

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de
l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologique
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire.

Thème:

Contribution à l'étude bibliographique sur la toxicité du dioxyde
de titane sur des organismes bio indicateurs de pollution :
« Les têtards de la grenouille verte »

Présenté par :

- Guergah Nesrine
- Tiouche Safa
- Ziaya Yamina

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme. Merabet Rym M.A.A Université 08 Mai 1945 -Guelma
Examinatrice : Mme. Ayed Hayette M.C.B Université 08 Mai 1945 Guelma
Encadreur : Mme. Benosmane Sana M.C.B Université 08 Mai 1945 -Guelma

Juillet 2021



Remerciement

Avant tout on remercie Allah de nous avoir donné le courage de parcourir ce trajet d'études.

Nous profitons de l'occasion pour remercier du fond de nos cœurs toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Mme Benosmane Sana notre encadrante pour son soutien et son aide et pour toutes les orientations et les remarques objectives, elle nous **institué** de faire ce choix de recherche et a été plus qu'un maître de stage.*

Avec un grand respect nous remercions la présidente du jury, Mme Merabet Rym, ainsi que Mme Ayed Hayat d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à Mme Ratiba, Technicienne de Laboratoire, pour sa gentillesse, elle qui nous a guidé et conseillé durant la période de stage pratique.

Merci à tout le personnel que nous avons contacté durant ce travail car nous avons trouvé l'accueil chaleureux, l'aide et l'assistance dont nous avions besoin.

Merci



Dédicace

Tout d'abord je tiens à remercier *Dieu* le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et la volonté.

Je dédie ce modeste travail :

A mon très *cher père* qui a toujours répondu présent dans les moments les plus difficiles, son soutien, son encouragement m'ont toujours donné la force de poursuivre mes études.

A ma très *chère maman*, qui m'a comblé de son soutien et m'a voué un amour inconditionnel. Vous êtes ce que j'ai de plus cher au monde et je vous jure qu'aucun mot, ni expression ne saurait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude.

A mes chères sœurs *Kouka, Samah, Marwa* et mon unique frère *Aymen* Pour L'amour Qu'ils me réservent
Je leurs souhaite une vie pleine du bonheur et de succès.

A mon cher neveu *Ahmed anas*

A mon soutien moral et source de joie et de bonheur, mon futur mari « *Hamza* » pour
l'encouragement et l'aide qu'il m'a toujours accordé.

A toutes les personnes de ma grande famille et ma belle
famille

A mes meilleures amies pour leur amour et leurs
encouragements

Safa



Dédicace

Je remercie **Dieu** de m'avoir aidé et illuminé ma voie vers le
savoir et l'éducation

Puis je dédie ce travail

A mon très **cher père**, soleil de ma vie, qui m'a guidé vers le bon
chemin par ses sacrifices, sa patience et ses encouragements, et
qui de meure pour moi le plus gentil des **Papas**, que Dieu le
protège.

A ma très **chère mère**: source d'espoir, de chaleur, d'affection,
d'amour, de courage, de force, qui m'a toujours poussé et
motivé dans mes études, qui m'a encouragé dans la vie et pour
m'avoir soutenue à toute épreuve, **Ma fleur Maman**. Que Dieu la
bénisse.

A ma cousine **Abir** pour ses encouragements, elle qui est plus
qu'une sœur

A mon encadreur **Benosmane Sana** qui m'a toujours aidé

A mes très chers cousins **Abdou, Taki** et **Raid**

A mes petites cousines princesses **Roukaya, Yasmine**

A mes chers oncles et adorables tantes

A mes chères amies pour leurs encouragements et leurs soutiens.

Merci pour tous les bons moments que nous avons passés
ensembles et que nous passerons encore.

A tous ceux qui m'aiment de près ou de loin.

Yamina



Dédicace

*Merci à Dieu tout puissant qui m'a donné la volonté et la
patience pour ce travail*

Avec joie et fierté je dédie ce mémoire

*À l'âme de ma chère grande mère qui m'a élevé et m'a tant aimé,
que dieu ait pitié d'elle*

*À mon Cher Père, l'épaule solide, la personne la plus digne de
mon estime aucun dédicace ne saurait exprimer mes sentiments
que dieu te procure santé et longue vie*

*À ma Chère Mère, l'œil attentif compréhensif, tu m'as donné la
vie; je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes
sacrifices dont tu m'as toujours entouré*

*À ma chère tante Radia, ma seconde mère, je vous remercie pour
tout l'amour que vous me portez depuis mon enfance*

À ma chère sœur Noursine et mon petit frère Zizou

*À mon Mari Hichem mon précieux, offre du dieu merci d'avoir
donné un sens à ma vie, merci pour tes encouragements qui ont
toujours été pour moi un grand réconfort*

*À ma belle-famille à ma seconde sœur Amira je vous remercie
pour votre Amour et votre soutien.*

À mon oncle et son épouse et mes chères et adorables tantes

À mes chers cousins et cousines

*À mes chères Amies pour leurs encouragements et leurs
soutiens.*

Nesrine

Sommaire

Sommaire

Remerciment

Dédicace

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale 1

Chapitre I Synthèse Bibliographique

I. Les amphibiens 4

1. Généralités 4

2. Les grenouilles vertes 4

2.1. Généralités 4

2.2. Cycle de vie de la grenouille verte 4

2.3. Classification de la grenouille verte 6

2.4. La respiration aux différents stades de la vie de la grenouille 7

2.5. La reproduction de la grenouille verte 7

3. Rappel sur les têtards 8

3.1. Définition 8

3.2. Morphologie 9

3.3. L'alimentation des têtards 9

4. L'intérêt de l'utilisation des têtards dans les études toxicologiques 9

II. Le Dioxyde de Titane 10

1. Origine du Dioxyde de Titane 10

2. Les propriétés du Dioxyde de Titane 11

2.1. Propriétés physique 11

2.2. Propriétés chimiques 12

2.3. Propriétés photocatalytiques	12
3. Les différentes formes du Dioxyde de Titane	12
3.1. La forme anatase	13
3.2. La forme rutile	13
3.3. La forme brookite	14
4. Les applications du Dioxyde de Titane	14
4.1. Pigments	14
4.2. Additif alimentaire colorant E171	15
4.3. Dans les cosmétiques et crèmes solaires	15
4.4. Applications antibactériennes	15
5. Mécanisme d'action du TiO_2	15
6. Impact de TiO_2	16
6.1. Sur la santé humaine	16
6.2. Sur des organismes du sol	16
7. Toxicocinétique	17
7.1. Absorption	17
7.1.1. Absorption broncho-pulmonaire	17
7.1.2. Absorption cutanée	17
7.1.3. Absorption gastro-intestinale	18
7.2. Distribution	18
7.3. Métabolisme	19
7.4. Elimination	19
Chapitre II Matériel Et Méthodes	
1. Objectifs du travail	21
2. Matériel biologique	21
3. Matériel chimique	21
3. Structure du TiO_2	22
4. Méthodes	22
4.1. Mode d'échantillonnage	22

<i>4.2. Traitement</i>	23
<i>5. Les Paramètres physiques et biométriques</i>	24
<i>5.1. Suivi du pH et de la température du milieu</i>	24
<i>5.2. Mesuration et pesée</i>	24
<i>5.3. Pourcentage de mortalité</i>	24
<i>5.4. Observation des malformations</i>	24
<i>5.5. Etude du métabolisme respiratoire</i>	25
<i>6. Les Paramètres biochimiques</i>	25
<i>6.1. Dosage des macromolécules</i>	25
<i>6.1.1. Dosage des protéines totale</i>	25
<i>6.1.2. Dosage des lipides</i>	25
<i>6.2. Dosage des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques</i>	28
<i>6.1.1. Mesure de l'activité Catalase (CAT)</i>	28
<i>6.1.2. Dosage du Glutathion réduit (GSH)</i>	29
<i>6.1.3. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST)</i>	30
<i>6.1.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)</i>	31
Chapitre III Discussion et Conclusion	
<i>Discussion</i>	34
<i>1. Evaluation de l'effet toxique du Dioxyde de Titane sur la croissance des têtards</i>	35
<i>2. L'effet de TiO₂ sur la respiration des têtards</i>	36
<i>3. L'effet du TiO₂ sur les biomarqueurs enzymatiques (CAT et GST) et non enzymatiques (GSH)</i>	38
<i>Conclusion générale</i>	40
<i>Perspectives</i>	41
<i>Références Bibliographiquee</i>	42

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Cycle de vie de la grenouille verte.	6
Figure 2	structures cristallines.	13
Figure 3	Têtards de la grenouille verte.	22
Figure 4	Poudre de TiO ₂ .	22
Figure 5	Formule chimique du Dioxyde de Titane.	23
Figure 6	région de Ain Safra Guelma.	24
Figure 7	Protocole d'extraction et de dosage des métabolites.	28
Figure 8	Conjugaison du glutathion (GSH) avec le 1-chloro, 2, 4-dinitrobenzène (CDNB).	31

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

BBC : Bleu brillant de coomassie.

BSA : l'Albumine de sérum de bœuf.

CAT : Catalase.

CDNB : 1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.

CL : concentration létale.

DTNB : Acide 5,5''Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

ERO : espèces réactives de l'oxygène.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion.

GST : Glutathion-S-transférases.

GSSH : Glutathion réduit.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HO : hydroxyle.

O₂: oxygène.

ROS : Espèces réactives oxygénées.

SOD : Superoxyde dismutase.

SSA : acide sulfo-salicylique.

TiO₂: Dioxyde de titane.

Ti⁴⁺: ion de titane.

TNB : Thionitrobenzoïque.

Tp : Tampon phosphate.

Tris: Tris-hydroxyméthyl-aminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3).

Résumé

Les nanotechnologies permettent des progrès remarquables dans de nombreux domaines, mais soulèvent aussi de nombreuses inquiétudes en particulier au sujet de leurs effets sur la santé humaine et sur l'environnement. Cette étude a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à la compréhension de la nature et de l'origine des effets biologiques de nanoparticules d'un oxyde métallique: le TiO_2 sur une espèce bio-indicatrice en écotoxicologie, les têtards de la grenouille verte qui est en contact direct avec l'environnement. le métabolisme et le stress oxydant ont été évalués par le suivi de la croissance, le taux des protéines et des lipides totaux et des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques. un changement et des perturbations dans le taux des macromolécules (protéines et lipides), ainsi que sur les systèmes antioxydants et biomarqueurs (CAT, GSH, GST et MDA) des têtards et des organismes similaires, ce qui indique clairement le déclenchement d'un stress oxydatif à fortes doses de NPs (TiO_2).

Mots clés : Nanoparticules, TiO_2 , toxicité, stress oxydatif, têtards, macromolécules biomarqueurs.

Abstract

Nanotechnology promises remarkable progress in many areas, but also raises many concerns, particularly about their effects on human health and the environment. This study aims to provide answers to the understanding of the nature and origin of the biological effects of nanoparticles of a metal oxide: TiO₂ on a bio-indicator species in ecotoxicology, the tadpoles of the frog, Green that is in direct contact with the environment. Metabolism and oxidative stress were assessed by monitoring growth; protein level is total lipids and enzymatic and non-enzymatic biomarkers. a change and disturbances in the level of macromolecules (proteins and lipids), as well as on the antioxidant and biomarker systems (CAT, GSH, GST and MDA) of tadpoles and similar organisms, which clearly indicates the triggering of oxidative stress at high doses of NPs (TiO₂).

Keywords : Nanoparticles, TiO₂, toxicity, oxidative stress, tadpoles, biomarker macromolecules.

