

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة باجي مختار - عنابة -

Badji Mokhtar-Annaba  
University



Université Badji Mokhtar-  
Annaba

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de DOCTEUR

Option

Toxicologie Cellulaire

**EVALUATION ET ETUDE DE LA TOXICITE D'UNE  
FAMILLE D'ACARICIDES SUR DES PROTISTES CILIES**

Par

**Houneida BENBOUZID HADDAD**

**DEVANT LE JURY**

<b>PRESIDENT</b>	<b>:</b>	<b>DJEBAR M.R.</b>	<b>Pr.</b>	<b>Université de Annaba</b>
<b>DIRECTRICE DE THESE</b>	<b>:</b>	<b>BERREBBAH H.</b>	<b>Pr.</b>	<b>Université de Annaba</b>
<b>EXANINATEURS</b>	<b>:</b>	<b>BENALLAOUA S. SOUIKI L.</b>	<b>Pr. M.C.A</b>	<b>Université de Béjaia Université de Guelma</b>
<b>MEMBRES INVITES</b>	<b>:</b>	<b>BERREJEM M. AOUF N.E.</b>	<b>Pr. Pr.</b>	<b>Université de Annaba Université de Annaba</b>

Année - 2012-



---

## **Remerciements**

---

*Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université de Annaba. Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR** pour son accueil, sa disponibilité et son souci constant de manière à ce que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.*

*C'est aussi avec une profonde sincérité, que j'adresse toute ma reconnaissance au Professeur **Houria BERREBAH-DJEBAR**, pour m'avoir confié cette étude. Ses qualités humaines, sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant. Je voudrais aussi la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années et pour m'avoir communiqué la passion pour la recherche, que ce soit en terme de résultats théoriques ou de leur mise en œuvre concrète.*

*Je remercie encore une fois le Professeur **Mohamed Réda DJEBAR**, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury, mais aussi et surtout, pour s'être pleinement investi à la réalisation de ce travail et sacrifié de son temps pour répondre à mes nombreuses questions.*

*J'exprime aussi toute ma gratitude à Monsieur **Said BENALLAOUA**, Professeur à l'Université de Béjaia et Mademoiselle **Lynda SOUIKI**, Maître de Conférences à l'Université de Guelma pour l'intérêt et l'attention qu'ils ont accordés à ce travail de thèse et d'avoir accepté d'en être les examinateurs.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur **Malika BERREDJEM**, du laboratoire de Chimie Organique Appliquée de l'Université de Annaba, non seulement pour son co encadrement de très haut niveau, ses précieux conseils et orientations, mais également pour sa disponibilité et son dévouement. Qu'elle sache combien sa disponibilité et ses encouragements m'ont été d'une grande utilité.*

*Mes respects et ma reconnaissance vont aussi aux Professeurs : **AOUF Nouredine**, **BENSOUILAH Mourad** et **Hichem KARA**, pour leurs aides et leurs disponibilités.*

*Un grand merci pour mes collègues et amies du département de Biochimie de l'Université Annaba, qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail.*

*Toute ma sympathie et mon meilleur souvenir à mes amies de l'Université d'El Tarf, particulièrement : **Ibtissem, Wylia et Naouel**, pour tous les bons moments que nous avons pu partager ensemble.*

*Je remercie également les techniciennes, ingénieurs ainsi que tout le personnel du département de Biochimie et Biologie, en particulier : **Saïda, Souheila, Samira et Nadia**.*

*Que tous les membres du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire trouvent ici, l'expression de ma profonde sympathie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale qu'ils ont maintenue tout au long de ces cinq dernières années et pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans le cadre de cette thèse. Au regard de cette équipe qui est mienne, j'en tire une réelle fierté.*

*Je tiens à remercier le Dr **Hana SBARTAI** pour sa disponibilité à répondre spontanément à certaines de mes questions.*

*Je remercie affectueusement et tout particulièrement : **Papa et Mama**, à qui je dois tout. Ils ont tant contribué à la réussite de cette thèse et à faire de ma modeste personne, ce que je suis aujourd'hui. En égard à ce sacrifice, ils mériteraient sans contexte de figurer, à mes côtés, sur la page de garde. Je ne peux que leur dédier ce travail en témoignage de ma reconnaissance infinie.*

