paramètres enzymatiques et non enzymatique :39	
2.1.2.1 Effets de TiO2 NPs sur les paramètres biochimiques chez les rats.....	39
Taux de protéine	39
Taux des glucides	40
Taux de lipide.....	40
2.2.2. Evaluation des paramètres biochimiques (l'urée ; La créatinine ; Bilirubine)	41
2.2.2.1 Effets de TiO2 NPs sur les paramètres enzymatiques chez les rats	42
Effet sur l'activité de GPx.....	42
CAT	42
Effet sur les variations de l'activité GST (Glutathion –S-transférase).....	43
2.2.2.2 Effets de TiO2 NPs sur les paramètres non enzymatiques chez les rats.....	44
Effet sur le taux de GSH.....	45
3.1. Effet du TiO2 NPs sur Gain de poids et le Poids relatif du rein et les Gain de poids ...	46
3.2. Effets de TiO2 NPs sur les paramètres non enzymatiques et enzymatiques chez les rats	46
Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)	46
Glutathion peroxydase GPx	47
Effet sur le taux de GSH.....	47
Effet sur Le glutathion S-transférase GST.....	48
Effet sur Catalase (CAT)	48
3.3Evaluation des paramètres biochimiques (l'urée ; La créatinine ; Bilirubine).....	48

5. CONCLUSION50

*Liste des
tableaux*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1 : Classification de rat17

Tableau N°2 : Concentration de Bilirubine, urée creatinine chez le groupe temoin et le groupe traité41

*Liste des
figures*

LISTE DES FIGURES

Figure 01: Schéma montrant le stress oxydant .	
Figure 2: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.	6
Figure 3 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.	7
Figure 07 : (a) Structure de TiO ₂ en phase anatase, titane (gris) et oxygène (noir). (b) (101);(c) (100) construit à partir du CIF COD 7206075.....	12
Figure 08 : (a) Structure de TiO ₂ en phase de rutile, titane (gris) et oxygène (noir). (b) (110);(c) (100) ; (d) (001) construit à partir du CIF COD 9004141	13
Figure 09 : Les structures cristallines du TiO ₂ brookite	13
Figure 10 : Schéma expliquée le principe de photocatalyse	14
Figure 11 : Rat Wistar (photo personnelle).....	16
Figure 12 : Structure macroscopique des reins (Principes de physiologie humaine, 2008.) ...	18
Figure 13 : Vue macroscopique du rein (Lüllmann et al. 1998).	19
Figure 14 : Segmentation anatomique et fonctionnelle du néphron	20
Figure 15 : Rat mâle Rattus de la race Wistar.....	22
Figure16 : Répartition des rats.	23
Figure 18 : Alimentation (croquets)	23
Figure 19: TiO ₂ utilisé dans l'expérience	24
Figure 20 : Sonde de gavage	24
Figure 21 : Gavage par voie orale	25
Figure 22 : Mesure du poids.....	25
Figure 23 : Sacrifice et prélèvement des reins	26
Figure 24 : Prélèvement sanguin des rats	26
Figure 25: Extraction et dosage des glucides, protéines et lipides totaux.....	35
Figure 26 : L'évaluation du gain de poids corporel (GP) chez les lots traités par TiO ₂ NPs par rapport au lot témoin.	38
Figure 27: L'évaluation du poids relatif des reins(P _{Rr}) reins chez les lots traités par TiO ₂ NPs par rapport au lot témoin.	39
Figure 28: Taux de protéines chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins	40

Figure 29: Taux des glucides chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins	40
Figure 30: Taux des lipides chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins	41
Figure 31: la variation de GPx chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins....	42
Figure33: la variation de l'activité de GST traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins	44
Figure34: la variation de taux de MDA chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport lestémoins.	45
Figure 35 : la variation de taux de GSH chez les rats traités par TiO ₂ NPs par rapport les témoins.....	45

Introduction

I. INTRODUCTION

Les chercheurs sont intéressés par les nanosciences depuis la conférence du physicien R.feynman à l'American Physical Society Conference à l'Institute of Technology le 26 décembre 1959 (**Feynman, 1960**) Sa thèse comprenait une discussion sur la possibilité d'ingénierie et de modification de la matière au nanomètre niveau (**Drexler, 1992**), qui a conduit à l'émergence du terme "nanotechnologie" (**Taniguchi, 1974**) C'est une science qui s'intéresse aux types de nanoparticules qui sont définis comme un groupe de matériaux ayant une dimension inférieure à 100 nanomètres . Grâce aux nanoparticules (NPs), de nombreux obstacles ont été surmontés dans le domaine de la médecine, représentés par : Délivrer des médicaments aux cellules de manière plus efficace Ciblage (**Iannazzo et al .,2013**), endoscopie par capsule, qui fournit des images de haute qualité pour atteindre l'intestin grêle (**Ankriet al .,2013**) , diagnostiquer précocement des maladies incurables (**Kamila et al ., 2016**), en plus des énormes profits dans le domaine économique dus à l'investissement des grands gouvernements dans la recherche dans ce domaine.

Le dioxyde de titane, TiO₂, est l'une des nanoparticules les plus produites, avec des centaines de milliers de tonnes, en raison de son utilisation courante dans les fournitures de la vie quotidienne, par exemple, les cosmétiques, les produits alimentaires, les médicaments, les papiers, les matériaux anti-pollution et autres (**Czajka et al., 2015**). Elle a également été exploitée dans le domaine de la photocatalyse hétérogène, le domaine du photovoltaïque. Le développement rapide des NP de TiO₂ avec des ventes de 750 millions d'euros sur le marché (+) a créé de grandes questions sur ses effets négatifs sur la santé humaine et l'environnement.

Le rein est un membre du système urinaire situé des deux côtés de la colonne vertébrale. Il se compose de 1 000 000 à 1 500 000 unités appelées néphrons **Domart et al.,1986**. Il mesure 11 à 12 cm de long et 6 à 7 cm de large. Sa fonction principale est de disséquer le sang et d'excréter urine (**Efthymiouet al., 1993**) Comme tous les autres organes, les reins sont vulnérables aux effets négatifs des particules de titane.L'implication des NPs de TiO₂ a été prouvée dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène, et la capacité des antioxydants, ce que l'on appelle "l'oxydatif stress", qui est une cause fondamentale des maladies rénales, dont la plus dangereuse est l'insuffisance rénale, qui entraîne de nombreuses

maladies. D'autres complications telles que le diabète, l'hypertension artérielle, et autres. (**Zhao et al., 2010**)

Dans ce travail, nous avons fait un maximum d'efforts pour étudier la toxicité des particules de dioxyde de titane sur la santé humaine, spécifiquement au niveau des reins, en appliquant des doses de différentes concentrations à des rats Wister comme modèle vivant pour l'expérience. Sont:

- Détermination de l'effet toxique des particules de dioxyde de titane sur les reins
- Détermination de certains paramètres de stress oxydatif : (MDA, GSH, CAT GST, GP X)
- Détermination de certains paramètres biochimiques des reins (l'urée, la créatinine, l'acide urique)
- Estimation des paramètres (protéines, lipides, glucose)
- Estimation des paramètres de croissance de la souris (poids relatif)

Notre étude est divisée en deux parties principales. La première partie est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre étudie les généralités sur le stress oxydatif en mettant l'accent sur les mécanismes du système de défense. Le deuxième chapitre est une étude détaillée sur les particules de dioxyde de titane et leur toxicité sur le système immunitaire. Le troisième chapitre donne un aperçu des types de souris et la raison du choix de la souris Wister comme modèle anatomique pour l'expérience, en plus de présenter le concept de rein et ses fonctions de base. Quant à la seconde partie, il s'agit de la partie expérimentale consacrée à présenter les méthodes utilisées après avoir rappelé les techniques scientifiques utilisées pour estimer les différents coefficients. Enfin, nous aborderons un ensemble de résultats obtenus grâce aux travaux de cette expérience, et on terminera par une conclusion.

Chapitre I :le

stress

oxydant

Chapiter 1

1. Généralités sur le stress oxydant

Le stress oxydatif est défini comme un état de déséquilibre entre la production de radicaux libres et les systèmes antioxydants in vivo. En raison de ce déséquilibre il provoque également de nombreuses maladies notamment l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies du cerveau et des reins et d'autres maladies.)Toshikazu et *al.*, 2002 (



Figure 0 1: Schéma montrant le stress oxydant .)Belaich., Boujraf., Housni *et al.*, 2015(

Les espèces réactives de l'oxygène interagissent avec des biomolécules qui contiennent des niveaux élevés de doubles liaisons carbonées et riches en sites à haute densité électronique (tels que les protéines, l'ADN, les lipides), ce qui entraîne une perturbation de leur travail et des dommages aux cellules.

Pour échapper au stress oxydatif et éviter ses effets nocifs, le corps dispose d'un système de défense et de types d'antioxydants qui sont divisés en systèmes enzymatiques et non enzymatiques qui agissent pour éliminer les radicaux libres et éliminer leurs toxines des cellules ou réparer les dommages oxydatifs qui en résultent. (Cadenas, 1989)

Néanmoins, il a été démontré que les ROS ont un rôle bénéfique dans l'adaptation physiologique et la régulation de la signalisation intracellulaire. (Schreck and Baeuerle, 1991).

2. Radicaux libres

Un radical libre est une substance chimique, une molécule, une partie d'un seul moléculaire ou atome. Capable d'exister indépendamment (libre) en contenant un ou plusieurs électrons et simple. Cela lui donne une bonne réaction. **(Goudable et Favier., 1997).**

En fait, ces radicaux ont toujours tendance à remplir leurs orbites en capturant des électrons.

Deviens plus stable : il diminuera donc en oxydant un autre composé **(Halliwell., 1999).**

Sources de radicaux libres :

Il y a deux origines possibles : endogène et exogène.

2.1. Endogène :

Précurseur du ROS, l'anion superoxyde O_2^- peut provenir de plusieurs sources La cellule. Il se forme après que l'oxygène O_2 est réduit par les électrons. **(Belkheiri., 2010)**

Le cofacteur. Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique.

Les différentes enzymes qui permettent cette réaction sont : NADPH oxydase, xanthine

Oxydase, cyclooxygénase ou COX, lipoxyrogénase, réticulase

Endoplasme lisse (cytochrome P450) et ceux de la chaîne de transport d'électrons

Mitochondries **(Fusco., 2007)**

La quantité d'oxygène dans les mitochondries est réduite à 95%. la conversion enzymatique en molécules non toxiques telles que H_2O **(Belkheiri., 2010)** et d'autres radicaux libres d'origine cellulaire tels que La xanthine oxydase joue un rôle important dans la production de ROS (surtout O_2^- et H_2O_2) **(Belkheiri., 2010).**

2.2 Exogène :

Le corps humain est envahi par divers facteurs externes, qui peuvent Génération de ROS **(Favier., 2003)** : rayonnement UV, oxydes d'azote (NO) et dioxyde d'azote (NO_2) dans l'environnement (goudron, tabac, etc.), L'alcool, certains médicaments contre le cancer et les antibiotiques peuvent causer la synthèse des radicaux libres **(Favier., 2003 ;Mohammedi., 2005).**

3. 1. Effets des radicaux libres sur l'organisme

3.1.1 Oxydation des protéines

Au niveau des protéines, les espèces réactives de l'oxygène agissent sur une série de réactions afin de réaliser le processus d'oxydation selon les étapes suivantes :

1. Modifications oxydatives inverses : commencent par l'oxydation des chaînes latérales de la cystéine, de la tyrosine et de la méthionine, qui sont plus sensibles, entraînant la formation de disulfure, d'acide sulfurique et de sulfoxyde de méthionine. **(Baraibaret al., 2013).**

2. Oxydation de la chaîne polypeptidique : en éliminant le radical hydroxyle de l'atome d'hydrogène sur le carbone alpha de la liaison peptidique, ce qui conduit à la formation d'un radical centré autour du carbone. En l'absence d'oxygène, des liaisons croisées se forment au sein la chaîne après une série de réactions, mais en l'aprécence d'oxygène, une fente se forme. La peroxylation est l'étape la plus importante responsable de la rupture de la chaîne polypeptidique. **(Baraibaret al., 2013).**

3. Formation de groupes carbonyle sur les protéines.

L'oxydation des protéines lors du stress oxydatif est responsable de la survenue de maladies chroniques telles que l'insuffisance rénale. **(Nystrom., 2005)**

3.1.2 Peroxydation lipidique

Les lipides et les acides gras polyinsaturés sont une biomolécule ciblée par les radicaux hydroxyles, où se forme un radical diène conjugué, oxydant le radical peroxyde en extrayant l'hydrogène présent entre deux liaisons carbonées entre elles, cette réaction est appelée peroxydation lipidique. La glutathion peroxydase réagit avec les hydroperoxydes pour les réduire ou continuer à les oxyder en acides aldéhydes et en alcanes (éthylène, éthane). Après clivage, les radicaux peroxydes libèrent divers aldéhydes toxiques. Cette attaque des lipides provoque la formation de LDL oxydées, cause majeure de sclérose vasculaire et de maladies cardiaques. **(Esterbauer et al., 1992)**