ملخص

شهدت تقنية النانو تقدم ملحوظ في العديد من المجالات، ولكنها تثير أيضاً العديد من المخاوف، لا سيما فيما يتعلق بآثارها على صحة الإنسان والبيئة. تهدف هذه الدراسة إلى تقديم إجابات لفهم طبيعة وأصل التأثيرات البيولوجية للجسيمات النانوية لأوكسيد فلز TiO_2 : على أحد الأنواع ذات المؤشرات الحيوية في علم السموم البيئية، الضفادع الصغيرة للضفادع الخضراء على اتصال مباشر مع البيئة. تم تقييم الأيض والإجهاد التأكسدي من خلال مراقبة النمو، ومستوى البروتين هو الدهون الكلية والمؤشرات الحيوية الأنزيمية وغير الأنزيمية. على مستوى التمثيل الغذائي، هناك تغير واضطرابات في مستوى الجزيئات الكبيرة (البروتينات والدهون)، وكذلك على أنظمة مضادات الأوكسدة والعلامات الحيوية (GSH، CAT)، (MDA و GST) من الضفادع الصغيرة والكائنات المماثلة، والتي يشير بوضوح إلى إثارة الإجهاد التأكسدي عند الجرعات العالية من TiO_2 NPs.

الكلمات المفتاحية: الجسيمات النانوية، TiO_2 ، السمية، الإجهاد التأكسدي، الضفادع الصغيرة، الجزيئات الكبيرة للعلامات الحيوية.

Introduction Générale

Introduction générale

Le développement des nanotechnologies est en plein essor depuis une dizaine d'années. En effet, les nanomatériaux manufacturés présentent de nouvelles propriétés physico-chimiques qui permettent leur utilisation dans un grand nombre de produits.

Ainsi, les nanoparticules du TiO₂ présentent des propriétés photocatalytiques et d'absorption des UV élevées, ce qui justifie leur incorporation dans les textiles, les peintures, les ciments et verres auto-nettoyants mais aussi leur utilisation pour la remédiation des sols pollués.

L'épandage volontaire ou non des nanoparticules entraînent de ce fait leur déversement dans l'environnement et la contamination des écosystèmes (**Wiesner et al., 2006**). Les teneurs en nanoparticules de TiO₂ modélisées dans les différents compartiments sont amenées à augmenter avec l'utilisation et les rejets croissants des nanoparticules dans l'environnement que les perspectives de développement des nanotechnologies suggèrent. Malgré l'engouement suscité par les avancées technologiques que représente l'utilisation de ces nanoparticules; leur biodisponibilité supposée élevée suscite parallèlement une réelle prise de conscience en ce qui concerne le comportement, le devenir et la potentielle toxicité des nanomatériaux manufacturés et de leurs sous-produits d'altération.

Le développement croissant des équipements incorporant des nanomatériaux, la dispersion inévitable des nanoparticules dans l'environnement nécessite donc d'évaluer leur impact sur l'Homme et l'environnement. La toxicité des nanoparticules est d'ores et déjà largement étudiée sur les cellules humaines et de mammifères (**Gurr et al., 2005**).

La majorité des études écotoxicologiques sur les nanoparticules de TiO₂ est quant à elle réalisée pour l'essentiel sur des organismes aquatiques (**Lovern et al., 2006**)

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à une étude bibliographique; nous avons ainsi présenté le matériel biologique étude les têtards de la grenouille verte ; leurs caractéristiques, les différents stades de développement, le cycle de vie et le métabolisme; ainsi que le matériel chimique de la présente étude, en l'occurrence le Dioxyde de titane; ses caractéristiques, ses différentes utilisations, mécanisme d'action, et toxicité. A partir de ces données, nous avons pu mettre au point, une stratégie bien structurée pour mener nos série d'expérimentation et justifier par la même les objectifs et les méthodes utilisées.

Le second chapitre correspond à l'étude expérimentale avec une revue générale sur les différents essais à réaliser.

Ce travail est clôturé par une discussion et une conclusion générale.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

I. Les amphibiens

1. Généralités

Les amphibiens sont des Vertébrés Tétrapodes à peau nue (sans écailles) et humide. Ce sont des animaux poïkilothermes - leur température interne dépend de celle du milieu - présentent la majeure partie de l'hiver un stade de vie ralentie, se traduisant par une immobilité complète. Ils s'abritent sous la terre, sous une souche ou une pierre, voire au fond de l'eau dans la vase. **(Mamou, 2011)**.

2. Les grenouilles vertes

2.1. Généralités

Les grenouilles vertes sont généralement bruyantes, aquatiques et grégaires. Elles contrastent ainsi fortement avec les grenouilles brunes, plus silencieuses et souvent plus terrestres, et peuvent en être distinguées par leurs yeux plus rapprochés sur dessus de la tête, l'absence de masque temporal sombre sur les côtés de la tête et la présence chez les mâles de sacs vocaux externes latéraux. Leur coloration est très variable et les femelles adultes sont plus grandes que les mâles. **(Nicholas, 2002)**

Les Grenouilles vertes sont de tailles et de couleurs très variables qui peuvent aller du vert clair au marron. Ce sont des espèces très ubiquistes qui peuvent être retrouvées potentiellement dans tous les habitats aquatiques. [1]

2.2. Cycle de vie de la grenouille verte

La grenouille verte pond ses œufs au printemps dans des nappes d'eau dormantes (marre, bords d'étangs) regroupés en amas à aspect gélatineux immergés sur le fond à faible profondeur ou accrochés aux plantes aquatiques. Comme d'autres Amphibiens, le cycle de vie de la grenouille verte commence dans l'eau avec un œuf pour donner une larve sans membres munie de branchies, que l'on appelle têtard. Après une période de croissance, durant laquelle le têtard développe des membres et des poumons, il se métamorphose et son aspect général et l'arrangement de ses organes internes sont modifiés. Il peut quitter l'eau sous la forme d'une grenouille miniature. **(Benosmane, 2015)**

Ce cycle peut également être divisé en deux principaux stades différents:

a) Stade larvaire

Les larves, appelées têtards, éclosent après environ deux semaines. Les larves sont plus claires chez les grenouilles vertes. Les têtards ont des branchies externes et des organes de fixation dans la région buccale. Une bouche se développe peu à peu avec des « dents » cornées servant de râpe, adaptées à un régime alimentaire végétarien. Le long tube intestinal est enroulé et bien visible. Les larves se déplacent avec agilité grâce à leur puissante queue. Les pattes postérieures apparaissent d'abord puis les pattes antérieures. La bouche caractéristique de la grenouille se développe en même temps que les pattes avant. Ces changements externes s'accompagnent d'une métamorphose interne. Pendant l'ultime phase de cette transformation, l'animal ne prend pas de nourriture mais il absorbe les réserves de graisse de sa queue en cours de résorption. L'animal passe d'une respiration branchiale à une respiration pulmonaire et avec la formation de l'estomac, il adopte une nourriture exclusivement animale. [2]

b) Stade adulte

À la fin du stade têtard, la grenouille se métamorphose et son corps se transforme rapidement en celui d'un adulte. Cette métamorphose dure entre 2 à 8 semaines selon les conditions externes, et est initiée par la production d'une hormone, la thyroxine. Cela conduit différents tissus à se développer de différentes façons. Les principaux changements sont le développement de poumons et la disparition des branchies et des poches branchiales, laissant les pattes avant visibles. La mâchoire inférieure devient la grande mandibule de l'adulte carnivore, et le long intestin spiralé du têtard herbivore est remplacé par un intestin court typique d'un prédateur. Le système nerveux devient bien adapté à l'audition et la vision stéréoscopique, et pour de nouvelles méthodes de locomotion et d'alimentation. Les yeux sont repositionnés plus haut sur la tête et les paupières et glandes associées apparaissent. Le tympan, l'oreille moyenne et l'oreille interne se développent. La peau devient plus épaisse et plus dure, la ligne latérale disparaît et les glandes de la peau apparaissent. La dernière étape est la disparition de la queue, mais elle a lieu plus tard, le tissu étant utilisé pour accélérer la croissance des membres. (Benosmane, 2015)

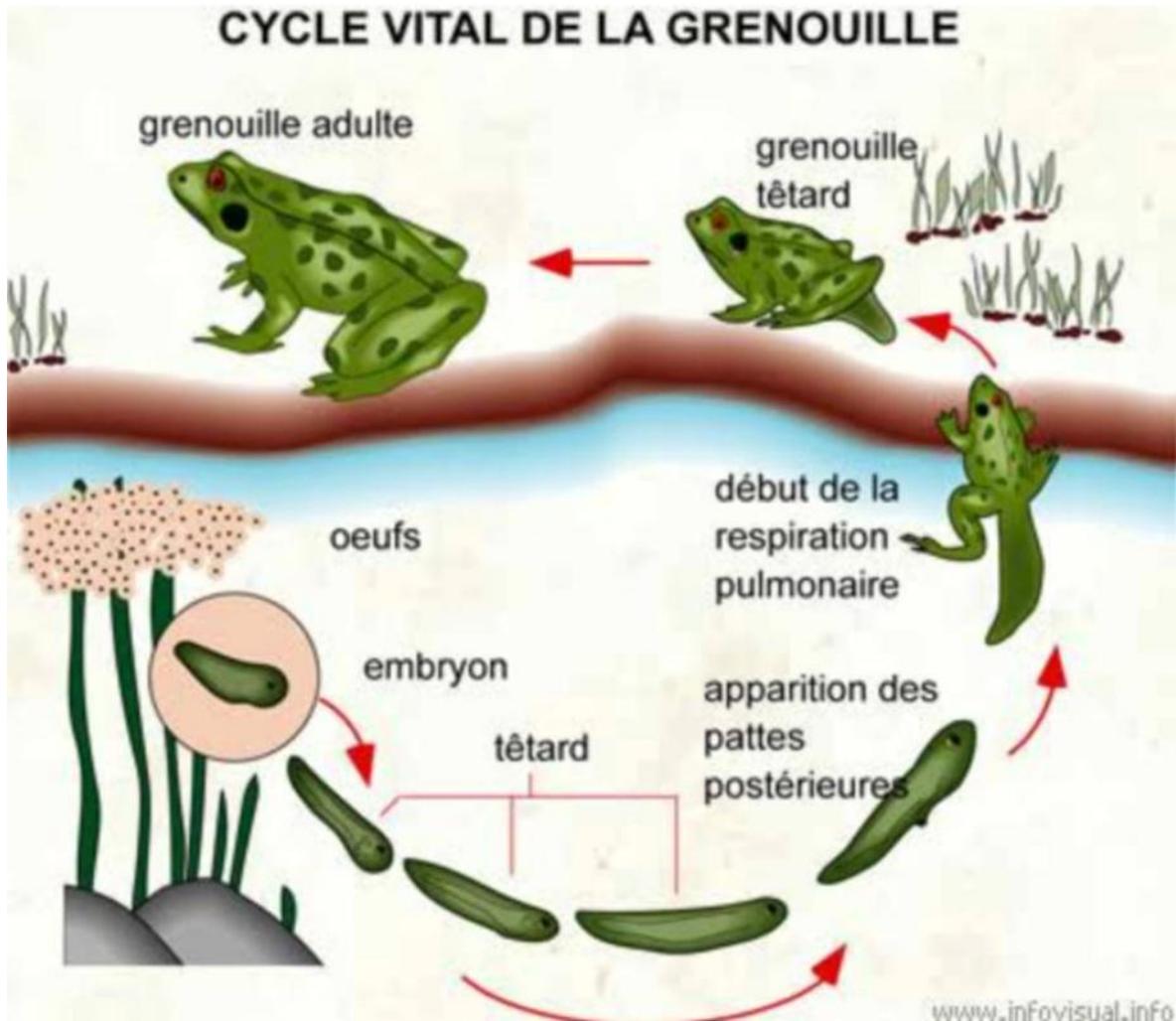


Figure 1 : Cycle de vie de la grenouille verte. [3]

2.3. Classification de la grenouille verte

Le terme «grenouille» est un nom vernaculaire donné à certains amphibiens, principalement ceux du genre *Rana*. Grenouille vient du vieux français «reinoille» venant lui-même du latin *ranunculus*, signifiant petite grenouille.