*A mes frères **Mohamed El-Hachemi et Ali Bey** ainsi que leurs petites familles dont le soutien inconditionnel m'a accompagnée tout au long de mes études.*

*A mes sœurs **Lylia et Sabrina**, mes confidentes de toujours ainsi que leurs adorables petites familles. Vous m'avez toujours encouragé dans mes études, supporté mes humeurs dépressives des années de thèse et m'apporter le moment opportun, le soutien indispensable.*

*A mes neveux et nièces : **Zakaria, Yasmine, Majda, Farès, Nour, Neïla, Imed, Abd El Rahim, Nahla et Yanis**. Votre tata qui vous aime beaucoup.*

*C'est aussi et surtout l'occasion de témoigner toute ma reconnaissance à mon époux **Chérif**, à qui je dois tout. Sans ta grande patience, ta compréhension et ton soutien, je n'aurais pu mener ce travail à bien. A **Chems Eddine**, qui du haut de ses huit ans, a toujours compris l'impératif de mon travail de thèse. A **Houssem**, il n'y a que toi pour nous faire rire avec tes expressions qui demeurent des énigmes pour nous tous, et a **Lyna Miriam**, ma poupée, qui n'est qu'un bébé, mais qui m'a tant apporté. Vous m'avez insufflé l'énergie nécessaire pour aller de l'avant et donner le meilleur de mes capacités.*

*La réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible, sans la contribution de toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont supporté, encouragé et aidé d'une manière ou d'une autre. Merci à toutes et à tous.*

---

## *Préambule*

---

Les travaux de recherche de cette thèse ont fait l'objet de 3 publications internationales :

- [1] **Bouchareb F., Hessainia S., Berredjem M., Benbouzid H., Djebbar H. and Aouf N.E.; 2012.** Efficient Method for the Synthesis of Diazaphospholidines: Toxicological Evaluation. *American Journal of Organic Chemistry*. 2(1): 14-17.
  
- [2] **Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. and Djebbar M.R.; 2012.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 1-9.
  
- [3] **Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M., Djebbar M.R.; 2012.** Effect of novel phosphoramidate on growth and respiratory metabolism of *Paramecium aurelia*. *J Nat Sc Biol Med*. 3:48-51.

---

***SOMMAIRE***

---

## *Table des Matières*

<i>Table des Matières</i> .....	<b>II</b>
<i>Listes des Figures</i> .....	<b>VI</b>
<i>Liste des Tableaux</i> .....	<b>VIII</b>
<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>IX</b>
<i>Introduction</i> .....	01
<b>Partie A. La chimie des organophosphorés</b> .....	04
<b>Chapitre I. Aperçu bibliographique sur les organophosphorés</b> .....	04
1- Introduction.....	04
2- Evolution des insecticides organiques de synthèse.....	05
2-1- Définition et classification.....	06
2-1-1- Une réalité complexe.....	06
2-1-2- Les trois générations des insecticides organiques de synthèse.....	06
3- Principales familles d'insecticides organiques de synthèse.....	09
2-1- Les organochlorés.....	09
2-2- Les carbamates.....	09
2-3- Les pyréthrinoïdes.....	10
2-4- Les organophosphorés.....	10
<b>Chapitre II. Synthèse des phényl phosphoramidates</b> .....	11
1- Introduction.....	11
2- Propriétés physiques et chimiques du PDCP.....	11
3- Réactivité de phényl dichlorophosphonique.....	12
3-1- Avec les amines.....	12
3-2- Avec les amino alcools.....	12
3-3- Avec les aminoesters.....	13
3-4- Avec les diamines.....	13
4- Synthèse des phényl phosphoramidates.....	14
4-1- Caractéristiques physico-chimiques.....	15
4-2- Etude structurale.....	15
<b>Chapitre III. Protocoles expérimentaux de synthèse</b> .....	17