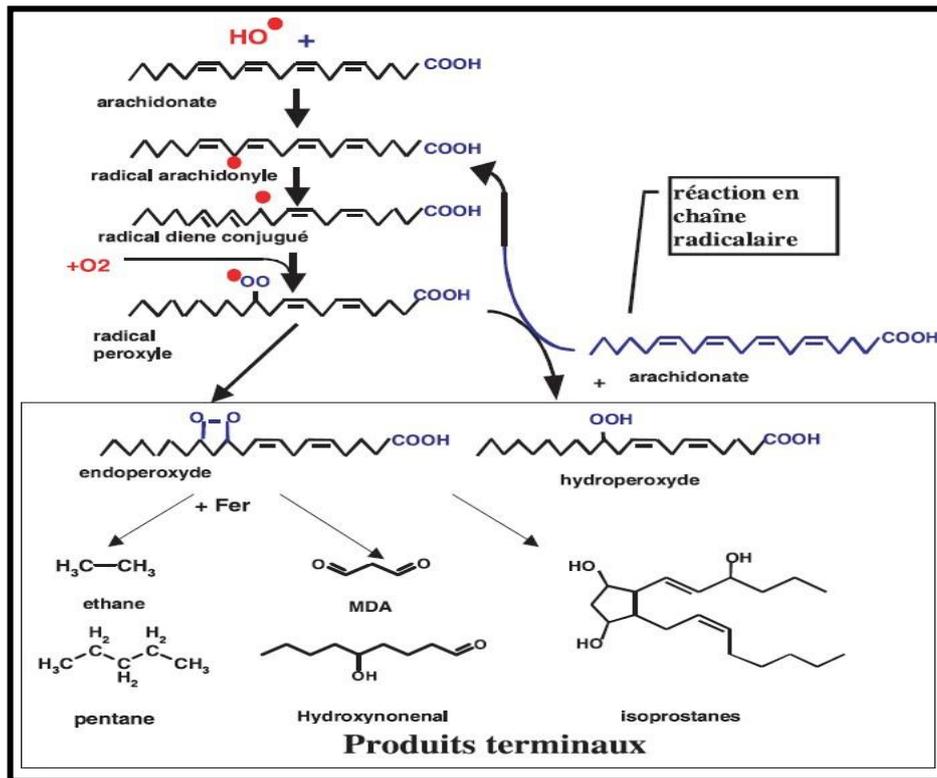


Figure 2 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés. (Alain, 2003)

3.1.3Oxydation de l'ADN

L'ADN est la cible privilégiée de l'attaque des radicaux libres, notamment ses molécules basiques représentées dans les sites abasiques, des adduits intra_caténaux, des cassures de brins, des pontages ADN protéine, et la guanine.

Généré par l'interaction de l'ADN avec des radicaux oxygénés groupe de bases oxydées : 8 oxoguanine, 8 nitro guanine, 8 oxo adénine, 5 hydroxy cytosine. L'attaque du stress oxydatif sur la liaison base-désoxyribose conduit à la formation d'un site abasique, et l'attaque au peroxyde génère des aldéhydes mutagènes.

Au final, l'oxydation de l'ADN provoque une mutation ponctuelle au niveau du génome, et l'impossibilité de copier l'ADN qui conduit au suicide cellulaire programmé et à la conversion des bases GC (guanine, cytosine) en TA (thymine, adénine), ce qui est considéré comme le stade initial du cancer, c'est-à-dire que les cancérigènes sont les générateurs de radicaux libres. (Cadet et al., 2022)

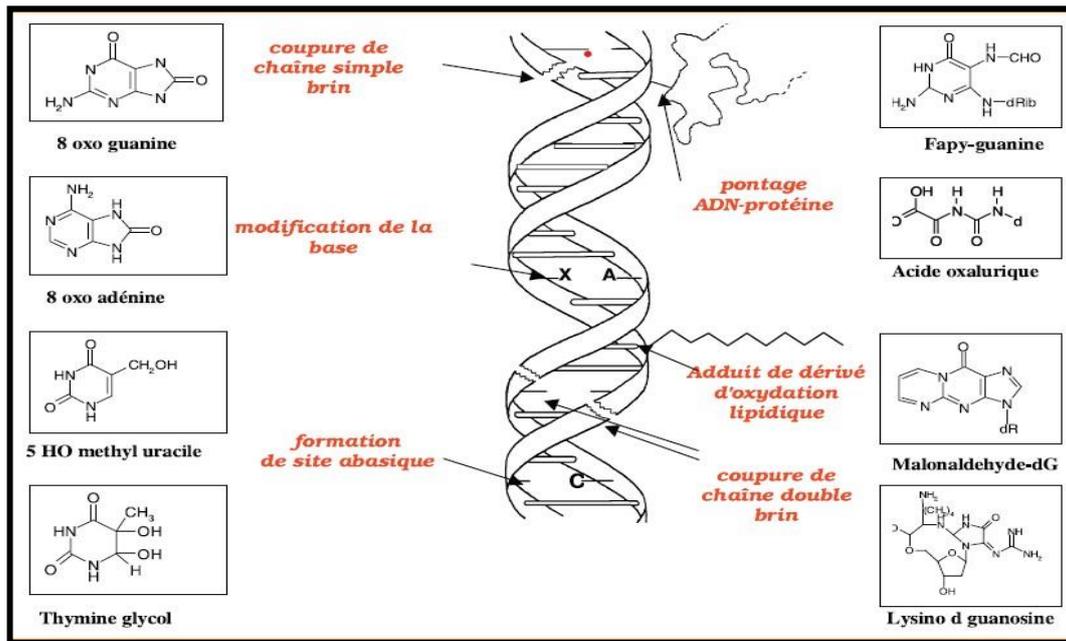


Figure 3 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine

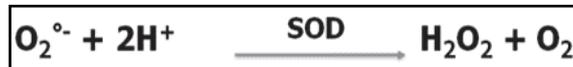
Génétique des cellules. (Alain, 2003)

4. Système Antioxydants

4.1. Système antioxydant enzymatique

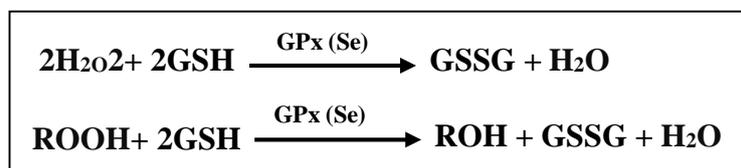
4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Sont des protéines métalliques centrées dans les régions du cerveau, représentant la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydatif en convertissant le superoxyde d'anion (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène et oxygène (H_2O_2), selon la réaction suivante (Haleng et coll., 2007).



4.1.2. Glutathion peroxydase (GPx)

La deuxième ligne de défense enzymatique, est une enzyme trouvée dans la sève cellulaire et les mitochondries. La formation de radicaux libres résultant de l'action du stress oxydatif empêche son tambour principal de réduire H_2O_2 en H_2O en réduisant selon la réaction suivante (Favier., 2003) :



4.1.3. Catalase (CAT)

C'est une enzyme présente dans la majorité des organismes eucaryotes ou procaryotes partout dans les globules rouges (**Hertwig., Streb., Feierabend., 1992**). Une augmentation du niveau de H₂O₂ entraîne l'activation et la stimulation de la catalase, c'est-à-dire la fonction de CAT. La principale est la décomposition de H₂O₂ en H₂O et O₂. (**Pamplona, 2011.**)

4.1.4. GST

Appartient à une famille de bidimensionnelles multifonctionnelles, c'est l'une des protéines basiques qui agissent indirectement contre les toxines des espèces réactives de l'oxygène en transportant le GSH vers les parties cellulaires exposées au processus d'oxydation. Il lie le GSH aux aldéhydes toxiques formés par la peroxydation lipidique pour s'en débarrasser, et de là le rôle de la GST est limité dans le transport, l'attachement cellulaire et la détoxification. Tan, (**Meyer *et al.*, 1986**)

4.2. Système non enzymatique

4.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathione est un tripeptide (d'acide glutamique, de cysteine et de glycine). L'un des antioxydants non enzymatiques les plus importants, dont certains sont synthétisés par l'organisme. Il est présent dans le foie et transporté vers les tissus par le sang. Il fonctionne comme co-enzyme pour les enzymes GPXs pour éliminer le H₂O₂ et réduire l'oxyde oxydé. Protéine (**Powers *et al.*, 2008**) Elle est considérée comme le pilier des autres antioxydants (**Halliwel., Gutteridge., 1999**) Elle se caractérise également par sa capacité à régénérer la Vitamine E. (**Reddy *et al.*, 1982**)

4.2.2. La vitamine E

La vitamine E en particulier l'alpha-tocophérol et le bêta-tocophérol, est l'un des antioxydants non enzymatiques les plus importants. L'alpha-tocophérol étant le plus abondant, tandis que le bêta-tocophérol est le plus actif (**Monaghan et Schmitt., 1932**). La vitamine E joue un rôle important dans la perturbation de la propagation du peroxyde lipidique, car elle interagit directement avec les radicaux libres en transférant des électrons, de l'hydrogène ou en se liant aux radicaux, et elle est également capable de se renouveler par elle-même ou grâce à la vitamine C.

4.2.3. Vitamine C

Aussi appelé acide ascorbique, c'est une molécule un antioxydant qui se trouve dans les reins et le foie à des niveaux élevés chez les mammifères, contrairement à l'homme, chez qui il est disponible à de faibles niveaux. Il agit contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour inhiber leurs effets néfastes sur diverses biomolécules d'organismes vivants. Contribue également à de nombreuses fonctions représentées dans : la régénération de la vitamine E, les mécanismes du métabolisme du fer, le fonctionnement du système immunitaire. (**Ames *et al.*, 1981**)

Chapitre II:
Titane
dioxyde
Nanopartic
ules

1. Nanoparticules

Une nanoparticule (ou particule ultrafine, qualificatif surtout usité en sécurité environnementale et auquel on préférera « nanoparticule » en thérapeutique), est définie par la norme International Organisation for Standardisation (ISO) comme étant un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ. Elles se comportent différemment de leurs homologues plus grands. Une autre définition, plus large, qualifie de « nanoparticule » un assemblage d'atomes dont au moins une des dimensions se situe à l'échelle nanométrique, entre l'Angström, échelle de l'atome et le micromètre ou micron, échelle d'une cellule eucaryote $\approx 10\text{--}100\ \mu\text{m}$, une nanoparticule étant environ 100 000 fois plus petite qu'une cellule humaine moyenne. (**Valentin *et al.*, 2015**)

2. Nanotoxicité

De nombreuses recherches ont été consacrées aux nanoparticules et à sa toxicité, car la manque d'homogénéité dans les paramètres examinés mène à une classification confuse et une évaluation manquant d'objectivité dans la relation dose-effet. Certaines études ont restreint leur analyse à la toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂).

La durée d'exposition, le milieu de dispersion et le type de lignée cellulaire peuvent modifier les réponses biologiques, ainsi les risques peuvent évalués au niveau d'exposition (les hautes doses conclue d'exposition réelle). (**Manon, 2014**). Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétique impact sur la santé humaine et l'environnement, Université du Havre)

3. Titane dioxyde

Produit à partir du titane, le cinquième élément le plus abondant sur la planète, le dioxyde de titane représente une production de 7 200 000 tonnes/an. Il est recherché pour ses propriétés d'indice de réfraction ainsi que sa stabilité biologique et chimique. Il est traditionnellement utilisé comme pigment dans les revêtements de surface (peintures, vernis et laques), plastiques, papiers et, de façon moins importante, dans les fibres, caoutchoucs, cuirs, céramiques, encres d'imprimerie, cosmétiques, savons, médicaments et certains produits alimentaires, mais également comme support de catalyse (**Future, 2011**). Environ 0,7% de la production de TiO₂ comprend la fabrication de nano-TiO₂. Le nano-TiO₂ n'est pas inerte et atténue la radiation ultraviolette (UV). Il est utilisé comme filtre UV (crèmes solaires, cosmétiques, plastiques) et comme catalyseur (produits autonettoyants, filtration de l'air, assainissement de l'environnement) (**Alex, 2013**).

4. Propriétés de l'oxyde de titane

4.1. Propriétés optiques

La plupart des techniques d'élaboration des couches minces ont été utilisées pour préparer des films de TiO₂ de qualité supérieur pour des applications optiques (Sol-gel, évaporation sous faisceau d'électron, pulvérisation réactive, CVD et plusieurs d'autre)

Les points communs des films élaborés pour les applications optiques est leur haute densité et leur faible cristallinité. Ces films peuvent être obtenus à basses températures, ils sont transparents dans un large domaine de longueur d'ondes et ne présentent pas de pertes optiques. (Hong., Lan M., Peng X., Weidman S., Pei-N.W. (2007). Applied Surface Science)

4.2. Propriétés électriques.

Les propriétés électriques des couches minces de TiO₂ sont d'un intérêt considérable mais nous avons trouvé une différence entre les valeurs de la conductivité rapportées dans la littérature et nos valeurs ceci peut être attribuée aux facteurs suivants :

- L'existence d'impuretés.
- L'existence des pores résiduels dans les couches (les couches ne sont pas uniformes).

4.3. Propriétés mécaniques

- Module de traction (Gap) : 250-300
- La dureté : Sur l'échelle minéralogique (Mohas). Tableau 4 : Module d'élasticité normale.

f Résistance à la traction (MPa) 800-1000

f Résistance à la compression (MPa) 350

4.4. Propriétés physiques

Le dioxyde de titane existe principalement sous trois phases cristallographiques : l'anatase, le rutile et la brookite. L'anatase est la phase plus stable à l'échelle nanométrique.

5. Structure cristalline

5.1. 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.