Règne: Animal.

Embranchement (Phylum): Cordés (Vertébrés).

Classe: Amphibiens.

Ordre: Anoures.

Famille: Ranidés

Genre: Rana

(Thurre, 2009)

2.4. La respiration aux différents stades de la vie de la grenouille

Dans la classe des Amphibiens, chaque individu au cours de son développement passe du milieu aquatique au milieu aérien. Le têtard vit dans l'eau ; la grenouille verte vit dans l'eau mais aussi à l'air libre.

A l'éclosion, le têtard présente des branchies externes. Rapidement, un repli de peau recouvre ces branchies. La chambre branchiale n'est plus visible que par son ouverture sur le côté gauche.

A un mois, le têtard doit aller respirer à la surface. La régression des branchies est compensée par le développement progressif des poumons. [4]

2.5. La reproduction de la grenouille verte

- L'accouplement et la ponte

a) La formation des couples

Les grenouilles vertes hibernent dans la vase au fond de l'eau. Les couples se forment, chez les adultes ayant atteint la maturité sexuelle (adultes âgés de 3 ou 4 ans), en mai ou juin. La date est fonction de la température. Les mâles sont plus petits (ils peuvent atteindre 7,5 cm) que les femelles (elles mesurent jusqu'à 13 cm). [5]

Les mâles se rassemblent en premier sur les lieux de ponte et commencent à coasser. Ils peuvent effectuer cette opération dès l'âge de 18 mois. Le son est amplifié par 2 sacs vocaux qui se dilatent et sortent comiquement de chaque côté de la tête par une fente. Les mâles peuvent aisément se distinguer des femelles grâce à la présence de ces fentes et de leurs sacs vocaux, ces organes étant absents chez les femelles. Ces sacs, une fois gonflés, atteignent le volume d'une noisette. Le chant dur 2 à 3 secondes après quoi les sacs se vident rapidement. Quand de nombreux mâles occupent le même étang, le vacarme continue nuit et jour, presque sans interruption, pendant 5 ou 6 jours, au grand préjudice des habitants du voisinage. La voix des mâles guide quelques-unes des femelles vers les lieux, tandis que d'autres (probablement celles qui ne sont pas encore prêtes à pondre) restent éloignées. On

trouve ainsi, dans le même étang, plusieurs mâles pour une même femelle. La rivalité des mâles est néanmoins faible. [5]

b) L'accouplement

L'accouplement a lieu en pleine eau (8 à 15 cm de profondeur). Le mâle serre la femelle sous les aisselles avec ses « mains » dont le « pouce » est muni, sur sa face interne, d'une callosité cornée. En fait le « pouce » est atrophié, la patte antérieure ne comporte que 4 doigts et c'est le doigt II qui porte la callosité. Avec leur intelligence limitée, les mâles sont incapables de reconnaître un mâle d'une femelle sans se référer au coassement. Il arrive parfois qu'un mâle grimpe sur le dos d'un autre mâle silencieux. Ce dernier se met immédiatement à grogner et cherche à se dégager. Le mâle dans l'erreur, averti de sa méprise par le grognement, lâche alors immédiatement prise. [5]

c) La ponte et la fécondation

Après une longue attente, une femelle âgée d'au moins 4 ans, pond ses ovules (œufs non fécondés) qui sont arrosés immédiatement par la semence du mâle. La fécondation se produit dans l'eau et non pas dans le corps de la femelle, on dit qu'elle est externe.

Dans les conditions normales, la ponte s'effectue sur 1 à 2 jours en plusieurs émissions chacune dépassant rarement 300 « œufs ». Le nombre total d' « œufs » (en fait d'ovules) pondus par la femelle de *Rana esculenta* au cours d'une saison peut atteindre 5000 à 10 000. Les œufs fécondés flottent d'abord, accrochés aux herbes, à quelques centimètres de la surface, puis coulent au fond. Ils sont abandonnés par les parents. [5]

3. Rappel sur les têtards

3.1. Définition

Le têtard est la larve aquatique des amphibiens, stade intermédiaire entre le stade embryonnaire et le stade sub adulte. Sont la première étape de la croissance des grenouilles. Comme pour de nombreux autres amphibiens, ils peuvent rester dans l'eau pendant trois mois, en respirant par l'intermédiaire de branchies dont ils sont dotés depuis la naissance. Il est normal que le têtard se colle sans bouger à un objet de l'aquarium pendant les premiers jours. [6]

3.2. Morphologie

Le têtard se caractérise par une grosse tête qui se confond avec son corps (d'où son nom) et une queue natatoire. Le têtard s'apparente ainsi à un poisson, à part qu'il ne possède qu'une nageoire caudale.

Les membres postérieurs apparaissent à la base de la queue puis les pattes antérieures. C'est le début de la métamorphose. Les branchies sont ensuite remplacées par des poumons, la queue rétrécit, les yeux grossissent. Toutes ces transformations sont sous l'influence d'hormones dont la production dépend elle-même des conditions du milieu (température, alimentation). C'est pourquoi cette phase est plus ou moins longue. **(Chauprade, 2003)**

3.3. L'alimentation des têtards

Les têtards n'ont pas tous la même alimentation : ils sont essentiellement microphages et, chez plusieurs espèces, ils peuvent même extraire des particules en suspension ayant 0,1 micron de diamètre. Beaucoup de larves se nourrissent de bactéries et de microorganismes appartenant au zooplancton (infusoires) ou phytoplancton (algues unicellulaires). Chez d'autres, les particules sont collectées à la surface de l'eau au moyen d'une espèce d'entonnoir buccal dirigé vers le haut. Certaines autres sont végétariennes ou détritivores. Leurs dents dépècent les végétaux et raclent les encroûtements ; il en résulte une mise en suspension de particules très fines qui sont avalées par les têtards. Enfin, chez quelques espèces, elles sont plus souvent macrophages et carnivores, elles se nourrissent de crustacés ou de larves de moustiques. Elles capturent leurs proies par un mécanisme de succion très efficace, puis les déchiquètent avec leurs mâchoires hypertrophiées qu'animent des muscles masticateurs bien développés. [7]

4. L'intérêt de l'utilisation des têtards dans les études toxicologiques

Notre choix est porté sur les têtards, une larve d'amphibien pour de multiples raisons:

-Les têtards de grenouille présentent des caractéristiques intéressantes de bio-indicateurs, ils sont à la fois résistant et possèdent des paramètres sensibles aux perturbations du milieu **(Ricard, 1993)**.

-Leur stade de développement a une influence décisive sur la sensibilité des espèces. Plus le stade de développement est précoce, plus la nuisance du polluant ou la fragilité des têtards augmentent.

-Le rythme de la métamorphose des têtards est plus rapide avec une température favorable (des conditions favorables) (Angelier, 1968).

II. Le Dioxyde de Titane

Le TiO_2 a été découvert en 1791 en Angleterre, mais son exploitation commerciale en tant que composé pur n'a commencé qu'en 1913. (Armand, 2013)

C'est une poudre blanche lumineuse, obtenue à partir de 2 minerais de Titane, qui a le pouvoir de tout pigmenter. Par l'éclat, l'opacité et la durabilité que le TiO_2 apporte, ce pigment blanc constitue un ingrédient crucial lors de la fabrication des peintures (57% de la consommation globale), plastiques (21%), papiers (14%), gommes, céramiques et fibres synthétiques (ECN12 2000). Il est aussi incorporé comme agent de blanchiment dans des cosmétiques et des dentifrices.

Les particules de TiO_2 constituant les poudres pigmentaires sont de très petites tailles, de l'ordre de $25 \mu\text{m}$, ce qui leur confère un plus grand pouvoir couvrant. En effet, pour une plus efficace dispersion de la lumière, le diamètre du TiO_2 pigmentaire doit être plus petit que la moitié de la longueur d'onde de la lumière. Comme l'œil humain est sensible particulièrement à la lumière jaune - verte (de longueur d'onde de l'ordre de $55 \mu\text{m}$), la taille optimale théorique pour les particules de pigments TiO_2 se situe entre $2 \mu\text{m}$ et $3 \mu\text{m}$ de diamètre. En cosmétique, des particules particulièrement fines, de l'ordre de 15 à 50 nm, sont introduites dans les écrans solaires (Baillon, 2002).

1. Origine du Dioxyde de Titane

Le Titane est le neuvième élément dans la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium. Le Titane y est majoritairement retrouvé sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite (FeTiO_3), la pérovskite (CaTiO_3) ou bien la titanite (CaTiSiO). Le TiO_2 pur existe également dans la nature sous les formes décrites ci-après. Le titane peut être obtenu par un procédé d'extraction utilisant des chlorures. Cette technique optimisée par le chimiste français Henri Sainte-Claire Deville permet d'obtenir le tétrachlorure de titane (TiCl_4) qui peut ensuite être réduit via le « procédé Kroll » pour obtenir

du titane solide pur. Le TiO_2 peut également être extrait des différents minerais par des traitements à l'acide sulfurique produisant le sulfate de titanyle (TIOSO). Ce composé peut ensuite être hydrolysé et déshydraté pour donner du TiO_2 (Le Trequesser, 2014).

2. Les propriétés du Dioxyde de Titane

2.1. Propriétés physique

Le Dioxyde de Titane est une substance inorganique solide blanc réfringent, thermostable et cristalline, ininflammable et peu soluble dans les solutions usuelles, qui se trouve à l'état naturel sous plusieurs formes cristallines dont les plus fréquentes sont le rutil, la brookite et l'anatase. Les formes utilisées dans l'industrie sont les formes rutil et anatase. Le TiO_2 est commercialisé sous 2 formes de granulométries différentes :

TiO_2 fin ou forme pigmentaire, constitué de particules primaires dont le diamètre est généralement compris entre 0,1 et 0,4 μm avec une surface spécifique d'environ 5-15 m^2/g .

TiO_2 ultrafin ou forme nanométrique, composé de particules primaires de taille inférieure à 100 nm dont le diamètre est généralement compris entre 10 et 50 nm avec une surface spécifique variant de 10 à 300 m^2/g . (Eric et al., 2020).

Les principales propriétés physiques du dioxyde de titane sont les suivantes :

- masse molaire : 79,8658 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- température de fusion : 1 855 $^{\circ}\text{C}$;
- température d'ébullition : 2 500-3 000 $^{\circ}\text{C}$;
- dureté Mohs : anatase 5,5-6 ; rutil 6-7 ;
- permittivité diélectrique relative moyenne : anatase 45 ; rutil 127 ;
- indice de réfraction dans l'air : anatase 2,55 ; rutil 2,75;

Le Dioxyde de Titane a des surfaces hydrophiles. L'absorption d'humidité augmente avec la surface spécifique, mais est aussi fonction du type de traitement de surface des poudres à l'issue du procédé de synthèse. [8]

2.2. Propriétés chimiques

Le Dioxyde de Titane est non toxique et chimiquement stable : il ne réagit pratiquement pas avec d'autres matériaux à des températures modérées. Il ne réagit pas avec l'oxygène, le sulfure d'hydrogène, le dioxyde de soufre, le dioxyde de carbone et l'ammoniaque. Il n'est pas soluble dans l'eau, les acides organiques et les acides inorganiques faibles. [9]

Le TiO_2 non ultra- fin 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. [10]

2.3. Propriétés photocatalytiques

Ces dernières années, la photocatalyse à semi-conducteurs utilisant du TiO_2 a été appliquée pour résoudre des problèmes environnementaux tels que la détoxification de l'eau et de l'air. Le lithium, le magnésium et le zinc peuvent réduire le Dioxyde de Titane avec plus ou moins d'incandescence. En raison de leurs surface spécifique plus élevée, le Dioxyde de Titane présente 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, radical superoxyde) après exposition aux rayons ultraviolets et réactions avec l'eau ou l'oxygène. (Benketta, 2019)

3. Les différentes formes du Dioxyde de Titane

Le Dioxyde de Titane TiO_2 peut être trouvé dans la nature sous trois différentes formes cristallographiques qui sont dans l'ordre de leur découverte, l'anatase (1801), le rutile (1803) et la brookite (1825) . Ces trois polymorphes sont constitués d'une brique octaédrique qui se reproduit pour former la structure cristallographique. Chaque octaèdre est constitué d'un ion Ti^{4+} entouré de six ions O^{2-} (Bouhadoun, 2015).