1- Techniques utilisées.....	17
1-1- La chromatographie.....	17
1-1-1- La chromatographie sur colonne.....	17
1-2- L'extraction.....	18
1-3- La distillation.....	18
1-4- La résonance magnétique RMN.....	18
2- Préparation des phényl phosphoramidates.....	19
2-1- Mode opératoire général.....	19
2-2- Traitement.....	19
<b>Partie B. Etude expérimentale.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre I. Etude bibliographique sur les protistes ciliés.....</b>	<b>21</b>
1- Rappel sur la biodiversité microbienne.....	21
1-1- Rappel sur les protistes.....	21
1-2- Phylogénie des protistes.....	22
1-3- Taxinomie.....	23
2- Rappels sur la paramécie ( <i>Paramecium sp.</i> ).....	24
2-1- Mouvement.....	27
2-2- Reproduction.....	27
2-3- Alimentation.....	29
2-4- Respiration.....	29
2-5- Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie.....	29
3- Justification du choix de <i>Paramecium sp.</i> comme modèle biologique.....	30
<b>Chapitre II. Outils d'évaluation en écotoxicologie.....</b>	<b>31</b>
1- Les biomarqueurs: notions et concepts.....	32
1-1- Définition et rôle(s) biologique(s).....	32
1-2- Qualités requises.....	33
2- Pistes de recherche retenues pour l'étude des xénobiotiques de synthèse.....	34
2-1- Etude du stress oxydant.....	34
2-1-1- Le système antioxydant cellulaire.....	34
2-1-2- L'étude du stress oxydant, son intérêt en écotoxicologie.....	35
2-1-3- Biomarqueurs de stress oxydant retenus pour notre étude.....	36
2-1-3-1- L'activité catalase.....	37
2-1-3-2- L'activité glutathion S transférase.....	37

2-1-3-3- Le glutathion, un antioxydant non enzymatique.....	39
<b>Chapitre III. Matériels &amp; méthodes</b> .....	40
1- Technique d'isolement et d'identification de <i>Paramecium sp.</i> .....	40
1-1- Technique d'isolement des paramécies.....	40
1-2- Décontamination des cellules.....	40
1-3- Identification de <i>Paramecium sp</i> .....	40
1-4- Culture pure de <i>Paramecium aurelia</i> .....	41
2- Préparation des échantillons en vue des analyses biologiques.....	42
2-1- Matériel biologique.....	42
2-2- Matériel chimique.....	43
3- Protocoles expérimentaux mis en place.....	44
3-1- Calcul du nombre de cellules.....	44
3-2- Calcul du nombre et du temps de génération.....	44
3-3- Calcul du taux de croissance cellulaire.....	45
3-4- Calcul du pourcentage de réponse.....	45
3-5- Dosage de la charge protéique.....	46
3-5-1- Principe de dosage des protéines totales.....	46
3-5-2- Protocole expérimental.....	46
3-6- Dosage de la quantité de glutathion total (GSH).....	47
3-6-1- Principe du dosage .....	47
3-6-2- Protocole expérimental .....	47
3-7- Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST).....	48
3-7-1- Principe du dosage .....	48
3-7-2- Protocole expérimental .....	48
3-8- Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	49
8-1- Principe du dosage.....	49
3-8-2- Protocole expérimental .....	49
3-9- Etude du métabolisme respiratoire.....	50
3-9-1- Principe du dosage .....	50
3-9-2- Protocole expérimental.....	50
3-10-Résonance magnétique.....	51
3-11- Détermination de le concentration inhibitrice (CI50).....	52
3-11- Analyse statistique.....	52