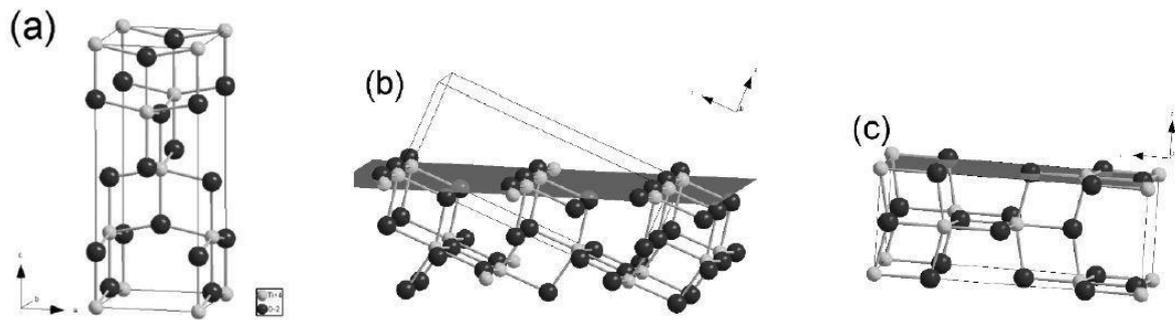


Figure 07 : (a) Structure de TiO₂ en phase anatase, titane (gris) et oxygène (noir). (b) (101) ; (c) (100) construit à partir du CIF COD 7206075.

5.2. 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 TiO₆ partage une arête commune le long de l'axe [001] et un sommet commun avec un autre octaèdre adjacent. Bien que le rutile soit un isolant, par l'ajout de petites quantités de Ti³⁺, sa conductivité électrique peut-être induite via des interactions cation-cation ou Ti³⁺ - anion - Ti⁴⁺. La distance inter-ionique moyenne dans le rutile est de 1,959 Å pour la liaison Ti-O, et de 2,96 Å et 3,57 Å pour les liaisons Ti-Ti. Cette phase présente des activités photovoltaïque et photo-catalytique

intéressantes.

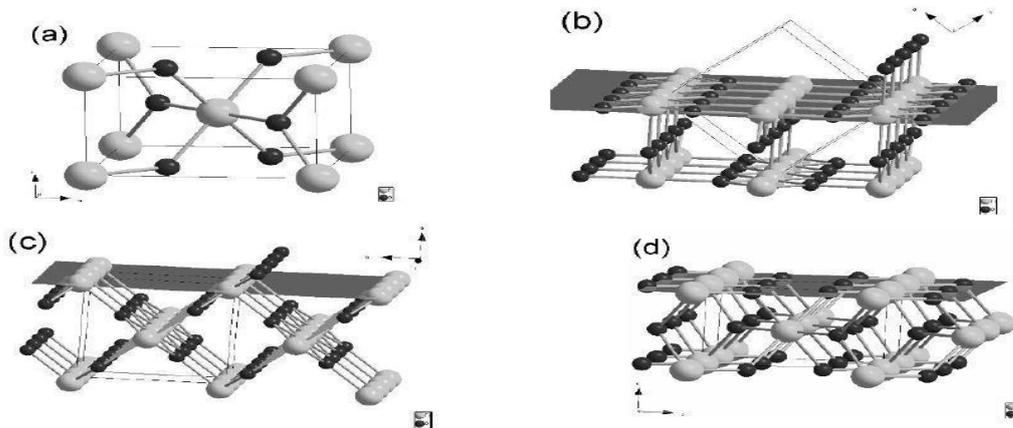


Figure 08 : (a) Structure de TiO₂ en phase de rutile, titane (gris) et oxygène (noir). (b) (110) ; (c) (100) ; (d) (001) construit à partir du CIF COD 9004141

5.3. 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, le brook ite 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.

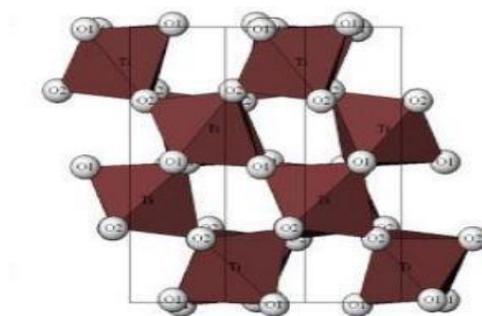


Figure 09 : Les structures cristallines du TiO₂ brookite

6. Activité photo catalytique de TiO2

L'intérêt de la photocatalyse a augmenté sous l'influence de Fuji Hima et Honda, à partir de 1970 qui ont développé une application très prometteuse, celle de la photolyse d l'eau. La catalyse est un processus dans lequel la vitesse et/ou le résultat de la réaction chimique est influencé par la présence d'une substance appelé catalyseur. On distingue 2 types de catalyse :

- ✓ **Catalyse homogène :** le catalyseur et les réactifs sont dans la même phase.
- ✓ **Catalyse hétérogène :** le catalyseur (principalement solide) se trouve dans une phase différente de celle des réactifs (gaz ou liquide).

La photocatalyse, c'est un type de catalyse hétérogène où la lumière est la source d'énergie d'activation de la réaction chimique et non plus la chaleur. Son principe est basé sur l'utilisation d'un semi-conducteur (SC) capable d'absorber des photons ayant une énergie ($h\nu$) supérieure ou égale à l'énergie de sa bande interdite (E_g). Cette absorption mène à la création d'un exciton qui peut se dissocier en une charge positive (trou) et en une charge négative (e^-) dans le volume ou en surface du semi-conducteur.

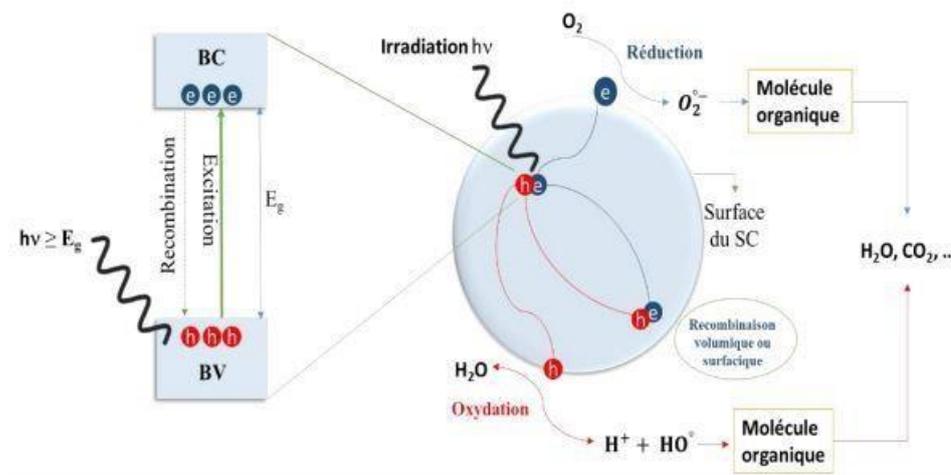


Figure 10 : Schéma expliquée le principe de photocatalyse

7. Préparation de nanoparticules de TiO2

Les trois (03) méthodes suivantes ressemble de préparation de nanoparticules :

7.1. Méthode par voie liquide

Cette méthode vise à la production d'un réseau de Ti-O-H/Ti (OH)_x dans un solvant qui suite à une étape d'élimination du solvant, produit de nanoparticules de TiO₂. En fonction du type

de solvant et de la température, la méthode peut s'appeler : synthèse sol-gel, synthèse hydrothermale, synthèse solvo-thermale, émulsion-précipitation, etc. (Kim *et al.*, 2006)

7.2. Méthode par voie solide

Ces méthodes est basé sur la synthèse MRS. La MRS est centrée sur le broyage des particules micrométriques avec des billes céramiques. Ainsi les particules broyées peuvent atteindre des tailles de l'ordre de 6 nm, le broyage des particules peut être accompagné par la modification structurale du TiO₂ ou par des réactions chimiques afin de produire des mélanges anatase/TiO₂/rutile de TiO₂ dopé ou des composites à base de Ti. (Begin-Colinet *al.*, 1999.)

7.3. Méthodes par voie gaz/vapeur

Ces méthodes est basé sur deux (02) moyens :

3-1 Déposition : Se concentrent sur la déposition des vapeurs issues des réactions chimiques ou des traitements physiques. Nommées Chemical Vapor Deposition (CVD), Physical Vapor Deposition (PVD), Ion Implantation ou encore Sputtering, ces méthodes sont utilisées pour les synthèses de couches minces ou de motifs (à l'aide de masques).

3-2 Combustion : se concentrent sur la décomposition partielle ou totale de précurseurs sous forme gazeuse ou d'aérosol. Nommées laser pyrolyse, spray pyrolyse (flamme spray) ou plasma, ces méthodes sont utilisées pour la synthèse de couches minces ou de nanoparticules. La modification du temps de résidence et du gradient de température permet de régler la taille et la surface des nanoparticules issues de la combustion. (Manuel, 2013)

Chapitre III
Rats et Les
reins

1. Rats

1.1 Généralité

Les rongeurs sont utilisés par 90% à grande échelle par de nombreux peuples et pays dans la plupart des études médicales et de la recherche scientifique, en raison de leur similarité métabolique avec la race humaine et la disponibilité de la majorité des conditions nécessaires en eux : courte durée de vie, coût d'achat bon marché, production abondante et facile, en plus de sa grande diversité génétique

Le rat Wistar est l'une des souches les plus anciennes sélectionnées pour des études de toxicité aiguë ou chronique ou dans le domaine de la pharmacologie. Nous comparons les caractéristiques sanguines des échantillons analysés avec celles des rats utilisés comme témoins oculaires. (RAO., 1990)

Wistar Rat à longues oreilles, longueur de la queue de 17 à 35 cm, longueur du corps de 35 à 50 cm, poids de 150 à 500 grammes, âge de 2 à 3 ans (Descat., 2002)



Figure 11 : Rat Wistar (photo personnelle)

2. Classification

Tableau01 : Classification de rat (Descat, 2002)

L'éperon	Classe	Commander	Sous-ordre	Famille	Sous-famille
Vertébré	Mammifères	Rongeurs	Myomorphes	Muridae	Muridae

Il existe quatre types de souches : la première est la souche autofécondée résultant du croisement des parents, y compris le rat Lewis et Fischer. Deuxièmement, les souches hybrides F1 résultant de l'accouplement de deux souches autofécondées différentes. La troisième souche est la souche mutante de son genre, le rat SHR et aussi le rat Brattleboro, en plus de nombreuses autres espèces. En ce qui concerne la dernière souche, c'est la souche non issue de la reproduction qui est le résultat d'une vaccination aléatoire entre les sexes à partir de personnes non apparentées. Ces souches comprennent Wistar et Long Evants. **(Descat., 2002)**

3. Utilisation dans la recherche scientifique

Après près d'un demi-siècle d'études utilisant plusieurs animaux, tels que les chats, les chiens, les singes et les lapins comme modèles anatomiques vivants dans les domaines scientifiques et médicaux, le choix est tombé sur les rats comme "être vivant" pour répondre aux besoins de la science, en raison de leur facilité d'entretien, capacité à se reproduire rapidement, ainsi que leur conformité et formation facile, en plus de leur adaptation aux changements environnementaux et taille appropriée. Il est difficile de trouver un autre animal qui possède ces vertus. **(Clause., 1993).**

De nos jours, le rat Wistar est devenu un choix idéal pour les études de toxicité et de toxicité chimique sur le corps humain, en raison de ses caractéristiques uniques, comme sa similarité avec les systèmes du corps humain et ses schémas de circulation sanguine qui sont similaires à ceux chez l'homme. Ainsi, le rat est passé d'un animal exclu à un héros scientifique. **(Clause., 1993).**

4. Les reins

4.1.1. Morphologie générale

Les reins sont deux organes situés dans la partie postérieure de l'abdomen, de chaque côté de la colonne vertébrale. Chaque rein mesure environ 11 cm de long, 6 cm de large et 3 cm d'épaisseur. Le rein droit est situé plus bas, le rein gauche est souvent un peu plus gros et un peu plus étroit et allongé. **(Pellet, 1977).**

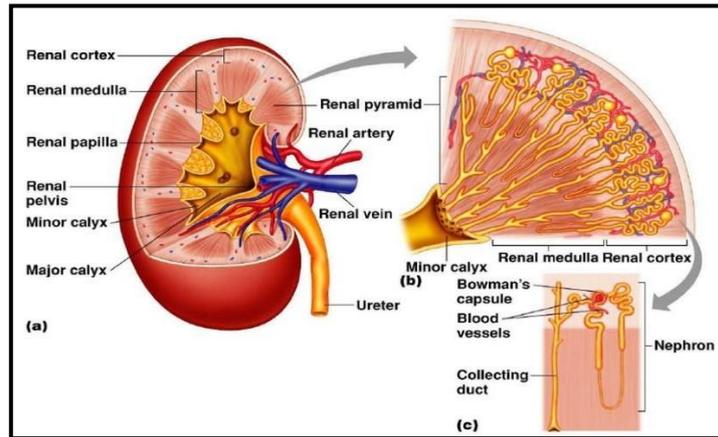


Figure 12 : Structure macroscopique des reins (Principes de physiologie humaine, 2008.)

4.2. Aspect macroscopique

On distingue:

- Zone périphérique, noire et granulaire, qui est la zone corticale, ou cortex rénal, s'étendant par des travées convergent vers le hile : colonnes de Bertin.
- Zone centrale, plus légère, striée longitudinalement, occupant l'espace entre les colonnes de Bertin : c'est la zone médullaire. Il y a 8 à 12 pyramides striées dans cette zone, appelées pyramides de Martensien, dont le nombre varie selon les espèces.

La base de ces pyramides est couverte de cortex, tandis que le haut de chaque pyramide dépasse vers le centre du rein, formant une petite coupe. Chaque petite tasse recueille l'urine de la pyramide et se joint pour former la grande tasse, qui à son tour forme le bassin où les reins s'écoulent dans les uretères. (Lüllmann et al., 1998).