Les motifs cristallins de ces structures sont présentés dans la figure. La forme rutile est beaucoup plus abondante que la forme anatase. Il est thermodynamiquement stable alors que l'anatase et la brookite sont métastables et tendent à se transformer en rutile à hautes températures. Au contraire, sous forme nanoparticulaire, l'anatase est thermodynamiquement plus stable (Dorier, 2016)

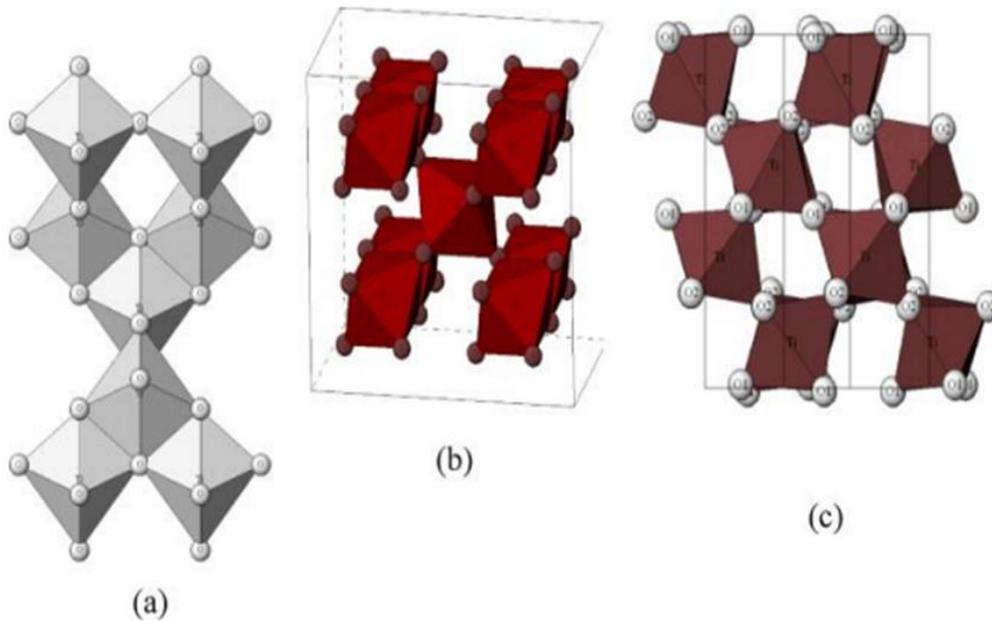


Figure 2: Les structures cristallines du TiO₂ anatase (a), rutile (b) et brookite (c).
(Bouhadoun, 2016)

3.1. La forme anatase

L'anatase est un minéral tétragonal. Elle a une densité théorique de 3,89. Son indice de réfraction est compris entre 2,55 et 2,75. Chauffée au-delà de 700 °C, elle se transforme en rutile. La structure cristalline de l'anatase est nettement plus complexe que celle du rutile. Les octaèdres y ont été « déformés ». L'anatase est principalement utilisée comme pigment et opacifiant pour toutes sortes d'applications (Bouraghdad et al., 2017).

3.2. La forme rutile

Le rutile est un minéral composé principalement de 90 à 95% de Dioxyde de Titane. Il fut découvert en 1803 par Wener en Espagne. Cette forme est plus stable que l'anatase et produite plus facilement à hautes températures. (Benkhetta, 2019)

Il a un réseau tétraédrique de cations, des octaèdres d'oxygène entourent les cations, la conductivité électrique peut être induite via des interactions cation-cation ou Ti³⁺- anion - Ti⁴⁺ (Dehdouh, 2009).

3.3. La forme brookite

La troisième forme cristalline métastable du TiO_2 est la brookite de la structure Orthorhombique avec une structure plus complexe, Bien que les distances soient similaires aux autres structures, elle se forme à des températures plus basses que celle du rutile, environ $800\text{ }^\circ\text{C}$, la brookite se transforme en rutile (**Laidi, 2020**).

4. Les applications du Dioxyde de Titane

Qu'il soit à l'échelle nanométrique ou micrométrique, le Dioxyde de Titane possède de nombreuses applications grâce à ses différentes propriétés. Ainsi, en sus de son utilisation comme pigment dans les peintures, le TiO_2 est également retrouvé dans les cosmétiques et les produits alimentaires (colorant E-171). De plus, l'absorption des rayonnements UV-A (320-400 nm) et UV-B (290-320) par les particules de rutile permet une utilisation dans les crèmes solaires à haut indice de protection pour une meilleure filtration des rayonnements nuisibles de par son haut indice de réfraction. (**Bouhadoun, 2015**)

Le TiO_2 est appliqué dans plusieurs secteurs industriels, revêtements pour la protection contre la corrosion, en photovoltaïque avec le développement d'une nouvelle génération de pile solaire sensibilisée dite de type Grätzel et en matériaux photochromiques, en plus on assiste à un engouement pour l'utilisation dans d'autres domaines émergents notamment la photocatalyse, avec des approches innovantes et originales (**Mahmoudi, 2014**).

4.1. Pigments

A l'état micrométrique, le TiO_2 est principalement utilisé en tant que pigment car il propose un blanc éclatant et une forte résistance à la décoloration. On estime que 70 % du TiO_2 produit est utilisé en tant que pigment pour les peintures, les plastiques, les papiers et les produits cosmétiques. Le reste de la production regroupe les applications antimicrobiennes, catalytiques ou encore médicales. L'émergence des nanotechnologies a récemment permis une production importante de TiO_2 nanométrique ouvrant la voie à des nouvelles applications. Les NPs de TiO_2 restent d'apparence blanche et constituent également des pigments de choix notamment pour des peintures nacrées (**Le Trequesser, 2014**).

4.2. Additif alimentaire colorant E171

Le TiO_2 est autorisé comme additif alimentaire. Il ne doit pas excéder 1 % de la masse totale du produit, Le colorant alimentaire E171 est une poudre de particules de TiO_2 utilisée pour ses propriétés opacifiantes et sa couleur blanche. Les particules sont majoritairement micrométriques mais plusieurs études ont montré qu'une part, non négligeable des particules sont nanométriques (<100 nm) (**Dorier,2018**).

4.3. Dans les cosmétiques et crèmes solaires

Le TiO_2 est aussi largement utilisé comme principe actif dans les crèmes solaires. En effet, il peut bloquer les rayons UV du spectre solaire grâce à son gap énergétique à forte absorption de la lumière ultra-violette. La dimension nanométrique rend par ailleurs les crèmes plus transparentes, moins visqueuses et plus adhérentes à la peau.

(**Labille, 2010**).

4.4. Applications antibactériennes

Le Dioxyde de Titane est fortement utilisé depuis plusieurs années comme un agent désinfectant, neutralisant un bon nombre de bactéries, virus et autres spores. Sous une illumination adéquate, le TiO_2 est capable de générer des espèces réactives, induisant un stress oxydant. Ce stress conduit à la lyse (La membrane cellulaire est percée et provoque un apport massif d'eau dans la cellule) de la membrane cellulaire et mène à la nécrose ou l'apoptose de la bactérie ciblée (processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal) (**Messai, 2018**).

5. Mécanisme d'action du TiO_2

Le TiO_2 endommage l'ADN, désorganise les fonctions cellulaires, interfère avec les activités de défense des cellules immunitaires et, en absorbant des fragments bactériens et en les faisant passer à travers le tractus gastro-intestinal, peut provoquer une inflammation. (**Boumaaza et al., 2013**).

6. Impact de TiO₂

6.1. Sur la santé humaine

La présence croissante de nanoparticules (NPs) dans les produits de la vie quotidienne (alimentation, médicaments, cosmétiques, textiles...) soulève de sérieuses inquiétudes quant à leurs potentiels effets nocifs pour la santé humaine. Les NPs de Dioxyde de Titane (TiO₂) sont produites à l'échelle industrielle et peuvent déjà être trouvées dans plusieurs produits commerciaux tels que les peintures, les cosmétiques ou dans les systèmes de décontamination de l'eau ou de l'air. Dans le passé, les NPs de TiO₂ étaient considérées comme inertes, mais, très récemment, l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer les a classées comme possiblement cancérogènes (groupe 2B) pour l'homme. De nombreuses études in vitro et in vivo ont démontré la potentielle neuro-toxicité des NPs de TiO₂, mais très peu d'études se sont concentrées plus spécifiquement sur la barrière hémato-encéphalique (BHE), protégeant le cerveau. Aujourd'hui, en dépit des avancées constatées, la bio-cinétique et la bio-accumulation des NPs de TiO₂ ainsi que les conséquences sur la physiologie de la barrière hémato-encéphalique (BHE) in vivo restent très peu documentées. De plus, dans l'évaluation du risque lié à l'exposition aux NPs, des facteurs de risque tel que l'âge ont jusqu'ici été quasiment ignorés (Clémence, 2016).

6.2. Sur des organismes du sol

Les effets toxiques du TiO₂ nanométrique ont également été évalués sur des organismes du sol. Dans un premier cas sur des arthropodes aucun effet délétère, tels que la mortalité, la modification du poids corporel ou la réduction d'alimentation, n'ont été observés. Au contraire, un taux d'alimentation accru, une efficacité d'absorption des aliments et une augmentation de l'activité catalase ont été observés. Dans une autre étude, le TiO₂ nanométrique semble être plus toxique pour les nématodes. Les particules de rutile peuvent être bio-accumulées dans les vers de terre, où ils induisent un stress oxydatif, inhibent l'activité de la cellulase et provoquent des lésions de l'ADN et des mitochondries.

Dans l'ensemble, l'exposition globale du TiO₂ nanométrique n'est pas connue, il demeure encore de nombreuses interrogations, et il est donc difficile de faire une évaluation quantitative et fiable du risque.

L'un des principaux constats est qu'en raison de la polyvalence du TiO₂ en termes de taille, de forme, de traitement de surface, de structure cristalline, de sa dispersion dans un cadre biologique, aucune conclusion fiable ne semble pouvoir être tirée, puisque les différentes formes de TiO₂ peuvent agir très différemment (**Rossano, 2014**).

7. Toxicocinétique

Les données disponibles sont essentiellement issues des études expérimentales. Toutefois, il est à noter que plusieurs études épidémiologiques récentes menées avec différentes nanoparticules, notamment celles de magnétite, rapportent la présence de ces particules dans différentes régions du cerveau.[11]

7.1. Absorption

L'absorption des nano particules de TiO₂ pour les différentes voies d'exposition (respiratoire, digestive et cutanée) est dépendante de leurs compositions et de leurs potentiels à former des agglomérats. Dans tous les cas, il semble qu'elle reste limitée au niveau de l'intestin pour différentes tailles de NanoTiO₂ et de la peau .Par ailleurs, plusieurs études ont identifié une voie de pénétration spécifique aux nanoparticules par instillation intranasale.[11]

7.1.1. 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 .[10]

7.1.2. 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.