<b>Chapitre IV. Résultats</b> .....	54
1- Cytotoxicité et stress oxydant du PA-A.....	54
1-1- Effet du PA-A sur la morphologie et la paroi des paramécies.....	54
1-2- Effets sur croissance cellulaire.....	55
1-3- Calcul du pourcentage de réponse (P.R.).....	56
1-4 Détermination de la concentration inhibitrice CI50.....	56
1-5- Détermination du nombre et du temps de génération cellulaire.....	57
1-6- Détermination du taux de croissance des paramécies.....	58
1-7- Variations du taux de protéines totales.....	58
1-8- Taux de glutathion total.....	59
1-9- Effet du PA-A sur le métabolisme respiratoire de la paramécie.....	60
1-10- Etude du stress oxydant.....	61
1-10-1- Effets du PA-A sur l'activité glutathion S-transférase.....	61
1-10-2- Effets du PA-A sur l'activité catalase.....	61
2- Etude de la toxicité du PA-B sur la paramécie.....	63
2-1- Effet du PA-B sur la morphologie et la paroi des paramécies.....	63
2-2- Effets sur la croissance cellulaire.....	64
2-3- Calcul du pourcentage de réponse.....	65
2-4 Calcul de la concentration inhibitrice CI50.....	65
2-5- Détermination du nombre et du temps de génération cellulaire.....	66
2-6- Effet du PA-B sur le taux de croissance des paramécies.....	67
2-7- Effet du PA-B sur l'évolution du taux de protéines totales.....	67
2-8- Effet du PA-B sur l'évolution du taux de GSH.....	68
2-9- Effet du PA-B sur le métabolisme respiratoire des paramécies.....	69
2-10- Etude du stress oxydant.....	70
2-10-1- Effet du PA-B sur l'évolution de l'activité GST.....	70
2-10-2- Effet du PA-B sur l'évolution de l'activité CAT.....	71
<b>Chapitre V. Discussion</b> .....	73
<b>Conclusion &amp; Perspectives</b> .....	84

## Références Bibliographiques

### Résumé

### Abstract

## *Liste des Figures*

Titre de la figure	Page
Figure 1. Différentes catégories d'insecticides (exprimées en pourcentage du nombre de molécules répertoriées par Wood, 2004).	07
Figure 2. Les trois grandes familles de composés organiques de synthèses (Wood, 2004)	08
Figure 3. Réactivité du PDCP avec les amines.	12
Figure 4. Réactivité du PDCP avec les amino alcools.	13
Figure 5. Réactivité du PDCP avec les aminoesters.	13
Figure 6. Réactivité du PDCP avec les diamines.	14
Figure 7. Synthèse des phényl phosphoramidates.	15
Figure 8. Position du genre <i>Paramecium</i> dans le système « Trois domaines » (Woese <i>et al.</i> , 2000).	23
Figure 9. Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).	27
Figure 10. Cycle sexuel et réorganisation macronucléaire : Événements cellulaires (Meyer <i>et al.</i> , 2005).	28
Figure 11. Systèmes enzymatiques impliqués dans la défense antioxydante cellulaire (Barillet, 2007).	35
Figure 12. Glutathion réduit ou $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine (d'après Armstrong, 1991).	38
Figure 13. Les sites actifs des phosphoramidates vis-à-vis du GSH.	38
Figure 14. <i>Paramecium aurelia</i> observée sous microscope photonique (x100)	41
Figure 15. Tests de cytotoxicité des paramécies traitées par les molécules PA-A et PA-B.	43
Figure 16. Schéma de l'Electrode à Oxygène (Hansatech Instruments).	51
Figure 17. Paramécies traitées au PA-A sous microscope photonique (x100) après 72h de traitement.	54
Figure 18. Effet du PA-A (40, 60 et 80 $\mu$ M) sur la croissance cellulaire en fonction du temps.	55