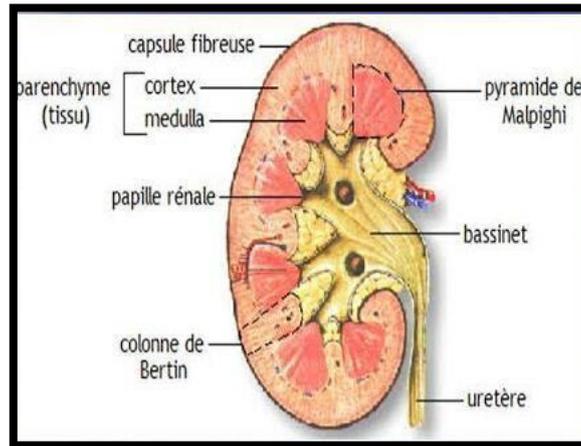


Figure 13 : Vue macroscopique du rein (Lüllmann et al. 1998).

4.3. Aspect microscopique

Le parenchyme rénal est essentiellement constitué d'un grand nombre d'unités anatomiques appelées néphrons, qui ont deux parties physiologiquement et anatomiquement distinctes : les glomérules et les tubules rénaux. **(Pellet., 1977).**

Le glomérule est un réseau de petits vaisseaux sanguins, les capillaires, entourés d'une structure appelée glomérule qui agit comme filtre. Dans les glomérules, la membrane de base des capillaires délimite deux espaces : un à l'intérieur, appelé lumen capillaire ou espace intime; l'autre situé à l'extérieur, appelé l'espace extracapillaire ou extramembraneux. **(Magali et al., 2008).**

Le tubule est divisé en trois parties fonctionnelles :

- Tubule proximal : Situé derrière la capsule de Bowman et devant la boucle de Henlé, il participe à la réabsorption de certaines substances. La boucle de Henle est la partie du néphron qui va du tubule proximal au tubule distal. Il est principalement responsable de la concentration de l'urine, qui est liée à l'urée.

La partie alambiquée du tubule tordu distal entre en contact avec les artérioles afférentes de son néphron à une structure appelée appareil juxtaglomerulaire. C'est à ce niveau que la rénine, une hormone clé des reins qui contrôle la tension artérielle, commence à être sécrétée.

Canal collecteur représentant l'extrémité droite du tubule circonscrit distal. **(Blanchard.,2008).**

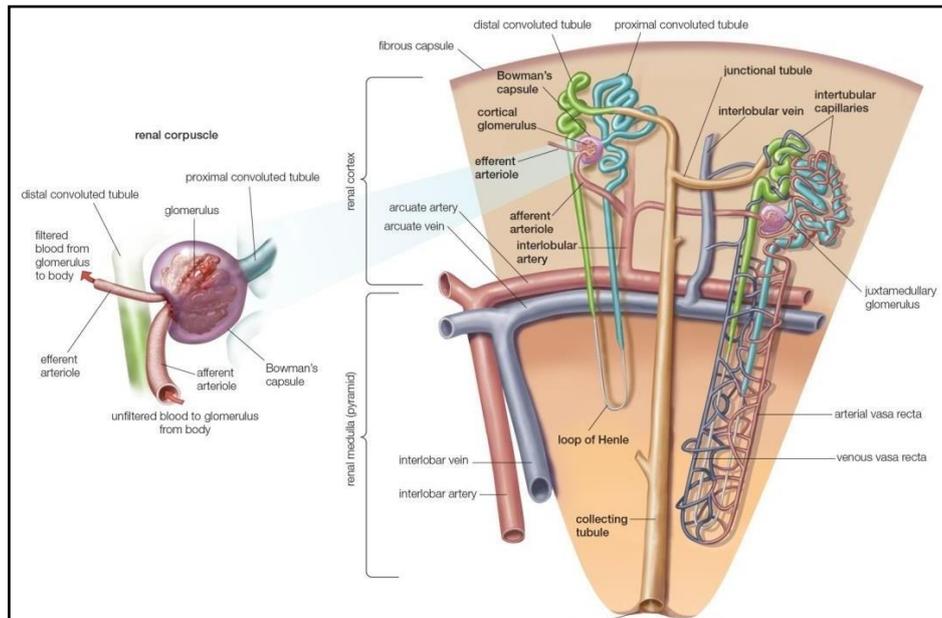


Figure 14 : Segmentation anatomique et fonctionnelle du néphron (ritannica, The Editors of Encyclopaedia.2022,(

5. Fonctions rénales

Le rôle vital du rein est étroitement lié à sa fonction dans l'homéostasie environnementale.

À l'intérieur, la batterie est protégée contre les changements dans l'environnement de l'organisme.

- Élimination rénale des produits finaux métaboliques (urée, protons, acide urique, créatinine, bilirubine, etc.), un grand nombre de substances exogènes telles que certainMedications et additifs alimentaires et des quantités appropriées d'eau et d'électrolytes
- Filtration glomérulaire : Première étape dans la formation de l'urine. Selon le taux de filtration dans les capillaires glomérulaires, le plasma passe par le glomérule dans la cavité de Bowman (**Bangert et Steven, 2004**)
- Réabsorption et sécrétion tubulaire : les glomérules filtrent 180 litres de liquide sans protéines par jour mais contiennent de nombreux électrolytes et déchets (**Pellet., 1977**).
- Contrôler et maintenir l'équilibre de certains minéraux et électrolytes : sodium, potassium, calcium, phosphore, etc. (**Marchall et Bangert., 2004**).
- Purifie l'environnement interne : élimine les déchets corporels (urée, ammoniac), les toxines (substances médicinales) et l'excès de liquide (**Marchall et Bangert., 2004**).
- Synthèse de la vitamine D Les reins transforment la vitamine D d'une forme inactive en une forme active (**Brunner et al., 1982**).

6. Franchissement de TiO₂ NPs la barrière intestinale

Le tube digestif est une des principales voies d'exposition de l'individu aux NPs présentes dans notre environnement et donc la translocation de ces derniers vers le reste de l'organisme

En général, l'absorption des particules dépend de leur taille, les plus petites étant mieux absorbées que les plus grosses.

Cependant, le site de translocation de toute NPs au niveau de l'épithélium intestinal reste difficile à déterminer. Leur nature inorganique à l'exemple des oxydes métalliques utilisés dans l'alimentation (TiO₂, ZnO...) n'autorise aucun suivi immunohistochimique, car dépourvu de site antigénique et leur échelle nanométrique nécessite de hauts niveaux de résolution optique

D'après E. Houdeau, 2012 la translocation des NPs (ou microagrégats de NPs) dans et à travers la muqueuse gastro-intestinale peut cependant se produire par quatre voies différentes

1. Endocytose par les entérocytes (principal type cellulaire de l'épithélium intestinal) par lesquels de très petites NPs (diamètre <50-100nm) peuvent traverser.
2. Absorption (transcytose) par les cellules M, des cellules spécialisées dites « présentatrice d'antigènes » concentrées dans les plaques de Peyer (amas lymphoïdes dans l'intestin grêle). C'est la voie par excellence, abondamment décrite, pour l'absorption des NPs présentes dans la lumière intestinale, en particulier pour les NPs de grande taille (20-100 nm) et les agrégats submicroniques (100-500 nm).
3. Passage par persorption au travers de laissées dans l'épithélium suite à la perte d'entérocytes (apoptose). De petites et larges NPs sont susceptibles d'accéder aux muqueuses de l'intestin par cette voie, mais restent quantitativement peu efficaces.
4. Translocation paracellulaire, déterminée par l'efficacité des complexes de protéines des jonctions serrées qui régulent cette voie de passage entre les cellules épithéliales. Le passage paracellulaire est classiquement une voie d'échanges pour l'eau et les électrolytes. Seules des NPs de petites dimensions, hydrophiles, sont susceptibles de traverser l'épithélium intestinal par cette voie chez l'individu sain (**Turner., 2006**).

Matériels

Et

Méthodes

I. Matériel et methods

I.1. Material

I.1.1. Les animaux de laboratoire

Cette étude a été réalisée sur 18 rats mâles de race *Rattus rattus* de la souche Wistar, âgées entre 2 et 3 ans et pesant entre 180 à 220 g au début de l'expérimentation provenant de l'institut pasteur d'Alger (**centre d'élevage El Kouba, Alger**) (**Figure 15**).

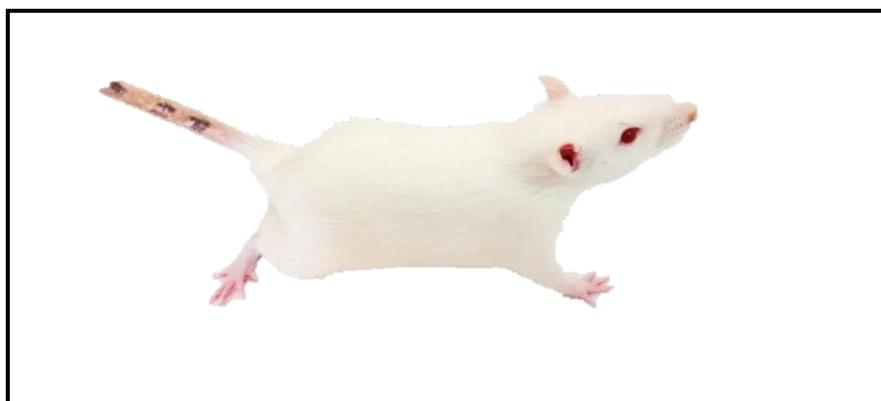


Figure 15 : Rat mâle *Rattus* de la race Wistar

I.1.2. Produits chimiques

Dans ce travail, nous avons utilisé de nano dioxyde titanium pour le traitement des rats sous forme d'une solution à deux doses pendant chaque jour.

I.2. Methode

I.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 Tébessa. 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 (**Figure 16**).



Figure16 : Répartition des rats.

1.2.1.2Alimentation

Les animaux ont été nourris d'un concentré de croquets énergétiquement équilibré composé de Protéines brutes 22 (%), maïs 62(%), graisse brutes 1,6 (%), cellulose 1,0(%), minéraux 1,0(%), vitamines 1,0(%) (**Figure 17**).



Figure 18 : Alimentation (croquets)

1.2.2. 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



Figure 19: TiO₂ utilisé dans l'expérience

I.2.3. Répartition et traitement des rats

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

Lots T : lot témoin (T) reçoit l'eau distillée par gavage 0,5ml/jour pendant 90jours.

Lots L1 : traités par TiO₂ recevant 2,5 ml/kg/jour pendant 90jours.

Lots L2 : traités par TiO₂ recevant 1,25 ml/kg/jour pendant 90jours (Figure 16/20).

Remarque : trois rats de chaque lot a été utilisé pour l'étude des mitochondries par l'oxygraph.



Figure 20 : Sonde de gavage



Figure 21 : Gavage par voie orale

I.2.4.1. La mesure de poids

La mesure de poids effectuée sur les rats chaque 7 jours pendant toute la durée du traitement à l'aide d'une balance électronique (**Figure 22**).



Figure 22 : Mesure du poids

1.2.3. Etude de la toxicité de TiO₂

A. Sacrifice et extraction des Reins

A la fin de la période d'administration de TiO₂, les rats sont sacrifiés après un prélèvement sanguin intracardiaque (**Figure 24**) et les reins ont été rapidement prélevés et rincés dans le tampon de lavage à froid, puis séchés par un papier semi absorbant (**Figure 23**).

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.

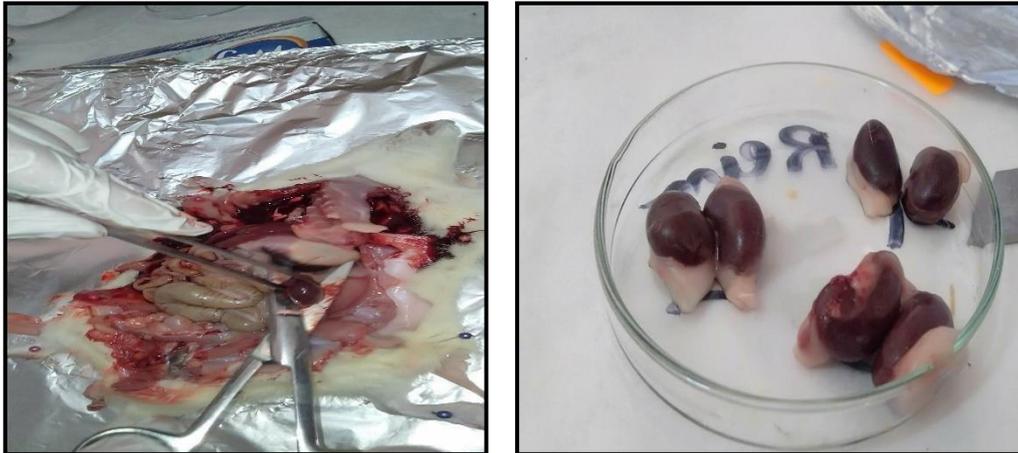


Figure 23 : Sacrifice et prélèvement des reins



Figure 24 : Prélèvement sanguin des rats

B. Estimation du poids relatif des reins

Le poids relatif des reins extraits des rats (PRC [g/100g de poids corporel]) est calculé par rapport au poids total du rat selon la formule suivante :

$$\text{PRC (g/100g de PT)} = \text{PC/PT} \times 100$$

PC : poids du rein (g).

PT : poids total de rat (g).

PRC : poids relatif des reins (g)

C. Evaluation des paramètres de stress oxydatif

C.1 Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode de (Buege et Aust., 1984). Cette méthode basée sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un pigment rose.