Le TiO₂ se présentait sous la forme de nanoparticules non enrobées (30-50 nm, 85 % anatase- 15 % rutile, surface spécifique 51 m²/g) , de nanoparticules enrobées (copolymère d'hydroxyde d'aluminium et de diméthicone, diamètre 20-30 nm, longueur 50-150 nm, rutile) et de particules microniques non enrobées (300-500 nm) .

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, qu'au niveau des aires inguinales, dans le cas des expositions aux nanoparticules non enrobées et aux particules microniques ; 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. [10]

7.1.3. 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. (Jargot et al., 2013).

7.2. Distribution

Après l'absorption initiale des NPs de TiO₂, le système de circulation peut distribuer les particules à tous les organes et tissus dans le corps. Après que les NPs de TiO₂ atteignent la circulation systémique, ces particules interagissent potentiellement avec le plasma, les protéines, facteurs de coagulation, plaquettes et globules rouges ou blancs. La liaison aux composants du plasma peut avoir un effet substantiel sur la distribution, métabolisme et excrétion des NPs, et pourrait neutraliser ou masquer les effets indésirables des NPs de TiO₂ dans la circulation systémique. La plupart des NPs s'accumulent dans le foie. Des NPs de TiO₂ ont été trouvés dans le cerveau après administration intra nasale. (Shi et al., 2013).

7.3. Métabolisme

Il n'existe pas d'informations disponibles concernant le métabolisme de ces particules. [10]

7.4. Elimination

Après administration intraveineuse, les nanoparticules sont majoritairement excrétées via les urines. [10]

Liquidation des particules du foie via la bile dans les fèces est bien connue en pharmacie et est également postulé pour les NPs de TiO₂ (**Shi et al., 2013**).

Chapitre II

Matériel

Et

Méthodes

1. Objectifs du travail

L'objectif de notre travail est d'évaluer la toxicité du Dioxyde de Titane, produit utilisé généralement comme additif alimentaire, également dans des applications antibactériennes et dans des produits cosmétiques, sur des organismes bio-indicateurs de pollution : les têtards de la grenouille verte.

2. Matériel biologique

Nous avons choisi les têtards de la grenouille verte comme un modèle biologique, qui sont des organismes bio-indicateurs de pollution utilisés dans les études toxicologiques.



Figure 3: les Têtards de la grenouille verte.

3. Matériel chimique

Le Dioxyde de Titane utilisé dans notre travail de recherche est sous la forme Rutile, une poudre blanche pigmentée.

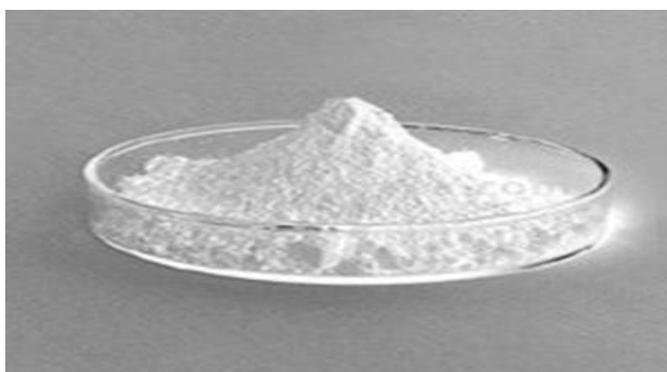


Figure 4: la Poudre de TiO_2 .

3. Structure du TiO₂

Nom : Dioxyde de Titane

Formule chimique : TiO₂ (Olivier, 2014)

Apparence : Solide blanc (Olivier, 2014)

Nom alimentaire : E 171



Figure 5 : La Formule chimique du Dioxyde de Titane. [12]

4. Méthodes

4.1. Mode d'échantillonnage

Nous avons accompli d'abord notre échantillonnage (des têtards de la grenouille verte d'Afrique du Nord) durant la période d'activité des grenouilles, en début du mois de février. Les échantillons proviennent d'un plan d'eau dans la région de Ain Safra Guelma qui est considérée comme un endroit moins pollué.



Figure 6 : la région de Ain Safra Guelma.

4.2. Traitement

Sélectionné un type de toxicité qui nous permet d'avoir un résultat biologique en un temps assez court. De plus, la recherche sur la toxicité sublétales est nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux puisque ce sont ces effets qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution environnementale.

A partir de la recherche bibliographique sur différentes études réalisées auparavant sur l'évaluation de la toxicité du Dioxyde de titane sur des organismes dulcicoles, aquatiques et microorganismes; ainsi que selon la CL50 des tests de toxicité sublétales du TiO_2 chez les microorganismes suivants : *E.Coli*. CL50= 585 mg/L /30min (**Dasari et al., 2013**), *Daphnia magna* CL50 > 100mg/L (**Fiche de donnée de sécurité du TiO_2 conformément au Règlement (CE) n°1907/2006**) et chez les poissons la CL50 = 165mg/L (**Gatoo et al., 2014**); également des études réalisées sur les paramécies et la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec les concentrations de 90 mg/l , 100 mg/l , 110 mg/l , 120mg/l; nous avons pu mettre une échelle de concentrations de notre produit le Dioxyde de Titane et ce entre 100 et 200 mg/l.

Effectué plusieurs essais en choisissant à chaque fois 4 concentrations (C1, C2, C3 et C4) correspondant respectivement à (90, 100, 110 et 120 mg/l) en premier, en second essai (130, 140, 150 et 160 mg/l) avec un échantillon témoin (T) et un témoin acétone à 2%.

Les études sont faites sur des têtards aux premiers stades du développement larvaire et prennent fin avec les stades de pré-métamorphoses. Ce qui implique une durée limitée à 4 semaines. Le nombre de répétition est égal à 3 et chaque boîte contient 6 têtards.

5. Les Paramètres physiques et biométriques

Opté des têtards ayant la même taille et le même poids ainsi que des conditions de milieu bien contrôlées.

5.1. Suivi du pH et de la température du milieu

La mesure du pH et de la température de nos échantillons est effectuée à l'aide d'un pH mètre et d'une sonde thermique.

5.2. Mesuration et pesée

La croissance des têtards est suivie par la mesure de leur taille et de leur poids. A partir de ce paramètre nous avons évalué l'effet du toxique sur la croissance et le développement des têtards.

Les têtards sont pesés chaque semaine à l'aide d'une balance de précision (type Sartorius TE 124S 1/10mg). Les changements de la taille sont mesurés dans les mêmes périodes en posant le têtard sur du papier filtre en l'allongeant à côté d'une règle, la longueur du têtard correspond à la distance entre les extrémités.

5.3. Pourcentage de mortalité

Le pourcentage de mortalité observée chez les têtards traités par le Dioxyde de Titane à différentes concentrations ainsi que chez les témoins est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de mortalité (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre de têtards morts après traitement}}{\text{Nombre total de têtards traités}} \right) \times 100.$$

5.4. Observation des malformations

Lors de l'exposition des têtards aux différentes concentrations du TiO_2 testé, nous suivons régulièrement les malformations des têtards dans chaque lot par simple observation.

5.5. Etude du métabolisme respiratoire

L'appareil utilisé est une électrode à oxygène, de type HANSATECH, qui permet la mesure de la production ou de la consommation d'oxygène. Selon la méthode de **Chagra et al. (2007)**.

L'appareil comprend à une cathode polarisé (-) en platine et une anode polarisé (+) circulaire en argent. Le contact entre les deux électrodes est établi par un pont de solution saturée de KCl, la suspension cellulaire est constamment remuée par un agitateur magnétique. L'application d'une faible tension électrique va provoquer la réduction électrolytique de l'oxygène présent dans la solution.

6. Paramètres biochimiques

6.1. Dosage des macromolécules

6.1.1. Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de **Bradford (1976)**.

❖ Principe de la méthode

Le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode de **Bradford (1976)** en ajoutant à 100µl du culot II, 4 ml de réactif du bleu brillant de commassie (BBC) G 250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. Les concentrations sont calculées à l'aide de la gamme d'étalonnage qu'est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) titrant 1 mg/ml d'eau distillée (**Babouri-Besnaci, 2016**).

6.1.2. Dosage des lipides

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)** en utilisant la vanilline comme réactif. Le dosage des lipides se fait sur des prises de 100 µl du surnageant II qui subissent une évaporation totale puis 1ml d'acide sulfurique concentré a été ajouté, les tubes sont ensuite agités et mises pendant 10 min dans un bain de sable à 100°C. Après refroidissement, 200 µl de ce mélange est ajouté à 2,5 ml de la vanilline et après 30 mn d'obscurité, une coloration rose se développe.

La densité optique déterminée sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

La quantité de lipide est calculée à partir de la droite de régression obtenue à partir de la gamme d'étalonnage, effectuée à partir d'une solution mère de lipides en ajoutant à 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V) (**Babouri-Besnaci, 2016**).

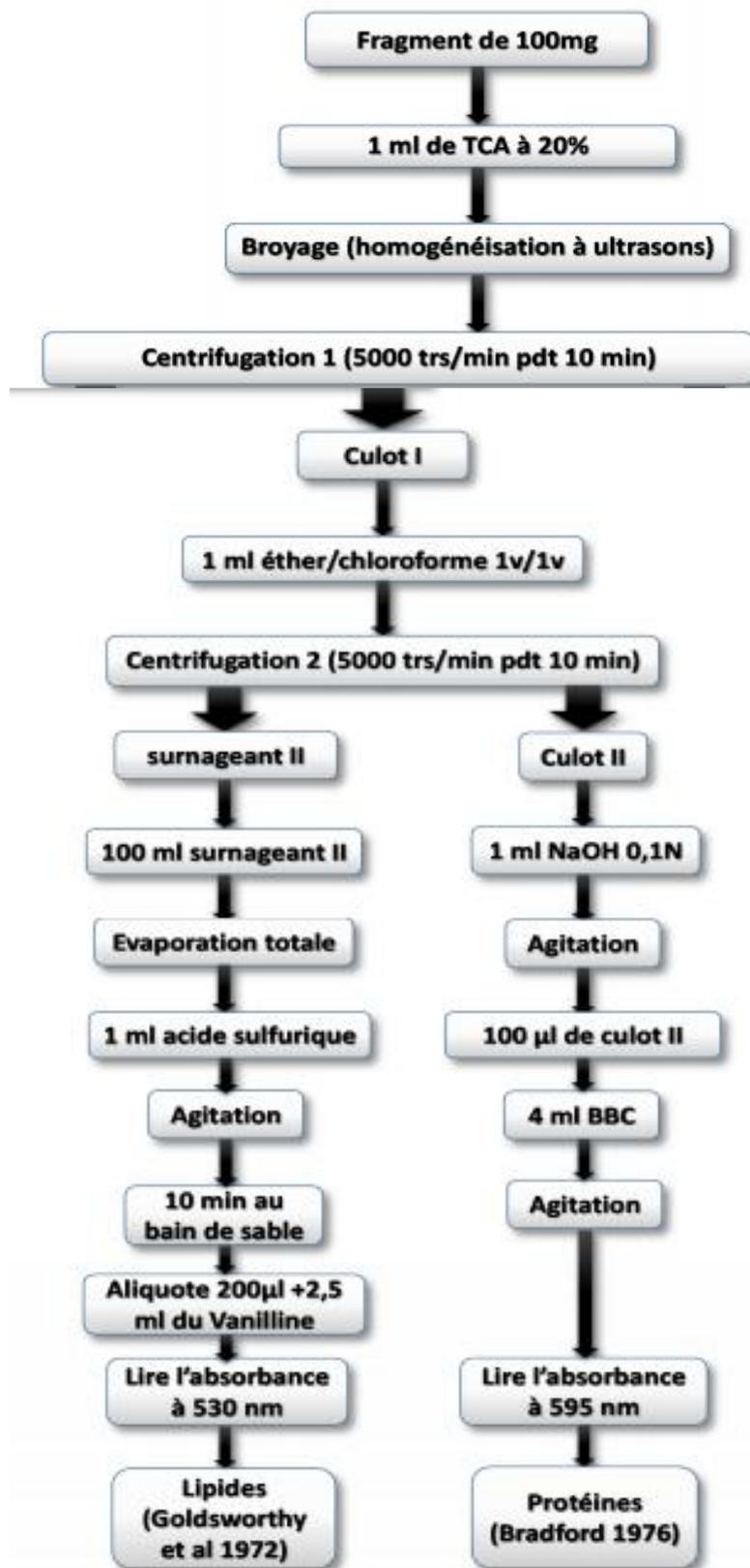


Figure 7 : Protocole d'extraction et de dosage des métabolites (lipides, protéines) (Shibko et al., 1966).