Figure 19. Evolution du pourcentage de réponse vis-à-vis des différentes concentrations du PA-A.	56
Figure 20. Effet des différentes concentrations du PA-A sur les variations du taux de protéines totales en fonction du temps.	59
Figure 21. Effet des concentrations croissantes du PA-A sur le taux de GSH en fonction du temps.	59
Figure 22. Effet du PA-A sur le métabolisme respiratoire.	60
Figure 23. Variation de l'activité GST en fonction du temps et des concentrations croissantes du PA-A chez la paramécie.	61
Figure 24. Variation de l'activité CAT en fonction du temps et des concentrations croissantes du PA-A chez la paramécie.	62
Figure 25. Paramécies traitées au PA-B sous microscope photonique (x100) après 72h de traitement.	63
Figure 26. Effet des différentes concentrations du PA-B sur la croissance cellulaire en fonction du temps	64
Figure 27. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies traitées aux concentrations 2, 4 et 8 $\mu$ M.	65
Figure 28. Effet du PA-B aux concentrations de 2, 4 et 8 $\mu$ M sur l'évolution du taux des protéines totales en fonction du temps.	68
Figure 29. Evolution du taux de GSH au cours de l'exposition des paramécies au PA-B.	69
Figure 30. Effet des différentes concentrations du PA-B sur le métabolisme respiratoire des paramécies après 72h de traitement.	70
Figure 31. Evolution de l'activité GST en fonction du temps au cours de l'exposition aux différentes concentrations du PA-B.	71
Figure 32. Effet du PA-B aux concentrations de 2, 4 et 8 $\mu$ M. sur l'activité CAT en fonction du temps.	72
Figure 33. Structure des phosphoramidates testés.	81
Figure 34. Mécanisme de biodégradation des deux molécules testées.	81
Figure 35. Effets physiologiques et biochimiques des phosphoramidates observés.	85
Figure 36. Mécanisme d'action des PA-A et PA-B selon Benbouzid et Berrebbah, 2012.	86

## *Liste des Tableaux*

Titre du tableau	Page
Tableau 1. Types d'insecticides en fonction du mode de pénétration dans l'insecte (D'après Van Emden et Service, 2004).	05
Tableau 2. Propriétés physiques et chimiques de PDCP.	11
Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des phényl phosphoramidates.	15
Tableau 4: Valeurs du Slope et de la CI50 à 18 et 24h de traitement.	57
Tableau 5. Valeurs du nombre et du temps de génération après 24h d'exposition au PA-A.	57
Tableau 6. Détermination du taux de croissance des paramécies après 24h d'exposition au PA-A.	58
Tableau 7. Valeurs du Slope et de la CI50 aux temps 18 et 24h de traitement.	66
Tableau 8. Détermination du temps et du nombre de génération après 24h d'exposition au PA-B.	66
Tableau 9. Détermination du taux de croissance après 24h d'exposition.	67

---

## *Liste des Abréviations*

---

<b>ANOVA</b>	: <b>analysis of variance</b> (analyse de variance)
<b>μM</b>	: <b>micromole</b>
<b>μl</b>	: <b>microlitre</b>
<b>mM</b>	: <b>millimole</b>
<b>nm</b>	: <b>nanomètre</b>
<b>ml</b>	: <b>millilitre</b>
<b>cm</b>	: <b>centimètre</b>
<b>mg</b>	: <b>milligrammes</b>
<b>g</b>	: <b>grammes</b>
<b>L</b>	: <b>Litre</b>
<b>T</b>	: <b>Temps</b>
<b>min</b>	: <b>minutes</b>
<b>h</b>	: <b>heures</b>
<b>TCA</b>	: <b>Acide Trichloracétique</b>
<b>EDTA</b>	: <b>Acide Ethylènedinitrilotétraacétique</b>
<b>CAT</b>	: <b>catalase</b>
<b>GSH</b>	: <b>glutathion</b>
<b>GST</b>	: <b>glutathion S-transférase</b>
<b>pH</b>	: <b>potentiel hydrogène</b>
<b>SOD</b>	: <b>Superoxyde Dismutase</b>
<b>WHO</b>	: <b>World Health Organization</b> (OMS : organisation mondiale pour la santé)

---

# *Introduction*

---

De nombreuses substances toxiques générées par les activités humaines sont quotidiennement déversées dans l'environnement aquatique. Les pollutions d'origine chronique contribuent majoritairement à la détérioration des écosystèmes aquatiques. Les contaminants majeurs, dont certains sont également d'origine naturelle, sont regroupés en plusieurs familles: les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les chlorophénols, les polychlorobiphényles (PCBs), les hexachlorohexanes, les hexachlorobenzènes, les dioxines, les organoétains, les pesticides organochlorés, les insecticides organophosphorés et carbamates et les métaux lourds tels que le cadmium, le mercure, l'argent, le plomb, le zinc, le cuivre, le fer.