Protocole expérimental :

- Préparer les homogénats à partir de 200 mg d'organe broyer à froid dans 2ml de tampon TBS (ph=7.4 ajuster par NaOH ou HCl) [TBS=dissoudre 8.775 (1.755) g NaCl dans 11 ED + 6.057g(1.2114) Tris et compléter le volume à 1ml par la solution NaCl]
- Prélever 375 µl de la surnageant
- Additionner 375µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) (TCA-BHT= 20g TCA dans un 100 ml ED + 1g de BHT et compléter par solution TCA à 100 ml agiter à chaud)
- Agiter et centrifuger à 1000 tour/10min
- Prélever 400µl du surnageant + 80µl HCl (0.6M) (HCl =10ml ED puis verser délicatement 515 µl HCl)
- Ajouter 320µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM). [Tris-TBA = 3.149 (0.09447) g Tris dans 30 ml ED +17.299 (0.51897) g de TBA dans un becher et compléter par la solution Tris jusqu'à 30 ml]
- Mélanger et agiter, ensuite incubé au bain marie à 80°C pendant 10minutes.
- La lecture de la densité optique des échantillons est mesurée contre un blanc contenant

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{156} \times \frac{Vt}{Vs} \text{ mg de protéines}$$

du tampon tris-HCl remplace le surnageant.

- Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :
- **X : (Taux du MDA)** : micromole de substrat hydrolyse par mg de protéines (µM/mg deprotéines).
- **Δ Do** : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

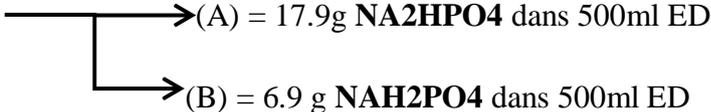
- **156** : coefficient d'extinction molaire du TBA.
- **Vt** : volume total dans la cuve : 1ml (volume total du butanol récupère renfermant les Complexes TBA/MDA).
- **Vs** : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.
- **mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

C.2 Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)

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-Chloro-2,4-dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH), la conjugaison entraîne la formation d'une molécule nouvelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4-Dinitrobenzène 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.

Protocole expérimental :

- Préparer 200mg d'organe broyer à froid dans 2 ml de tampon phosphate TP (0,1 M; PH 6) avec saccharose

- TP = 

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

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

TP 2= 100 ml sans saccharose

- 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 1.2 ml du mélange CDNB /GSH (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1 M, pH 06)]. Sans saccharose (préparer le même jour de dosage)

- La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.
- La lecture de l'absorbance se fait à 340 nm après 30 s en intervalle de 3 min.

Concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$G(\text{nmol GST/min/mg protéine}) = \frac{(DO \text{ échant/min} - DO \text{ blanc/min})}{9,6 \times \text{mg de protéine}}$$

- ❖ ΔDO échantillon – ΔDO blanc : moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute.
- ❖ ϵ : Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB, ϵ C-DNB=9.6 mM⁻¹.cm⁻¹
- ❖ **L**: Trajet optique de la cuve =1cm.

C.3 Dosage du glutathion (GSH)

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

Protocole expérimental :

- Préparer les homogénats à partir de 1ml de culture avec tampon phosphate EDTA (0,02M) [EDTA = 7,448 g EDTA dans un 1000 ml eau distillée]
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution de SSA (0,25%) [SSA = 0,25 g ASS dans un 100 ml eau distillée]
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000 tours/min pendant 5min.
- Prélever 0,5 de surnageant.
- Ajouter au mélange 1000 µl de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA, pH 9,6)

- Ajouter au surnageant 0,025ml de DTNB = [200 mg DTNB dans un 50ml méthanol absolu].
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur
- La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500 µl eau distillée.

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

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

- ✓ **DO** : la densité optique.
- ✓ **1** : Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml de l'homogénat
- ✓ **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

La concentration de GSH est mesurée par rapport à 1mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

C.4 Dosage de la catalase

L'activité de la catalase est déterminée selon la méthode de **CaKmak et Horst (2003)**. Le principe repose sur la disparition de l'H₂O₂ à 25°C par la présence de catalase.

- Protocole expérimental :
- Broyer 200 mg dans 2ml de tampon phosphate (100Mn ; PH 7.4) centrifugés à 3000 tours pendant 10 min.

- Prélèver 100µl de surnageant.
- Ajouter 50µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3 ml [H₂O₂ =0.3ml + 100ml ED]
- Ajouter 2850µl de TP (50mM, pH 7,2)
- L'étalonnager de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique.
- La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.
- L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines. (100 Mm, pH 7.4).
- La lecture des absorbances s'effectue après 15 secondes d'attente toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde UV de 240 nm contre un blanc avec 800 µl de tampon phosphate (100 Mm, Ph 7,4) et 200 µl de H₂O₂
- L'activité CAT est calculée par la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO \times 10}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines}}$$

- **X** : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/mn /mg de protéines).
- **Δ DO** : différences de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat pendant une minute.
- **ε** : Le coefficient d'extinction du H₂O₂ (3900 µM⁻¹.Cm⁻¹. L)
- **L** : longueur de la cuve utilisée (1cm).
- **Mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

C.5 Dosage du GPx

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler., (1984)**, en utilisant H₂O₂ comme substrat.

Protocole expérimental :

- Homogénéisation par 2ml de tampon phosphate (PH =7.4)
- Centrifugeur à 3000 tours pendant 10min.
- Prélever 200 µl de l'homogénat
- Ajouter 400 µl de GSH
- Ajouter 200 µl de tampon phosphate (0.067M, pH 7.4)
- Incuber au bain marie (25°C/5min) ;

- Ajouter 200 µl de H₂O₂ (1.3mM) pour initier la réaction et laisser agir pendant 10 minutes ; -Après 10 min ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction -Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes
- Centrifuger durant à 3000 tours/10min
- Prélever 480 µl de surnageant et mélanger avec 2,2 ml de Na₂HPO₄ 0.32M et 320 µl de DTNB (1,0 mM).
- Après 5min la densité optique est mesurée à 412nm chaque 30sec pendant 05 min.

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante :

- **DO** : échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- **DO étalon** : Densité optique de l'étalon.
- **0,04** : Concentration de substrat (GSH).

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

D. Evaluation des paramètres biochimiques

Dosage des métabolites (glucide, protéine et lipide) : Le dosage des différents métabolites a été réalisé selon le procédé de (**Shibkoetal., 1966**). Les échantillons (les reins des souris) sont placés dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 min), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau & Florkin, (1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 min), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (**Goldworthy et al., 1972**) et le culot II, dissout dans l'eau distillée, servira au dosage des protéines selon **Bradford, (1976)**.

D.1 Dosage de glucide :

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de (**Duchateau et Florkin ., 1959**). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone+, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distille) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard

Protocole expérimental :

- Additionner à une fraction aliquote 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai.
- Ajouter 4 ml de réactif d'Anthrone.
- Incuber du mélange dans un bain marie à 80 °C pendant 10 min.
- Une coloration verte se développe, L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la quantité de glucide présent dans l'échantillon.
- La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère du glucose (1 mg/ml

D.2 Dosage de lipide :

Le taux des lipides a été déterminé selon la méthode de (**Goldsworthy *et al.*, 1972**). Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide ortho phosphorique à 85% et 55ml d'eau distillée) .

Protocole expérimental :

- Prélever 100 µl de l'omogénat (surnageant)
- Ajouter 1ml d'acide sulfurique (98%).
- Incuber au bain marie 100°C° pendant 10min.
- Prélever dans chaque tube 200µl de surnageant.
- Ajouter 2,5ml de réactif sulfo-phospho-vanillinique.
- Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm.

D.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

Protocole :

- Récupérer le culot issu de la deuxième centrifugation.
- Ajouter 1ml du NaOH (0.1N).
- Agiter énergétiquement pour la dissolution des protéines.
- Prélever un volume de 100µl de mélange.
- Ajouter 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500mlavec l'eau distillée).

- Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les
- Echantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm.

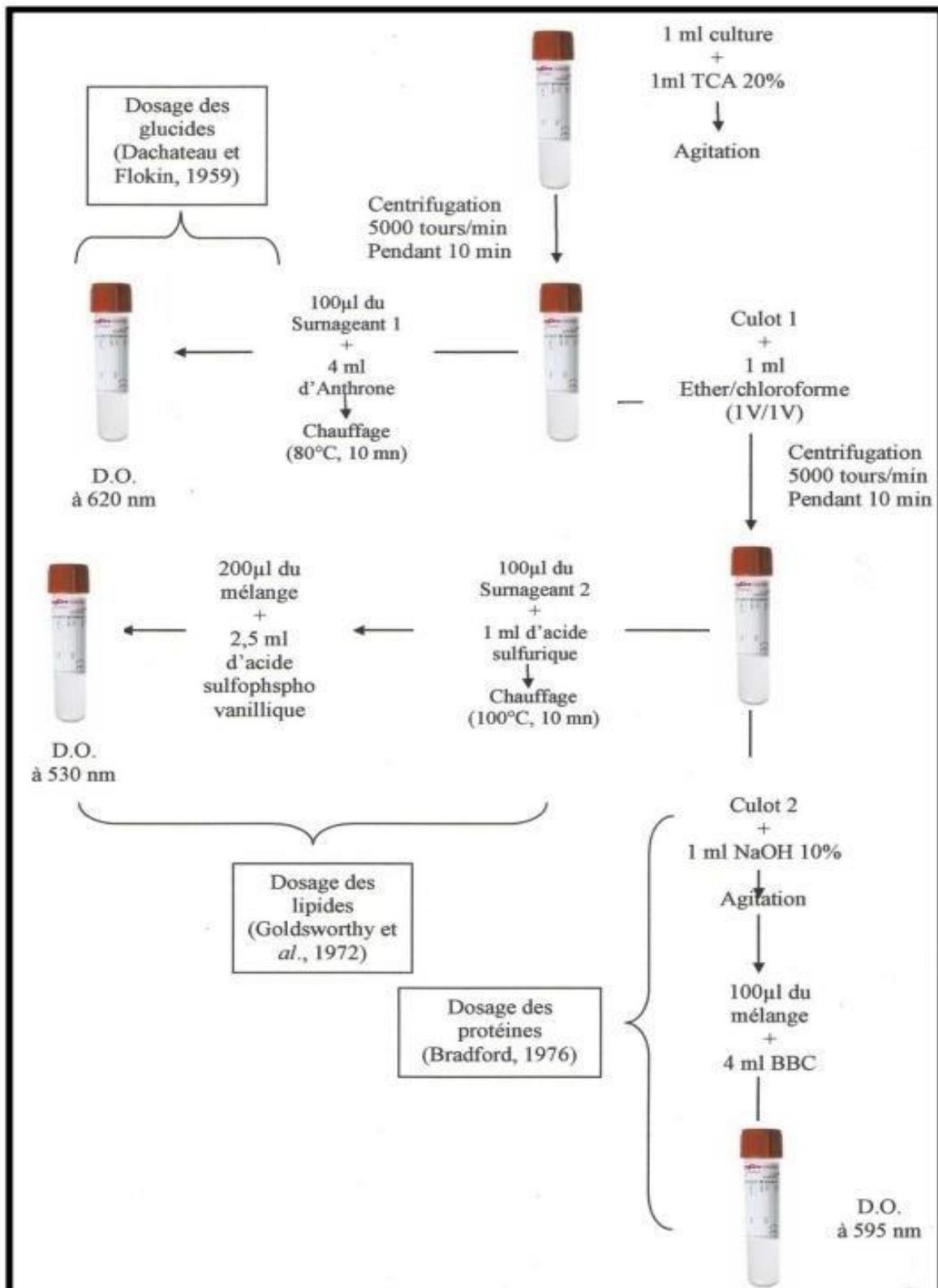


Figure 25 : Extraction et dosage des glucides, protéines et lipides totaux

1 .2.4Analyse statistique :

Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage en utilisant Excel.

L'analyse statistique des données est effectuée par le test ANOVA à One-Wey suivipar le test de Tukey et du Dunnet pour la comparaison entre les différents lots entre eux et la comparaison avec le lot témoin. Cette analyse a été faite grâce au logiciel Minitab (Version 18).

Les différences sont considérées comme :

Significative lorsque ($P < 0,05$).

Hautement significative lorsque ($P < 0,01$).

Très hautement significative lorsque ($P < 0,001$).

Avec p : seuil de signification.

Résultats

2. RESULTATS

2.1.1. Effet du TiO₂ NPs sur Gain de poids et le Poids relatif du rein (%) des rats

- **Gain de poids**

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 26) montrent qu'il y a une diminution hautement significative ($P < 0.01$) du poids des reins chez les lots traités par TiO₂ NPs par rapport au lot témoin.

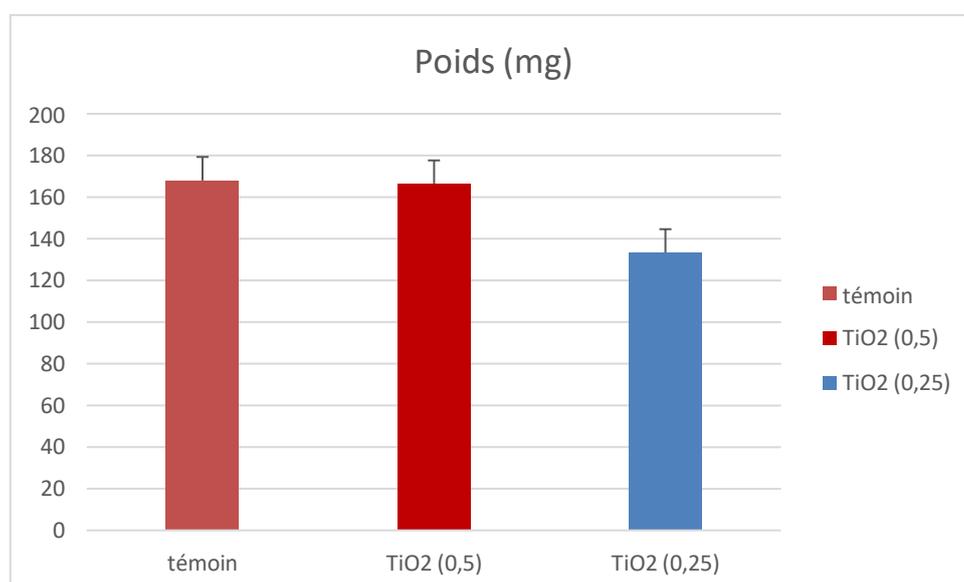


Figure 26 : L'évaluation du gain de poids corporel (GP) chez les lots traités par TiO₂ NPs par rapport au lot témoin.