6.2. Dosage des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques

6.1.1. Mesure de l'activité Catalase (CAT)

❖ Principe de la méthode

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de **Regoli et Principato (1995)** dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une longueur d'onde de 240 nm.

❖ Protocole de traitement

Les fragments sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient: 20 μ l de surnageant, 200 μ l de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (500 mM) et 780 μ l de tampon (0,1M, pH 7,5). La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

L'activité catalase est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{\Delta DO \times 10}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines}}$$

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

ϵ : Le coefficient d'extinction linéique molaire est de 40 M⁻¹. Cm⁻¹

L : Longueur de la cuve utilisée (1cm).

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minute toutes les 15 secondes (spectrophotomètre, Jenway 63000) pour une longueur d'onde $\lambda = 240$ nm.

6.1.2. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion est effectué après 5 semaines de traitement avec le Dioxyde de Titane. Il est quantifié selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)**, qui repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5- mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobinzoïque (DTNB) par les groupements thiol (SH-) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation (30 secondes) des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M (7,44 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée) à l'aide d'un ultrason (Sonifer B-30).

L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) 0,25% (0,25 g d'ASS, 100 ml d'eau distillée). Ainsi, 200 µl de l'ASS sont additionnés à 800 µl d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé pendant 15 mn dans un bain de glace, puis centrifugé à 1000 tours /mn pendant 5 mn.

Une fraction aliquote (500 µl) du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris /EDTA (0,02 M, pH 9,6) (63,04 g tris, 7,4448 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée) et 25 µl de DTNB (0,01 M) (3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu).

Le mélange est laissé pendant 5 mn à température ambiante avant la mesure des absorbances contre un blanc où 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Le taux de GSH est exprimé par rapport aux quantités de protéines.

La lecture de la longueur d'onde est effectuée à $\lambda = 412$ nm après 5 min de repos (spectrophotomètre type JENWAY 6300) et la concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Taux de GSH } (\mu\text{M/ mg de prot}) = \left(\frac{\Delta\text{DO}}{13,1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \right) / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

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

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml (0,5 ml surnageant + 1ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB).

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

6.1.3. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST)

❖ Principe de la méthode

La mesure de l'activité GST est réalisée selon la méthode de **Habig et al., (1974)** basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat: le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH).

La réaction catalysée par la conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340nm.

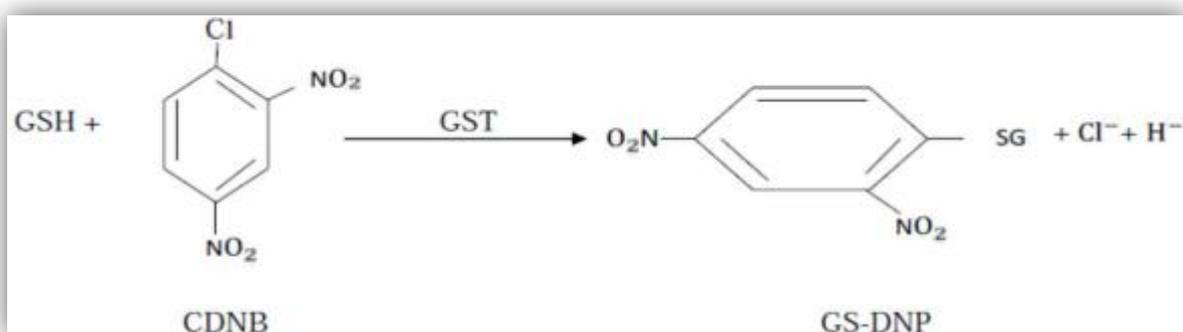


Figure 8: Conjugaison du glutathion (GSH) avec le 1-chloro, 2, 4- dinitrobenzène (CDNB).
(Azzouz, 2012)

Les têtards décapités sont homogénéisés dans 1ml de tampon de phosphate de sodium (0,1 M, pH 6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons.

L'homogénat est centrifugé à 14000 tours/min pendant 30 minutes et le surnageant récupéré servira de source d'enzyme.

Une fraction aliquote du surnageant de 0,2 ml a été ajoutée à 1,2 ml du mélange [CDNB(1 Mm) -GSH (5 mM)] dans un tampon phosphate (1 mM, pH 6).

La lecture des absorbances est effectuée toutes les 15 secondes pendant une minute à une longueur d'onde de 340 nm(spectrophotomètre, type JENWAY 6300, Visible) contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée.

L'activité de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{Activité GST } (\mu\text{M/ min/ mg de prot}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{9,6} \times \frac{\text{Volume total de la cuve}}{\text{prise d'essai} \times \text{mg de protéine}}$$

X: micro-moles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

Δ DO: pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

9,6: coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM-1cm-1).

6.1.4. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de dosage du malondialdéhyde, décrite par **Esterbauer et al. (1992)**, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique, d'un pigment absorbant à 530 nm.

La procédure s'est déroulée de la façon suivante :

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- ✓ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- ✓ Prélever 400 µl du surnageant. Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M.

- ✓ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80 °C pendant 10 minutes.

La lecture se fait par spectrophotométrie, l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés. **(Kadeche, 2018).**

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO.10^6}{\epsilon.\chi.L.Fd}$$

- C : Concentration en nmoles/mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

Chapitre III

Discussion

et

Conclusion

Discussion

Les nanoparticules du Dioxyde de Titane en poudre ou en suspension ont largement été caractérisées, que ce soit au niveau physico-chimique et au niveau de leur impact toxicologique. Il a été montré que les études toxicologiques doivent être corrélées à une caractérisation physico-chimique détaillée pour pouvoir conclure avec pertinence sur les résultats ; les caractéristiques réelles obtenues dans la matrice biologique en termes de structure, taille, composition de phase ou morphologie étant déterminantes pour l'activité biologique de ces composés. (**Rossano, 2014**)

Plusieurs études sur les mécanismes de toxicité ont montré que les nanoparticules de TiO₂ induisaient des effets indésirables qui étaient principalement causés par le stress oxydatif.

Dans notre étude toxicologique, le choix du matériel biologique s'est porté sur des amphibiens bio-indicateur de pollution : les têtards ; larves aquatiques des grenouilles vertes; pendant leur stade intermédiaire entre le stade embryonnaire et le stade sub adulte, ces organismes ont un comportement normal susceptible d'être affecté par la présence de polluants.

Les bio-indicateurs de la pollution environnementale sont sensibles aux variations physicochimiques de leurs milieux, notamment la température , les fréquences électromagnétiques et toute forme de pollution urbaine ,mais également sensible vis-à-vis des xénobiotiques variés tels que les hydrocarbures ,les éléments traces métalliques , les pesticides, les colorants et les additifs alimentaire différents autres xénobiotique peuvent causer des effets toxiques sur toute population.

Ces espèces bio-indicatrices sont très sensibles aux moindres variations de l'écosystème et tout changement intervenant dans leur milieu pourrait avoir des conséquences sur leur développement embryonnaire et leur physiologie (**Benosmane, 2015**).

Parmi les facteurs qui peuvent avoir une influence sur la croissance des têtards, les variations de la température et du pH sont les plus citées dans la littérature.

En effet, une théorie concernant la survie et la santé des amphibiens invoque que des étangs acides ou trop alcalin constitue une menace pour leur survie en ralentissant le développement des embryons et des têtards, particulièrement au moment de la métamorphose; il en est de même concernant les variations de la température qui influent sur la croissance des têtards (**Benosmane et al., 2015 ; Joly, 2000; Chagra et al., 2007**).

Ainsi les travaux **Schonweger et al. (2000)** et de **Mann et Bidwell (2000)** montrent qu'une température froide (entre 1 et 10°C) est néfaste pour le développement du têtard et que les températures variant entre 10 et 25°C sont les plus favorables. En revanche, **Mikkelsen et Jenssen (2006)** stipulent que la température idéale pour le développement des amphibiens doit varier entre 16 et 20 °C.

A partir de ces travaux nous avons essayé de maintenir une température (entre 13 et 16°C) et un PH favorables pour garantir le développement des têtards.

1. Evaluation de l'effet toxique du Dioxyde de Titane sur la croissance des têtards

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire reflète chez les organismes l'état du développement cellulaire.

Selon la recherche bibliographique différents xénobiotique perturbent le développement et croissance de têtards ; ceci est confirmé par **Benosmane et al.(2020)** qui a étudié l'impact du Mancozèbe sur les têtards ; les résultats ont relevé qu'en présence du Mancozèbe, la croissance des têtards est inhibée, la toxicité de ce xénobiotique chez les têtards se manifeste en premier lieu à travers un retard dans la croissance pondérale et linéaire dans toutes les concentrations testées (0.25, 0.50, 0.75et 1 mg/l). Cependant et à la plus forte concentration, un taux de mortalité supérieur à 80% a été enregistré après 5 semaines de traitement.

Ainsi que **Bouhafs (2010)** a étudié l'effet du (ARTEA 330EC) sur les têtards, ses résultats montrent qu'en présence du fongicide (ARTEA 330EC) la croissance des têtards est inhibée, la toxicité de ce xénobiotique chez les têtards se manifeste en premier lieu à travers une diminution du poids et de la taille à toutes les concentrations testées (25, 50, 75et 100ppm). Cependant à la plus forte concentration, nous avons enregistré un taux de mortalité de l'ordre de 50% a été enregistré et ce au-delà de 6 semaines de traitement (**Bourenane Bouhafs, 2010**).

Les travaux de **Laskowski et Hopkin (1996)** montrent que l'inhibition de la croissance induite par les contaminants peut résulter des troubles métaboliques, comportementaux ou de perturbations du contrôle neuroendocrine. Au niveau individuel, une conséquence écophysiological importante de l'inhibition de croissance est capable d'engendrer un retard de la période de maturité sexuelle.

Etudes citées ci-dessus, une perturbation des mouvements des têtards a été noté: une modification de la trajectoire, et augmentation de la vitesse de déplacement. Ces perturbations ne font que confirmer la toxicité des xénobiotiques testés et on permis ainsi d'émettre une première hypothèse selon laquelle le xénobiotique testé a un effet direct sur la maturation sexuelle des têtards.

Bouzidi et Bouheraoua (2017) ont rapporté que dès la mise en contact du TiO_2 avec les paramécies, la vitesse et la croissance diminuent ceci constitue le premier indice d'une toxicité de ces nanoparticules. L'observation microscopique des paramécies lors de l'étude du paramètre de la croissance cellulaire met en évidence une diminution de la mobilité.