Cette liste n'est évidemment pas exhaustive. De plus, de nouvelles molécules chimiques sont constamment synthétisées. Ces substances étrangères aux organismes vivants (hormis certains métaux essentiels), ou xénobiotiques, contaminent tous les compartiments (sédiment, colonne d'eau) et par là même de nombreuses espèces animales aquatiques. Outre la dégradation des écosystèmes et l'instauration progressive d'un déséquilibre écologique, la santé humaine est également menacée. La préoccupation grandissante de la population et des autorités pour les problèmes liés à l'hygiène, la sécurité, l'environnement et de manière plus générale à la qualité de vie a conduit à l'instauration de réglementations de plus en plus strictes concernant les rejets de substances polluantes dans l'environnement. Des outils permettant d'évaluer la qualité des milieux aquatiques se sont ainsi avérés nécessaires, tant pour les organismes de surveillance de la qualité de l'eau (ex.: Agences de l'Eau) que pour les industriels. (Amiard *et al.*, 1998).

Néanmoins, il est une question essentielle à laquelle les industriels ne pourront jamais répondre: quel est l'impact des molécules chimiques nouvellement synthétisées sur les écosystèmes?

Nous inscrivant dans des préoccupations écotoxicologiques, il nous a semblé pertinent d'estimer la toxicité de deux composés organophosphorés dont la synthèse avait pour but d'obtenir deux molécules moins toxiques sur des modèles biologiques alternatifs afin d'en évaluer l'impact à l'échelle cellulaire.

---

# *Introduction*

---

Trois ambitions majeures ont donc motivé ce travail : (i) synthétiser deux nouveaux composés organophosphorés linéaires, (ii) étudier les paramètres toxicologiques (mécanismes d'action toxique, effets biologiques) des molécules de synthèse à l'échelle cellulaire et (iii) estimer l'influence relative de ces paramètres sur le comportement de des protistes ciliés.

Les paramécies ont été choisies en tant que modèle biologique pour notre étude du fait de:

- Leur facilité à être cultivé en laboratoire, leur manipulation rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995).
- Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales des mammifères (Druez *et al.*, 1989 ; Gräf *et al.*, 1999), de plus des études de microcinématographie à haute vitesse ont révélé que les battements ciliaires chez les mammifères sont parfaitement comparables à ceux de la paramécie, *Tetrahymena*.....etc. (Berrebbah, 1990).

Les études portant sur les effets toxicologiques des insecticides sur les protistes ciliés d'eau douce (particulièrement *Paramecium sp.*) sont quant à elles beaucoup plus rares (Venkateswara Rao *et al.*, 2006 ; Rouabhi *et al.*, 2007 ; Sbartai *et al.*, 2009 ; Rouabhi *et al.*, 2009 ; Amaroli *et al.*, 2010 ; Azzouz *et al.*, 2011), un effort substantiel est à produire de façon à accroître les connaissances scientifiques dans ce domaine. Dans ce contexte, un panel de mesures biologiques est susceptible d'être investigué, depuis des altérations biochimiques jusqu'à des conséquences populationnelles, voire au-delà (communautés, écosystèmes). Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes attachés à suivre des marqueurs situés en amont de la cascade d'évènements et qui constituent donc les premières évidences de perturbations. Au niveau subcellulaire, nous nous sommes ainsi intéressés au suivi de marqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant.

Dans la première partie, un "aperçu bibliographique" concernant les organophosphorés est dressé et constitue un premier chapitre. Un second chapitre est quant à lui dédié à la synthèse de

---

# *Introduction*

---

deux molécules utilisées dans ce présent travail comme des outils de stress chimique. Les protocoles expérimentaux de synthèse constituent quant à elle le troisième chapitre.

Dans le premier chapitre de la seconde partie, un rappel bibliographique sur les protistes ciliés est élaboré. Le chapitre deux regroupe les différents outils d'évaluation en écotoxicologie et qui tient lieu de préambule au chapitre "Matériels & Méthodes" proprement dit. Les chapitres "Résultats" et "Discussion" sont ensuite exposés avant de dresser un bilan de ces travaux au travers d'une conclusion générale et de présenter les perspectives d'études sur lesquelles ces travaux seraient susceptibles de déboucher.