- **Poids relatif**

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 27) montrent qu'il y a une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) du poids relatif des reins chez les lots traités par TiO₂ NPs par rapport au lot témoin.

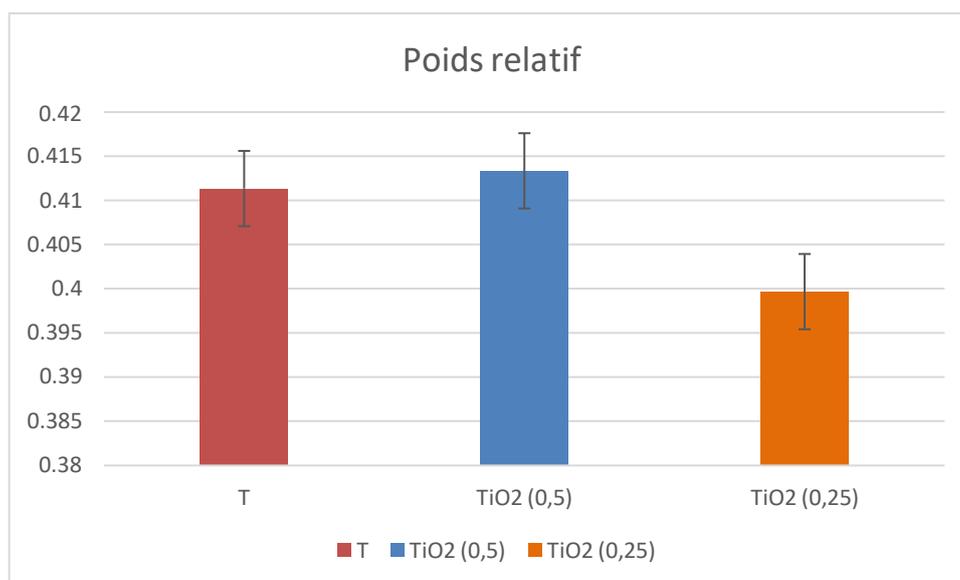


Figure 27 : L'évaluation du poids relatif des reins (PRr) reins chez les lots traités par TiO2 NPs par rapport au lot témoin.

2.1.2 Étude des paramètres biochimiques, paramètres enzymatiques et non enzymatique :

2.1.2.1 Effets de TiO2 NPs sur les paramètres biochimiques chez les rats

Taux de protéine

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 28) montrent qu'il y a une augmentation non significative ($p > 0.05$) chez les rats traités par TiO2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation hautement significative du taux de protéine des reins ($p < 0,05$) chez les lots traités par TiO2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

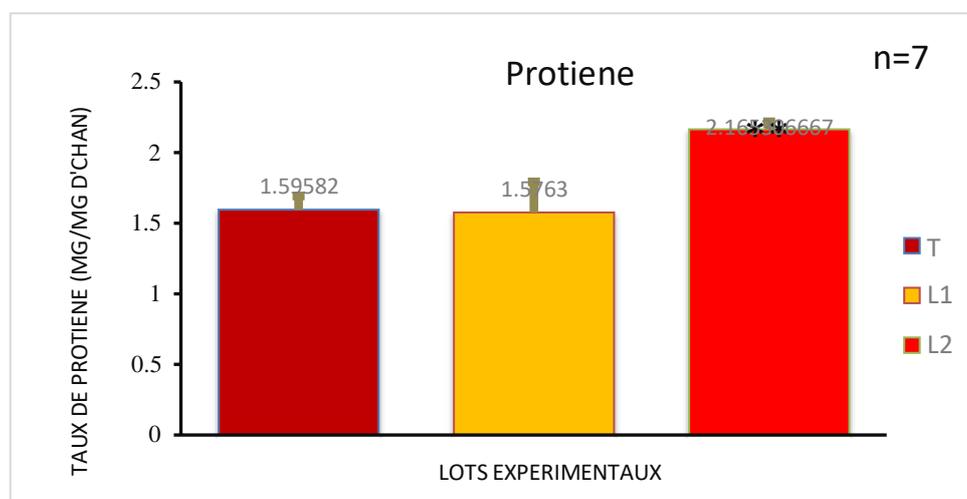


Figure 28 : Taux de protéines chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

Taux des glucides

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 29) montrent qu'il y a une augmentation non significative ($p > 0.05$) chez les rats traités par TiO₂ NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

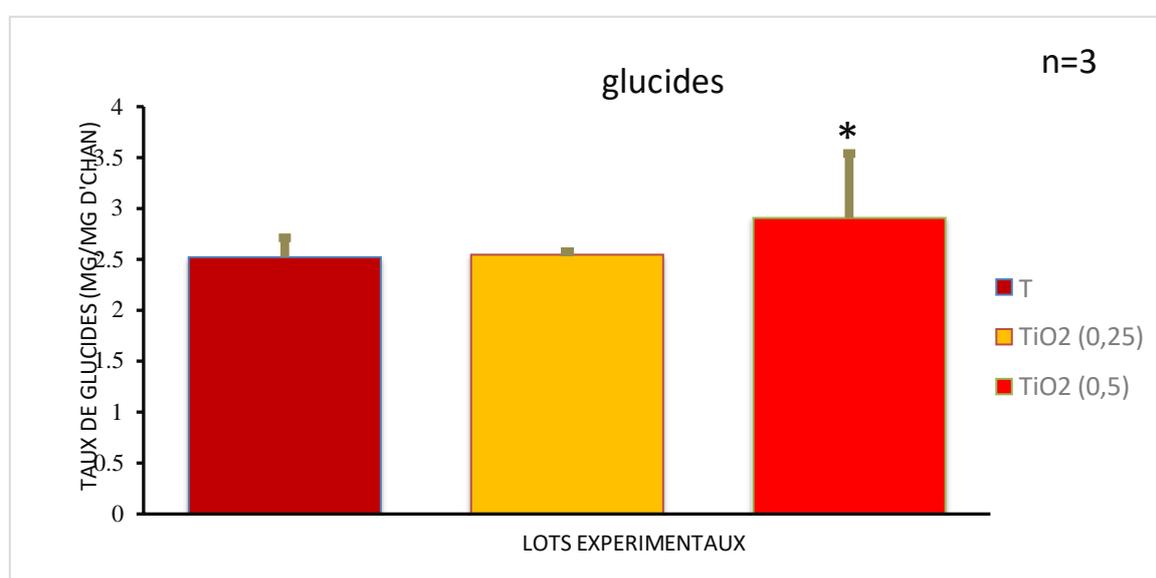


Figure 29: Taux des glucides chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

Taux de lipide :

Les résultats obtenus présentés dans la (figure 30) montrent qu'il y a une augmentation hautement significative du taux de protéine des reins ($p < 0,05$) chez les lots traités par TiO₂ NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA rénale chez les rats traités par TiO₂ NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

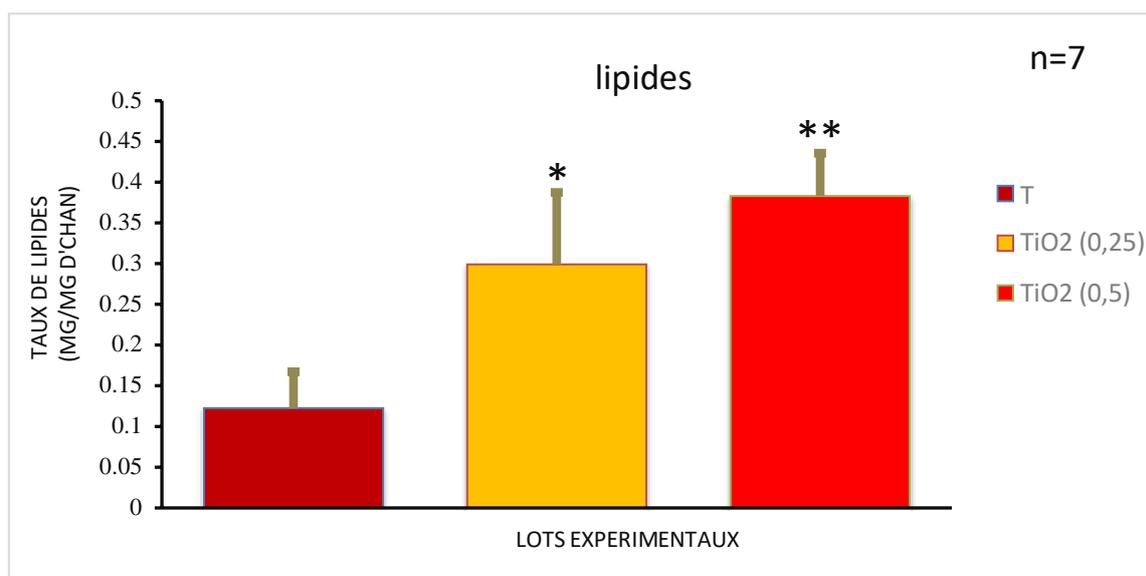


Figure 30 : Taux des lipides chez les rats traités par TiO2 NPs par rapport les témoins

2.2.2. Evaluation des paramètres biochimiques (l'urée ; La créatinine ; Bilirubine)

Les résultats représentés dans le **tableau (02)** montrent que l'administration de TiO2 NPs induit une augmentation hautement significative ($p < 0.01$) chez les lots traités par TiO2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) du taux d'urée et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les rats traités par TiO2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport ou groupe témoins. Et une diminution significative ($p < 0.05$) du taux de créatinine chez les lots traités par TiO2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une diminution hautement significative ($p < 0.01$) chez les rats traités par TiO2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport ou groupe témoins. Et aussi une augmentation très hautement significative ($P \leq 0.001$) du taux de Bilirubine chez les lots traités par TiO2 NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les rats traités par TiO2 NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport ou groupe témoins.

Tableau 02 : Concentration de Bilirubine, urée et créatinine chez le groupe témoin et les groupes traités.

Paramètre	Groupes des rats		
	Témoin	TiO2 (2,5 ml/kg/jour)	TiO2 (1,25 ml/kg/jour)
Purée (g/l)	0,4±0,0707	0,476±0,085**	0,453±0,055*
La créatinine (mg/l)	3,815±0,19	2,82±0,54*	1,743±0,82**
Bilirubine(mg/l)	0,615	5,306 ±1,93***	1,29±0,142*

	±0,247		
<p>* : Différence significative comparant au témoin ($P \leq 0.05$).</p> <p>** : Différence hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.01$).</p> <p>*** : Différence très hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0.001$). P : Seuil de signification.</p>			

2.2.2.1 Effets de TiO₂ NPs sur les paramètres enzymatiques chez les rats :

Effet sur l'activité de GPx

La **figure (31)** représente la variation de GPx chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins, dans notre travaille nous observons que il y a une diminution hautement significative ($P < 0.01$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (0,25ml/kg/jour) et une diminution significative ($p > 0.05$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (0,5 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

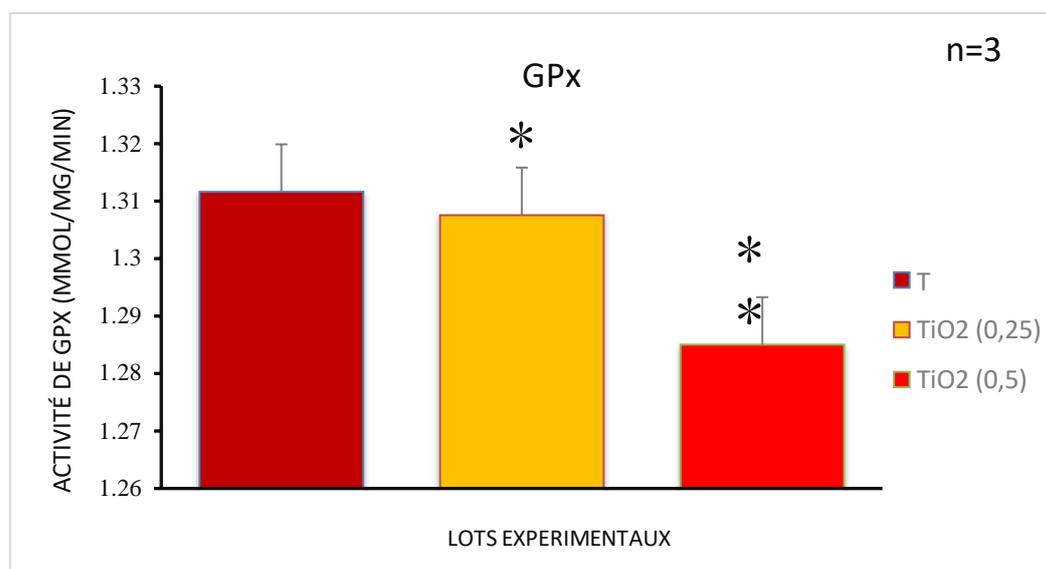


Figure 31 : La variation de GPx chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