D'un autre côté, **Boutalbi (2013)** a étudié la toxicité des nanoparticules (cas de l'Oxyde de Titane et l'Oxyde de Fer) sur le cycle de vie de *Daphnia magna* et leur résultat a porté un taux de mortalité de 90% des daphnies en un traitement à court terme et un taux atteignant 92.5% à long terme pour les NPs- TiO_2 pour la plus forte concentration du TiO_2 qui est de 200 mg/l . L'immobilisation des daphnies est une repense à tous les niveaux d'organisation biologique (physiologique moléculaire, cellulaire, biochimique, tissulaire, morphologique et écologique), ces résultats sont en accord avec les travaux de **Fouqueray et al. (2012)** qui ont trouvé qu'une concentration de 0.01mg/l de TiO_2 cause un effet significatif également sur les daphnies.

2. L'effet de TiO_2 sur la respiration des têtards

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la consommation d'oxygène du milieu par les têtards, notre but étant de prouver qu'une altération du métabolisme respiratoire suggérant d'une manière indirecte une atteinte mitochondriale. Les réserves énergétiques sont considérées comme des biomarqueurs qui permettent de refléter les changements subléthaux résultant d'un stress suite à une exposition aux xénobiotiques. L'importance de la déplétion énergétique pourrait refléter la puissance du stress subi.

Au moment de l'élimination des xénobiotiques, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les cytochromes P450 (CYP450), réagiront avec l'oxygène. L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'évaluation du taux de consommation d'oxygène des têtards de la grenouille verte *Rana Saharica* dans les travaux de **Benosmane et al. (2015)** traités par le pesticide (Mancozèbe) et **Chagra et al. (2007)** les ont exposés au fongicide ARTEA 330EC ainsi que **Orlofske et Hopkin (2009)** qui ont étudié le métabolisme énergétique lors du paroxysme métabolique chez la grenouille des marais *Lithobates Palustris*; ont indiqué une diminution dose-dépendante de l'oxygène du milieu confirmant ainsi la mobilisation de du CYP450 et des monoxygénases d'un côté mais suggérant également la possibilité de l'installation d'un stress oxydant.

Le processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5% de l'oxygène est transformé en espèces réactives oxygénées (ERO) ou reactive oxygen species (ROS); qui sont des formes variées de l'oxygène actif, et incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde (O^{2-}), le radical hydroxyle (OH) et les espèces non radicalaires qui peuvent être facilement transformées en radicaux comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

3. L'effet de TiO_2 sur les macromolécules (les protéines et les lipides)

Les protéines sont les premiers biomarqueurs de perturbation métabolique.

Masaya et al. (2002); **Redouane-salah (2004)** et **Boucenna (2009)**, ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, gastéropodes et protistes ciliés).

Les résultats de **Bouhafs (2010)** sont en accord avec les travaux suscités, en effet, ils ont pu mettre en évidence une atteinte du métabolisme des têtards à travers la perturbation du taux de leurs protéines totales. En effet, lorsque le changement (stress) n'est pas intense et les concentrations de xénobiotique dans l'organisme encore faibles, les têtards déploient une batterie de réponses à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification afin de lutter, de survivre et de s'acclimater à ce nouveau paramètre (**Bouhafs, 2010**).

Les membranes phospholipidiques sont principalement composées de répétition de lipides comme les glycérophospholipides avec la phosphatidyléthanolamine, le

phosphatidylglycérol sous irradiation UV-A, les radicaux formés à la surface de TiO₂ induisent des réactions radicalaires en chaîne : la peroxydation lipidique.

Cette peroxydation lipidique peut modifier la fluidité membranaire et perturber de ce fait différentes fonctions comme le transfert des nutriments, le transfert de signaux ou bien encore l'activité respiratoire (Carree, 2013).

Selon Arousseau, (2002) Les radicaux libres oxygénés provoquent une altération par dégradation des lipides, parmi ceux-ci la réaction de la bêta P oxydation, de plus les métaux ont été largement utilisés comme de agents initiateurs de l'oxydation des lipides (Bouhafs, 2010).

Précédemment, Husain et al. (2013) ont montré chez la souris une perturbation du métabolisme lipidique suite à l'instillation intratrachéale de faibles doses de NP de TiO₂ à savoir 18, 54, and 162 µg/souris (Laëtitia, 2018).

Parallèlement à cette perturbation lipidique, les radicaux libres entraînent également des désordres structuraux et fonctionnels dans la cellule.

3. L'effet du TiO₂ sur les biomarqueurs enzymatiques (CAT et GST) et non enzymatiques (GSH)

Le stress oxydatif a été proposé comme un mécanisme de lésions cellulaires induites par de nombreux types de nanoparticules (Stone et al., 2007; Ali et al., 2012).

Soumis à ce stress exogène, les microorganismes ont la capacité de développer toute une batterie de réponses capables d'enclencher un processus de détoxification vis-à-vis des Xénobiotique afin, de lutter, et/ou de s'acclimater face au stress chimique (Perez-Rama, 2001).

Sur le plan biochimique en premier, nous nous sommes intéressés sur certaines enzymes qui sont encore plus importantes dans le rôle de détoxification des ROS:

La catalase, est une enzyme antioxydant qui apparait dans les premières lignes de défense de la cellule contre les radicaux libre impliquée principalement le peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène (Antonie et al., 2003). ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, Lipides et protéines) (Vlahogianni et al., 2007).

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles.

La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre, le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires, Les GST complètent l'action des glutathion peroxydases (GPx) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génétoxiques causés par les composés électrophiles générés de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Hayes et Pulford, 1995**).

Cette enzyme joue un rôle important dans la protection contre le stress oxydatif et dans la désintoxication des xénobiotiques (**Zheng et al., 2013**).

Des perturbations de l'activité GST et du taux de GSH, sont dues au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xénobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (**Abid et al., 2016**).

Les Malondialdéhydes sont considérés comme des produits terminaux de l'oxydation des acides gras poly-insaturés et sont des biomarqueurs spécifiques (**Box et al., 2007; Nesto et al., 2007**).

Brown et al. (2002) ont montré que diverses réponses inflammatoires chez les souris ont commencé après l'accumulation de nanoparticules dans différents organes. Comme le foie a plus tendance à accumuler ces particules, une percussion supplémentaire doit donc être importante lors de l'utilisation de doses plus élevées de NPs-TiO₂. En raison de l'accumulation de NPs-TiO₂ et en raison de leurs propriétés catalytiques, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent générer, provoquer une rupture de l'oxydatif/antioxydant dans le foie, entraînant la peroxydation des lipides via les ROS et le malondialdéhyde (MDA) et l'apoptose hépatocytaire associé à une diminution des enzymes antioxydantes.

De plus, **Attia et al. (2013)** ont trouvé une augmentation significative en fonction du temps du MDA dans les tissus hépatiques après une intoxication par NPs-TiO₂. (**Rizk et al., 2017**).

Conclusion générale

Les amphibiens sont des vertèbrés tétrapodes (quatre pattes) ils vivent la majeure partie de leur temps en milieu humide et en forêt.

Le modèle biologique choisi, les têtards de la grenouille verte sont d'excellents bio-indicateurs de la pollution, leur mode de vie les fait passer périodiquement du milieu aquatique, dont ils dépendent presque tous pour se reproduire, au milieu terrestre.

La croissance des têtards est ralentie jusqu'à être inhibée en présence de plusieurs xénobiotiques, cela se fait en cause d'un stress intracellulaire qui provoque la mort des organismes.

A partir de notre synthèse bibliographique et des études réalisées sur l'impact toxicologique du Dioxyde de Titane sur certains organismes animales ou micro-organismes, le TiO_2 a des effets très peu toxiques surtout dans sa forme macromoléculaire, mais il est nuisible aux organismes vivants sous sa forme nanoparticulaire à partir d'une certaine concentration; dont nous n'avons pas pu déterminer dans la présente étude ; mais nous pouvons nous attendre à une perturbation dans la biométrie des têtards traités par rapport aux témoins.

Ainsi que sur le plan métabolique des macromolécules et l'évolution des biomarqueurs (enzymatiques et non enzymatiques) du stress oxydant, nous pouvons prévoir également une perturbation du taux de ces derniers (dépendante de la dose du TiO_2) chez les organismes traités par rapport aux témoins, due à l'implication du **système de défense et de détoxification pour protéger l'organisme contre le stress oxydant.**

Parallèlement à ceci, une perturbation dans la consommation d'oxygène du milieu peut être signalisée chez les têtards traités aux plus fortes concentrations du TiO_2 .

Perspectives:

En perspectives, il serait intéressant d'effectuer d'autres recherches portant sur :

- Etude de l'effet du Dioxyde de Titane sur d'autres organismes cellulaires et subcellulaires.
- Développer des produits à base de Dioxyde de Titane afin qu'ils soient moins nocifs pour la santé humaine.
- Etude de la toxicité du TiO_2 sur le système nerveux des têtards.
- La recherche de l'impact des nanoparticules du TiO_2 sur la reproduction des têtards.
- Étudier les effets du Dioxyde de Titane sur le matériel génétique des têtards.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Abid, A. et Amarouche, A. 2016. Nanotoxicité de Fe₃O₄ (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif Paramécium sp. Mémoire de master, Université de Larbi Tébessi, Tébessa. pp : 63- 64- 65.

Ali, H. B., Atig, F., Mehri, S., Saad, A., et Ajina, M. 2012. Analyse du statut oxydatif spermatique chez des patients infertiles. Basic and Clinical Andrology, 22(4), pp : 233-240.

Angelier, E., et Angelier, M. L. 1968. Observations sur le développement embryonnaire et larvaire de *Rana temporaria* L.[Batracien, Anoure]. In Annales de Limnologie, 4 (1), pp : 113-131.

Armand, L. 2013. Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalloprotéases, influence des paramètres physicochimiques. Thèse de doctorat. Toxicologie Agro Paris Tech, Paris. pp : 2-13.

Attia, H. F., Soliman, M. M., Abdel-Rahman, G. H., Nassan, M. A., Ismail, S. A., Farouk, M., et Solcan, C. 2013. Hepatoprotective effect of N-acetylcystiene on the toxic hazards of titanium dioxide nanoparticles. American Journal of Pharmacology and Toxicology, 8(4), p. 141.

Aurousseau, B. 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits.

Azzouz, Z. 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. These de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. p: 49

Babouri-Besnaci, S. 2016. Evaluation de la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer « Fe₂O₃ » sur un bioindicateur de pollution terrestre : *Helix aspersa*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp: 67-68.

Baillon, F. 2002. Procédé de synthèse du dioxyde de titane: analyse et modélisation des solutions titane-sulfate; influence des ultrasons sur la précipitation. Thèse de doctorat, Mines Paris Tech-Ecole des mines de Paris. pp: 43

Benketta, O. 2019. Effet de la concentration de la solution sur les propriétés des couches minces de dioxyde de titane déposées par spray pyrolyse ultrasonique. Mémoire de Master, Université de Biskra, Biskra. pp: 11-12

Benosmane, S. 2015. Impact d'un mimétique œstrogène (mos) sur un organisme bio indicateur de pollution: *R. saharica*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp: 12-15-64-65

Benosmane, S., Alayat, A., Boumedris, Z. E., Moumeni, O., Berrebah, H., & Djebbar, M. R. 2020. Effects of sublethal exposure of fungal xenoestrogen on oxidative stress and hepatic histology of tadpoles *Rana saharica*. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 7(3), 133-141.