CAT

Les résultats obtenus présentés dans la (**figure 32**) montrent qu'il y a une diminution significative ($p < 0.05$) du taux de créatinine chez les lots traités par TiO₂ NPs à dose (2,5

ml/kg/jour) et une diminution significative ($p < 0.05$) chez les rats traité par TiO₂ NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

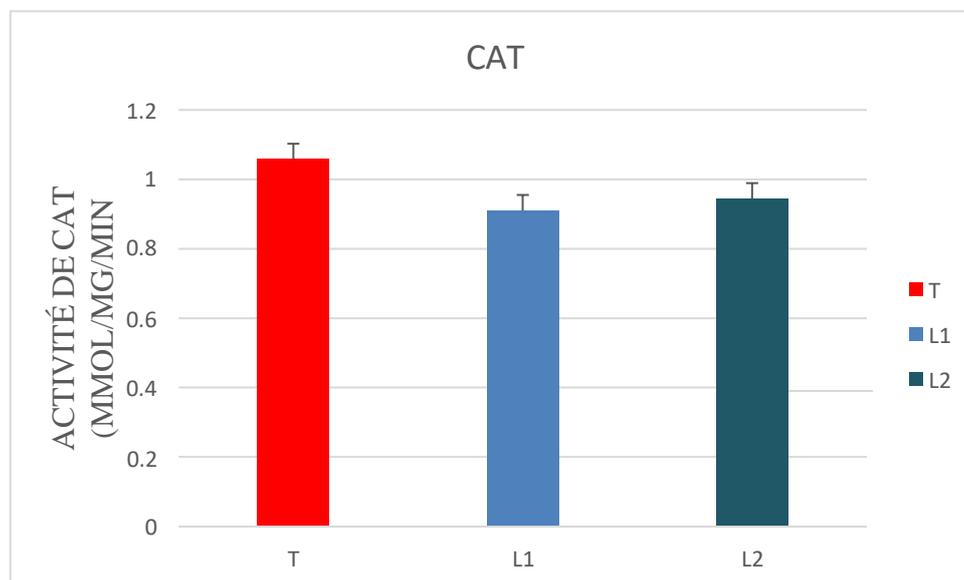


Figure 32 : L'évaluation de l'activité de la CAT ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) .

Effet sur les variations de l'activité GST (Glutathion –S-transférase)

Cette **figure (33)** représente la variation de l'activité de GST traités par TiO₂ NPs par rapport aux témoins, dans notre travail nous observons qu'il y a une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation significative ($p < 0.05$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (1,25 ml/kg/jour) par rapport au groupe témoins.

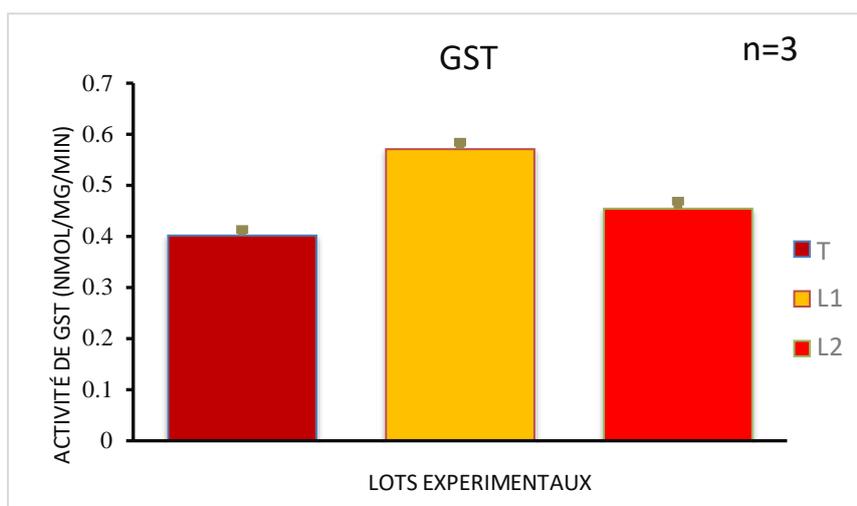


Figure 33 : La variation de l'activité de GST traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

2.2.2.2 Effets de TiO₂ NPs sur les paramètres non enzymatiques chez les rats:

Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats présentés dans la **figure (34)**. On observe une augmentation très hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA rénale chez les rats traité par TiO₂ NPs (2,5 ml/kg/jour) et une augmentation non significative ($p > 0.05$) chez les rats traité par TiO₂ NPs (1,25 ml/kg/jour) par rapport aux témoins.

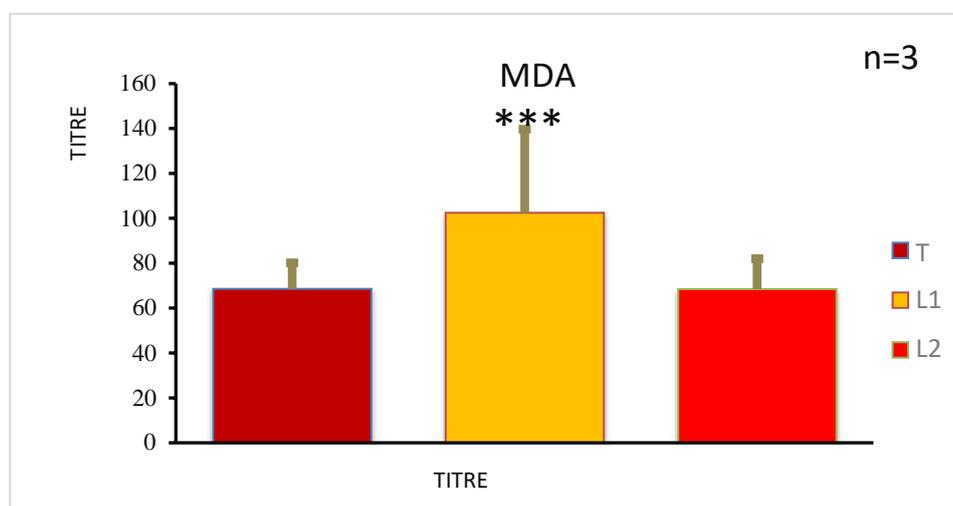


Figure 34 : La variation de taux de MDA chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

Effet sur le taux de GSH

Cette **figure (35)** représente la variation de taux de GSH chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins. Dans notre travaille nous observons une diminution non significative ($p > 0.05$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (2,5 ml/kg/jour) aussi une diminution significative ($p < 0.05$) chez le lot traité par TiO₂ NPs à dose (1,25 ml/kg/jour).

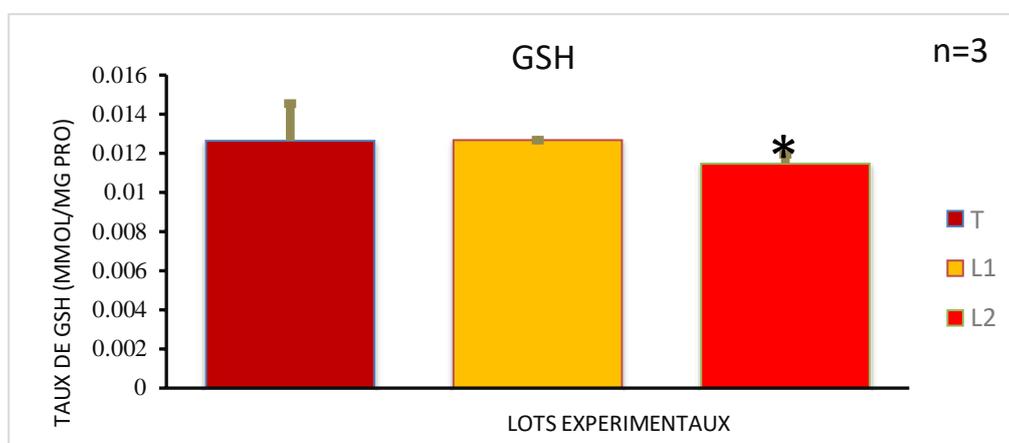


Figure 35 : la variation de taux de GSH chez les rats traités par TiO₂ NPs par rapport les témoins

Discussion

3. DISCUSSION

Les particules de dioxyde de titane ont été largement utilisées dans le domaine de l'industrie et de la médecine. Cependant, des doutes subsistent quant à la sécurité des doses d'exposition au TiO₂-NPs.

Dans cette étude, nous avons étudié la toxicité potentielle des NPS_TiO₂ au niveau rénal en utilisant des rats Wister comme modèles anatomiques en appliquant deux doses différentes. Dans un premier temps, nous expliquerons la raison de travailler avec des doses de différentes concentrations de TiO₂-NPs, selon le principe toxicologique de la relation dose-effet. Enfin, nous discuterons des résultats de l'effet des particules de titane sur la croissance globale (poids corporel, poids relatif des reins) et son effet sur le niveau de biomolécules (traitements protéiques, glucidiques, lipidiques et anticorps) Stress oxydatif (MDA, GPx, CAT, GSH, GST) en plus des paramètres biochimiques (Urée, Créatinine)

3.1. Effet du TiO₂ NPs sur Gain de poids et le Poids relatif du rein et les Gain de poids

Dans notre travail, nous remarquons une diminution significative du poids corporel dans le groupe traité avec des particules de dioxyde de titane par rapport au groupe témoin. Alors qu'une diminution non significative a été enregistrée dans le groupe qui a été traité avec de l'oxyde de titane à une dose (2,5 ml/kg/jour) par rapport aux témoins Et pour les reins, le poids relatif a atteint une augmentation significative, et cela est dû à l'accumulation de dioxyde de TiO₂-NPs dans les reins après exposition aux doses précédentes, et nos résultats étaient cohérents avec ceux de **Jia et al. (2017)**.

3.2. Effets de TiO₂ NPs sur les paramètres non enzymatiques et enzymatiques chez les rats

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression des oxydants par différents mécanismes de défense, enzymatiques et non enzymatiques (**Mithilish et al., 2010**)

Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

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.

Nos résultats ont montré que 90 jours d'exposition à de TiO₂-NPs ont augmentés très hautement significative de teneur de (MDA) dans les reins, ce résultat s'accorde avec l'étude de (**Hadis et al., 2015**) qui ont travaillé sur Le stress oxydatif des TiO₂ NPs sur le système rénal du rat. Nous pouvons estimer que ces TiO₂-NPs ont un effet sur la formation de l'MDA et que l'action anti-oxydante de *Punica granatum*L,

Glutathion peroxydase GPx

La glutathion peroxydase ou GPx est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H₂O₂. Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H₂O₂ que cette dernière. La GPx est donc essentielle à la décomposition du H₂O₂ produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. Les GPx sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosoliques le cas de la première GPx identifiée (**Mills., 1957**), soit extracellulaires. Les GPxs permettent la décomposition de H₂O₂ par l'oxydation de son co-substrat le GSH en GSSG qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (**Mills., 1957**).

Selon l'étude (**d'Abdou et al., 2018**) qui ont étudié Effet dépendant de TiO₂-NPs dans les reins des rats Wistar, ils ont trouvé. Une diminution d'activité de GPx après exposition à des doses de TiO₂-NPs ce qui est similaire à nos résultats qui est une diminution hautement significative de taux de l'enzyme GPx par rapport aux témoins.

Effet sur le taux de GSH

Le glutathion, un tripeptide (acide glutamique, cystéine, glycine), est l'un des antioxydants non enzymatiques les plus importants, dont certains sont synthétisés dans l'organisme. Il se trouve principalement dans le foie et est transporté dans les tissus par le sang. Le glutathion est le rajeunissant ultime des formes de radicaux libres des vitamines E et C, et un cofacteur des enzymes GPx pour éliminer le H₂O₂ et réduire les protéines oxydées. (**Powers et Jackson., (2008)**).

Nos résultats ont montré que 90 jours d'exposition à de TiO₂-NPs ont diminution significative de teneur de (GSH) dans les reins, ce résultat s'accorde avec l'étude de (**Zhao et al., 2010**) qui ont travaillé sur le stress oxydatif des TiO₂-NPs sur le système rénal du rat. Nous pouvons estimer que ces TiO₂-NPs ont un effet sur la formation de GSH et protéine dégradation, fragmentation de l'ADN, peroxydation des lipides et altération du système de défense antioxydant,

Effet sur Le glutathion S-transférase GST

La glutathion S-transférase est une enzyme jouant un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques et la protection contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules (**Hayes et Pulford., 1995**).

Dans notre travail nous observons qu'il y a une augmentation très hautement significative chez le lot traité par TiO₂-NPs par rapport au groupe témoin, mais par contre les résultats obtenus par (**El-Shaymaa El-Nahass et al., 2018**) étaient les contraires. Cette diminution de l'activité enzymatique de GST est due à cause des molécules des pesticides ou formation des complexes avec les protéines d'une manière générale et endommager les enzymes y compris ceux à l'activité antioxydant. (**Boumaza., 2017**)

Effet sur Catalase (CAT)

C'est une enzyme présente dans la majorité des organismes eucaryotes ou procaryotes partout dans les globules rouges (**Hertwig et al., 1992**). Une augmentation du niveau de H₂O₂ entraîne l'activation et la stimulation de la catalase, c'est-à-dire la fonction de CAT. La principale est la décomposition de H₂O₂ en H₂O et O₂. (**Pamplona et Costantini., 2011.**)

L'expérience de **Vijay K. Bharti et al., (2015)** a été menée dans laquelle ils ont exposé des rats à certaines concentrations de dioxyde de titane, ce qui a prouvé que l'exposition au TiO₂ peut entraîner une inhibition des activités de l'enzyme catalase et réduire sa capacité à lutter contre l'oxydation. Ce qui est similaire à nos résultats qui est une diminution significative de taux de l'enzyme CAT par rapport aux témoins.

3.3. Evaluation des paramètres biochimiques (l'urée ; La créatinine ; Bilirubine)

Le suivi des indices biochimiques constitue un marqueur utile pour l'évaluation des lésions des tissus rénaux.

Selon l'étude de **Morgan et al., (2017)** qui ont étudié la néphrotoxicité induite par les nanoparticules de dioxyde de titane chez les rats mâles, ils ont trouvé une augmentation de façon significative de la concentration d'urée et de bilirubine, ce qui est similaire à nos résultats qui est une augmentation hautement significative du taux d'urée et de la bilirubine, mais c'était le contraire pour le taux de créatinine que nous avons remarqué. Une augmentation significative du taux de créatinine chez les lots traités par TiO₂-NPs par rapport au groupe témoin. La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe de couleur rouge. (**Murray., 1984**) et

L'Uréase hydrolyse l'urée en ammoniacque (NH_4^+) et en dioxyde de carbone (CO_2). (**Kaplan., 1984**).

Conclusion

5. CONCLUSION

L'objectif de recherche de ce travail est d'explorer la toxicité induite par le dioxyde de titane au niveau rénal chez le rat Wister. Du travail que nous avons discuté, nous pouvons conclure ce qui suit :

Troubles de la croissance générale des souris Diminution du poids corporel pendant la période de traitement.

Augmentation du poids relatif et total des reins. Perturbations de certains processus métaboliques :

Niveaux élevés de protéines, graisses et lipides dans les reins des souris.

Une exposition continue au dioxyde de titane conduit à un état de stress oxydatif traduit par des perturbations de certains processus enzymatiques et non enzymatiques :

Faible teneur en GPx dans les reins.

Niveau CAT faible.

Augmentation de la teneur en MDA dans les reins de rat

Augmentation du taux de GST dans les reins.

-bas GSH.

Perturbations des paramètres biochimiques :

Diminution de la créatinine et Urée et élévation

Ainsi, nous avons prouvé que le dioxyde de titane avait des effets nocifs sur l'organisme, et c'est ce que nos résultats ont traduit.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

A. MANUEL., 2013 « Nanoparticules à base d'oxyde de titane pour la photocatalyse », UNIVERSITE PARIS-SUD, P27-28.

Alex M.J.R., 2013. Nanoparticules à base d'oxyde de titane pour la photocatalyse. Hal. Science, 2-158.

Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA 78

B

Bangert, M.W.J., Steven, K., 2004 Biochimie médicale : Physiopathologie et Diagnostic. 5^{ème} édition. Elsevier. pp. 70-94.

Belkheiri N.,2010. Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes .Thèse de 3^{ème} cycle. Université de Paul Sabatier. Toulouse, France, 244 p.

C

Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Biochem 58, 79-110.

Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002, Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, Biol. Chem., 383(6), p. 93

Cantú-Medellín, N., Olguín-Monroy., N.O., Méndez-Rodríguez., L.C., Zenteno-Savín, T., 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahia de La Paz, Mexico. Arch Environ Con Tox 56, 60-66.

Cell Biol 1, 39-42.

Clause., B. T. 1993. Le rat Wistar comme un bon choix : Établir des normes mammaliennes et l'idéal d'un mammifère standardisé. Journal of the History of Biology, 26(2), 329-349

D

D. H. Kim., H. S. Park, S.-J. Kim., et K. S. Lee., 2006 « Synthesis of Novel TiO₂ by Mechanical Alloying and Heat Treatment-derived Nanocomposite of TiO₂ and NiTiO₃ », Catal Lett, vol. 106, no 1-2, p. 29-33, janv.

Descat F., 2002. Hématologie Du Rat : Hémogramme et Myélogramme.

Drexler KE., 1992. Nanosystems: molecular machinery, manufacturing and computation. John Wiley and Sons, Inc., New York method for enhanced detection of colon cancer by capsule endoscopy. Nanoscale 5(20):9806–9811

E

E. fournier avec la collaboration de : M. Efthymiou., L. Fournier et G. Thomas., 1993. TOXICOLOGIE, page : 473. Edition marketing, Copyright, Paris

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, p. 341.

F

Favier A., 2003. Stress oxydatif : Intérêt conceptuel et expérimental pour la compréhension des mécanismes de la maladie et du potentiel thérapeutique. Chemical news 108-115

Feynman RP., 1960. There's plenty of room at the bottom. Eng Sci 23(5):22–36

Fusco D., Colloca G., Lo-Monaco MR., Cesari M., 2007. Effets de la supplémentation en antioxydants sur le processus de vieillissement. ClinInterv Aging 2(3):77-87pp.

Future M.I., 2011. The World Market for Nanoparticle Titanium Dioxide: Production, Revenues, Markets and Producer

G

Goudable, J., Favier, A., 1997. Radicaux libres d'oxygène et antioxydants. Clinical Nutrition and Metabolism. 11:115-120 pp. Halliwell B. (1999). Établir la signification et l'apport optimal d'antioxydant alimentaire : le concept de biomarqueur. Nutrition Reviews. 57: 104-113 p.

H

H.M. Frost., W.S.S. Jee., 1992. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses, Bone and Mineral, Volume 18, Issue 3, Pages 227-236,18(1): 277-263

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J., 2007. Stress oxydant, Département de biologie clinique, CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique Med Liège, 62 : 10 : 628-638

Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press.

Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Wiley-Liss, Hoboken, NJ, pp. 319–368.

Hertwig, B., Streb, P., Feierabend, J., 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. Plant Physiol 100, 1547-1553

Hong., Lan M., Peng X., Weidman S., Pei-N.W., 2007. Applied Surface Science

K

Kamila S., McEwan C., Costley D., Atchison J., Sheng Y., Hamilton GR., Fowley C., Callan JF., 2016 Diagnostic and therapeutic applications of quantum dots in nanomedicine. Top Curr Chem 370:203–224

M

M. Czajka., 2015.Toxicology in Vitro 29 1042–1052

M.A. Baraibar., R. Ladouce et B., Friguet.,2013: Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. J. Proteomics., 92 :63–70,

Manon.R., 2014. Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétique impact sur la santé humaine et l'environnement, Université du Havre

Marchall W.J. et Bangert S.K., 2004 Biochimie médicale : physiopathologie et diagnostic. 5^{ème} édition Française Elsevier. France. 59-87.

Mohammad Z., 2005. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de certaines plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de maîtrise - Université Abou BakrBelkiid Tlemcen. 24p.

Monaghan., B.R., Schmitt., F.O., 1932. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linoleic acid. J Biol Chem 96, 387-395.

P

Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301, 843-863

Pellet M.V., 1977. Le milieu intérieur : le rein. Physiologie humaine. 2^{ème} partie.

Powers, S.K., Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative.

R

Rahim Behnia., Adrian Martin., Esmail Koushanpour et Edward A. Brunner., 1982 Canadian Anaesthetists' Society Journal volume 29, pages581–586

RAO,G.N.,BOORMAN,G.A.- History of the Fisher Rat- In : BOORMAN, EUSTIS,ELWEL, MONTGOMERY Jr, Mac KENZIE-1990 Pathologie du rat Fisher : référence et atlas- Academic Press-Chap 2, 5-7

Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., Massaro, E.J., 1982. Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. Life Sci 31, 571-576

S

S. Begin-Colin., T. Girot., A. Mocellin., et G. Le Caër., 1999 « Kinetics of formation of nanocrystalline TiO₂ II by high energy ball-milling of anatase TiO₂ », Nanostructured Materials, vol. 12, no 1-4, p. 195-198,

Schreck, R., Baeuerle., P.A., 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. Trends

T

T. Nystrom.,2005: Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J., 24:1311–1317,

Taniguchi N.,1974. On the basic concept of “nano-technology”. In: Proc Intl Conf Prod Eng 26-29 August 1974, Tokyo, Part II. Japan Society of Precision Engineering, Tokyo, pp 18–23

Toshikazu Y., Yuji N.,2002. Journal de l’association médicale japonaise 45 (7), 271-276

V.

Valentin C., Nicolas M., Joel H., Sylvie B., Christophe L. T., Juliette T. 2015. Nanoparticules et radiothérapie Nanoparticules and radiation therapy. Bulletin du Cancer, 102(1), 83-91.

Z

Zhao., Jue Wang., Jingying Yan., Jie Ruan., Han Wang., Fashui Hong.,2010. Journal of Experimental Nanoscience 5 (5), 447-462, While the nephrotoxicity of high

Annex



Figure 26 : Vortex



Figure 27 : Microscope



Figure 28 : Bain marine



Figure 29 : Balance



Figure 30 : Bain marine



Figure 31 : Becher



Figure 32 : Becher



Figure 33 : Tube sec



Figure 34 : Becher



Figure 35 : Micropipettes

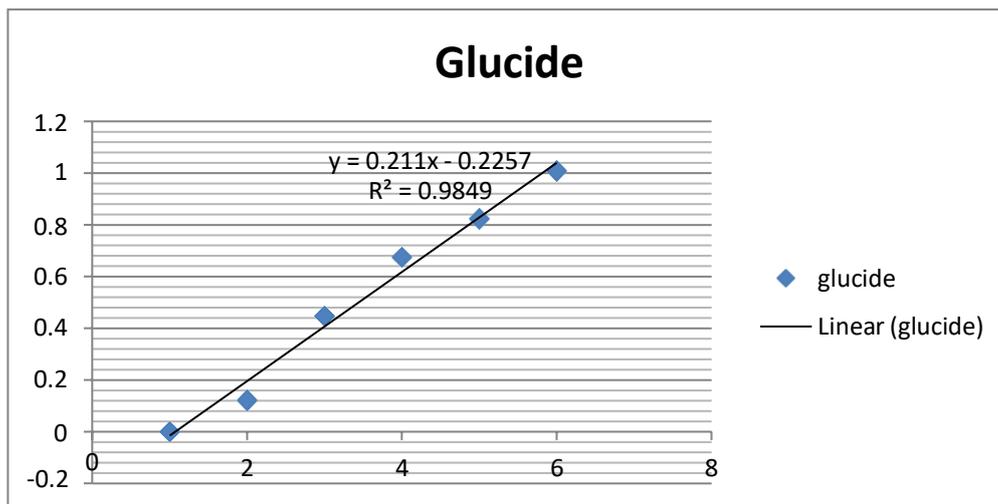


Figure 36 :

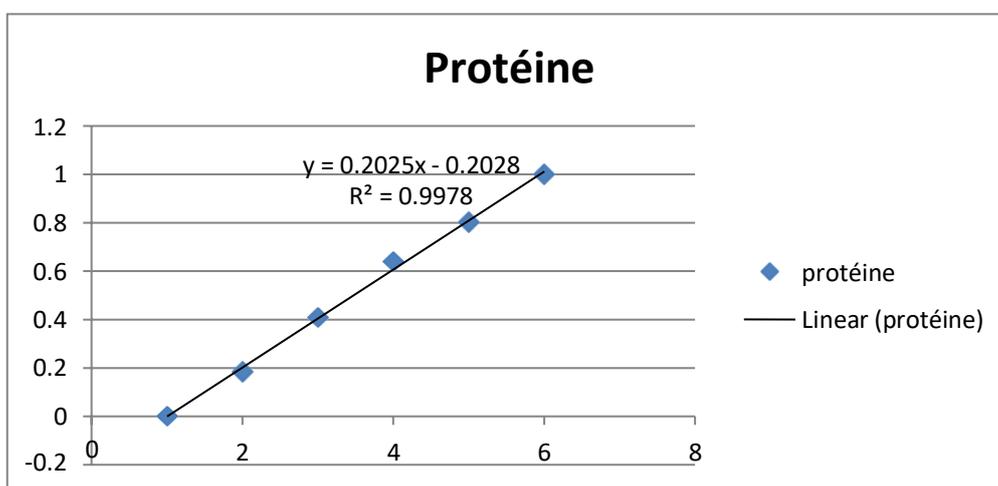


Figure 37 :

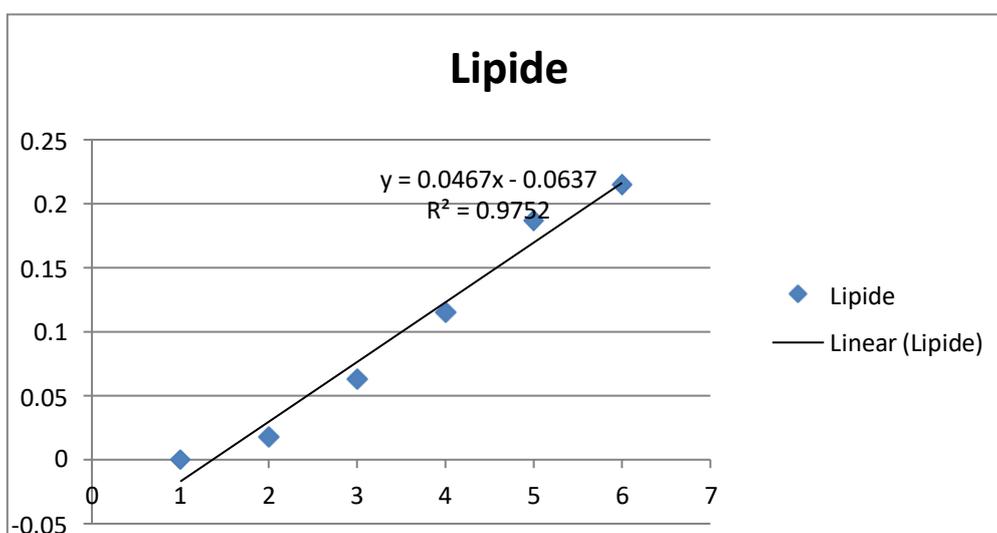


Figure 38 :