Boucenna, M. 2009. Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les aciéries 1et 2 du complexe sidérurgique d'El-Hadjar sur un modèle bioaccumulateur *Helix aspersa*. Magister en biologie- Toxicologie. Université Badji Mokhtar d'Annaba. pp:85

Bouhadoun, S. 2015. Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane par pyrolyse laser et leur application en photocatalyse. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay. Paris. pp: 19-22

Boumaaza .S., et al. 2013. Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques (Ag₂O, ZnO-Al, TiO₂) vis-à-vis de quelque bactérie pathogène. Mémoire de master, Université 08 mai 1945, Guelma. pp : 12.

Bouraghdad. A. et Relid. Y. 2018. Etude du Comportement des Matériaux Inorganiques à base d'Oxyde de Titane dans la Dégradation de Quelques Substances Pharmaceutiques Récalcitrantes. Thèse de doctorat, Université de Blida 1. pp: 9

Bourenane Bouhafs, N. (2010). Etude des effets toxiques et génotoxiques de l'artea 330ec; un fongicide nouvellement introduit en Algérie sur les têtards de la grenouille *Rana saharica*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. pp: 42-61-62

Boutalbi, K. 2013. Contribution à l'étude de la toxicité des nanoparticules (cas de l'oxyde de titane et l'oxyde de fer) sur le cycle de vie de *Daphnia magna*. Mémoire de Master. Université 08 Mai 1945 Guelma. PP: 58

Bouzidi, R. et Bouheraoua, M. 2017. Impact toxicologique de dioxyde de titane sur un Modèle unicellulaire d'eau douce Paramecium spet l'effet adverse de la quercétine. Mémoire de master, Université de Larbi Tébessi, Tébessa.pp: 45-47.

Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., and Deudero, S. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), pp: 531-539.

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

Brown, J. S., Zeman, K. L., and Bennett, W. D. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(9), pp: 1240-1247.

Carree, G. 2013. Compréhension des mécanismes lors de la photocatalyse appliquée à la dégradation des microorganismes. Application au traitement de l'air et aux textiles auto-décontaminants. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg .pp: 185.

Chagra A., Rouabhi R., Berrebbah H., Djebar M.R., 2007. The toxicity study of asystemic fungicide: artea 330 EC on the physiology and the respiratory metabolism of the tadpole (*Rana saharica*). *Commun Agric Appl Biol Sci.* 72(2), pp : 191-195.

Chauprade, N. 2003. Les parcs naturels régionaux: D'un territoire d'expérimentation à un outil de coordination locale. Thèse de doctorat. Paris 13.

Clémence, D. 2016. Evaluation of TiO₂ exposure impact on adult and vulnerable brains. Thèse de doctorat. Université Paris-Saclay. Paris.

Dasari, T.P., Pathakoti, K. and Hwang, H.M. 2013. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metaloxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria. *Journal of Environmental Science*, 25(05): pp: 882-888.

Dehdouh, H. 2009. Propriétés physico-chimiques des couches minces de l'oxyde de titane. Effet de la concentration. Mémoire de magister, Université Mentouri-Constantine. pp: 7.

Dorier, M. 2018. Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, in vitro, d'épithélium intestinal. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes. pp: 13-24

Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jungens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* pp: 341.

Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., & Garric, J. 2012. Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route. *Environmental pollution*, 163. pp: 55-61.

Gaffet, E., Marano, F., Ferrari, L., Emmanuel Flahaut, Jouzel, J. N., Madec, L., Martinon, L., Nesslany, F., Sabatier, L., Gauvin, S. et al. 2018. Bilan des connaissances relatives aux effets des nanoparticules de TiO₂ sur la santé humaine ; caractérisation de l'exposition des populations et mesures de gestion. Rapport. Ministère de la Transition écologique et solidaire. Paris. pp: 26.

Gatoo, M., Naseem, S., Arfat My Dar A. M., Qasim, K. And Zubair, S. 2014. Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. *Bio Med Research International*, (498420), pp:1-8.

Gurr, J.R., Wang, A.S.S., Chen, C.H. and Jan, K.Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213(1-2), pp: 66-73. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.007

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. 1974. Glutathion S-Transferases. The First enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of Biological Chemistry* 249. pp: 7130- 7139.

Hayes, J. D. and Pulford, D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), pp:445-520.

Husain, M., Kyjovska, Z.O., Bourdon-Lacombe, J., Saber, A.T., Jensen, K.A., Jacobsen, N.R., Williams, A., Wallin, H., Halappanavar, S., Vogel, U. and Yauk, C.L. 2015. Carbon black nanoparticles induce biphasic gene expression changes associated with inflammatory responses in the lungs of C57BL/6 mice following a single intratracheal instillation. *Toxicology and applied pharmacology* 289, pp:573-588.

Joly, P. 2000. Invasions biologiques: état de l'art et perspectives. Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie). 7, pp: 21-35.

Kadeche, L. 2018. Évaluation des effets protecteurs de la supplémentation en quercétine et en vanilline sur la cytotoxicité induite par la métribuzine chez le rat de la souche wistar. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar. Annaba. pp: 70-71.

Laëtitia, Ch. 2018. Étude au niveau pulmonaire du profil d'expression de gènes et de protéines chez le rat exposé par inhalation à un aérosol de particules nanostructurées de dioxyde de titane. Université de Lorraine. pp:192.

LAI, K. 2020. Etude ab-initio des propriétés structurales, électroniques et optiques du dioxyde de titane TiO₂ dopé Fe, Au. Thèse de doctorat, Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen. pp: 8.

Laskowski, R. and Hopkin, S.P. 1996. Effect of Zn, Pb and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). Ecotoxicology Environmental Safety. 34, pp: 59-69.

Le Trequesser, Q. 2014. Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées: localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux. pp: 16-21.

Lovern, S.B. and Klaper, R. 2006. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry 25, pp: 1132-1137.

Mahmoudi, S. 2014. Etude des nanoparticules de dioxyde de titane élaborées par voies chimiques. Thèse de doctorat, Université Constantine 1. pp: 12.

Mamou, R. 2011. Contribution à la connaissance des amphibiens et des reptiles du Sud de la Kabylie (W. de Bouiraet de Bordj Bou Arreridj). Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Mémoire de Magister. pp: 3.

Mann, R.M. and Bidwell, J.R. 2000. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and two exotic frogs. Environmental Pollution. 114, pp: 195-205.

Masaya, M., Yoshinobu, H., Ai, Y., Maki, K. and Yasuo, O. 2002. Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. Journal of Phycology, 38 (5), pp: 983.

Messai, Y. 2018. Synthèse et caractérisation de nanoparticules semi-conductrices à large bande interdite pour l'étude de leurs propriétés photophysique, photochimique et antibactérienne. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp: 29.

Mikkelsen, M., Jenssen B.M., 2006. Polychlorinated biphenyls, sex steroid hormones and liver reinoids in adult male European common frogs (*Rana temporaria*). Chemosphere. 63. pp: 707-715.

Nesto, N., Romano, S., Moschino, V., Mauri, M., & DaRos, L. 2007. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. Marine Pollution Bulletin, 55(10-12), pp: 469-484.

Nicholas Arnold, le guide herpéto, ISBN: 978-2-603-01673-2. Delachaux et Niestlé. Paris. 2004, 2010. pp: 88-89.

Olivier, S. 2014. Réalisation d'un dépôt photocatalytique de dioxyde de titane à basse température avec une torche plasma à la pression atmosphérique. Thèse de doctorat, Université de Lorraine. pp: 07.

Orlofske, S.A. and Hopkins, W.A. 2009. Energetics of metamorphic climax in the pickerel frog (*Lithobates palustris*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A 154, pp: 191–196.

Pérez-Rama, M., López, C. H., Alonso, J. A., and Vaamonde, E. T. 2001. Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 20(9), pp: 2061-2066.

Redouane-Salah, S., 2004. Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d'El-Hadjar de Annaba sur un modèle cellulaire marin: *Tetraselmis suecica*. Sciences et Technologies C-N°22. pp: 121- 124.

Ricard, S. 1993. Toxicité du cadmium chez les têtards de la grenouille verte (*Rana clamitans*, Latreille). Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières.

Rizk, M.Z et al. 2017. Sanaa A. Alia, Manal A. Hameda. Nagy Saba El-Rigala. Hanan F. Alya. Heba H. Salahb. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice. pp: 470.

- Rossano, M. 2014.** Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétiques: impact sur la santé humaine et l'environnement. Thèse de Doctorat, Université du Havre. pp: 87.
- Sana, B., Reda, D. M., Houria, B., Amel, A., Marwa, B., Fateh, Z. M., and Rima, A. 2015.** Toxicological impact of a mimetic estrogen specie: mancozeb on a tadpoles of the green frog (*Rana saharica*). Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 6, pp:307-314.
- Schonweger, G., Schwerte, T. and Pelster, B. 2000.** Temperature-dependent development of cardiac activity in unrestrained larvae of the minnow Phoxinus-Phoxinus. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology. 27: 1634-1640.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V. and Zhao, J. 2013.** Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. Particle and Fibre Toxicology. doi:10.1186/1743-8977-10-15.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyeck C. 1966.** Newhall A, Freidman L, A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. Analyt Biochem. pp: 415-428.
- Stone, V., Johnston, H., & Clift, M. J. 2007.** Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. IEEE transactions on nanobioscience, 6(4), pp: 331-340.
- Thurre, D. 2009.** Grenouilles, crapauds et autres amphibiens. pp:11.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. J., and Valavanidis, A. 2007.** Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. Marine Pollution Bulletin, 54(9), pp: 1361-1371.
- Weeckberker, G and Cory, G. 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemial L1210 cells in vitro. Cancer letters, 40. pp: 257- 264.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. and Biswas, P., 2006.** Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials. Environmental Science & Technology 40, pp: 4336 4345.

Yrles, C. 2020. Effets indésirables des nanoparticules de dioxyde de titane sur l'Homme: revue systématique de la littérature. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux. Paris. pp: 37.

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

Site web:

- 1- <http://metiers-biodiversite.fr/licence-professionnelle-espaces-naturels-option-biologie-appliquee-aux-ecosystemes-exploites>
- 2- https://www.unine.ch/files/live/sites/karch/files/Doc_a_telecharger/materiel_pedagogique/DP_GrenouillesCie.pdf
- 3- <https://infovisual.info/fr>
- 4- file:///D:/respirer_dans_l_eau.pdf

- 5- <http://jpageslin.free.fr/Reproduction%20Grenouille%20J-P%20Geslin.pdf>
- 6- <https://www.planeteanimal.com/l-alimentation-des-tetards-grenouilles>
- 7- <http://blog.cpi-plongee.fr/Documents/Bio/grenouilles.pdf>
- 8- <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/ceramiques-proprietes-et-elaboration-42578210/dioxyde-de-titane-n4813/proprietes-de-l-oxyde-de-titane-n4813niv10002.html>
- 9- <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/ceramiques-proprietes-et-elaboration-42578210/dioxyde-de-titane-n4813/proprietes-de-l-oxyde-de-titane-n4813niv10002.html>
- 10- (INRS (2013) - Fiche toxicologique FT291 - Dioxyde de titane. Institut National de Recherche et de Sécurité.http://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_291-)
- 11- INERIS (2016). Proposition d'un repère toxicologique pour l'oxyde de titane nanométrique pour des expositions environnementales par voie respiratoire ou orale. Institut National de l'Environnement Industriel et des risques. NOTE D'AVANCEMENT - DRC-16-157027-10246A
- 12- <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-des-materiaux/solides-cristallins/le-dioxyde-de-titane-une-ceramique-semi>
- 13- <https://nanodioxydedetitane.wordpress.com/2017/12/12/le-nano-dioxyde-de-titane/>