## Aperçu bibliographique sur les organophosphorés

### 1- Introduction

Les organophosphorés contiennent un atome de phosphore dans leur structure chimique. Leur mise au point remonte aux travaux de Schader, en Allemagne, en 1934 (Matsumura, 1975) puis pendant la Seconde Guerre mondiale comme succédanés de la nicotine. Ce sont des dérivés des gaz sarin et tabun qui sont également des insecticides hautement toxiques pour les mammifères (Dajoz, 1969). Ils sont tous des dérivés de l'acide phosphorique. La majorité est soluble dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau, alors que quelques-uns comme le dichlorovos sont volatils. Neurotoxiques, les organophosphorés regroupent les insecticides les plus toxiques envers les mammifères. Par contre, ils ne sont pas persistants comme les organochlorés, caractéristique qui leur a permis dès les années 50 de remplacer ces derniers en agriculture contre les insectes et les acariens.

On distingue les organophosphorés exothérapeutiques qui agissent en pénétrant directement dans l'organisme des insectes par des voies diverses (contact, *per os*, etc.), comme le parathion, et les organophosphorés endothérapeutiques ou systémiques comme le disulfoton, qui pénètrent facilement dans la plante où ils circulent (Tableau 1). Certains sont fumigants comme le malathion (qui est aussi un insecticide de contact), translaminaires ou quasi-systémiques (Van Emden et Service, 2004).

Wood (2004) dénombre 152 organophosphorés et les classe en détaillant les différentes familles chimiques : organophosphates, organothiophosphates dont les organothiophosphates aliphatiques, les organothiophosphates oximes, les organothiophosphates hétérocycliques, etc.

L'importance de ce nombre de molécules recensées montre que les organophosphorés restent encore aujourd'hui la famille d'insecticides organiques de synthèse la plus employée sans doute à cause d'un large éventail de modes d'action et de multiples possibilités dans leurs applications.

**Tableau 1. Types d'insecticides en fonction du mode de pénétration dans l'insecte. (D'après Van Emden et Service, 2004).**

Type d'insecticide	Mode de pénétration
Contact	Après contact, l'insecticide pénètre à travers la cuticule pour atteindre les tissus internes.
Résiduel de contact	Le résidu (après dégradation par les UV par exemple) reste insecticide et pénètre de la manière indiquée précédemment.
Par voie orale <i>/ingestion/per os</i>	L'insecticide doit être ingéré. Dans certain cas, le résidu non toxique nécessite d'être transformé par la flore digestive de l'insecte pour devenir toxique (pro-toxique).
Translaminaire	L'insecticide pénètre dans la feuille du végétal, et le résidu toxique, ayant traversé plusieurs couches cellulaires, se situe au niveau des faces externe et interne de la feuille.
Systématique	L'insecticide, absorbé dans la plante, migre dans la sève et envahit tous les organes de la plante.
Quasi-systématique	L'insecticide pénètre au point d'application de la plante et ne migre pratiquement pas dans les autres parties de la plante.
Fumigant	Insecticide sous forme de vapeur qui développe une toxicité inhalatoire chez l'insecte.

## 2- Evolution des insecticides organiques de synthèse

L'avènement des insecticides organiques de synthèse est généralement associé à la découverte des propriétés insecticides du DDT (dichlorodiphényltrichloro-éthane) en 1939 par Müller. L'utilisation de ce produit au cours de la Seconde Guerre mondiale (1939-1945) par l'armée américaine, allait donner un essor remarquable à la recherche de nouveaux insecticides de synthèse dès l'armistice de 1945.

Ainsi, la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle a été marquée par l'utilisation de plusieurs familles chimiques d'insecticides organiques de synthèse qui a considérablement changé l'agriculture et amélioré l'état sanitaire de la population mondiale en permettant une lutte contre

les insectes vecteurs de maladies humaines ou animales. Mais dès les années 60, il fut constaté que certains d'entre eux occasionnaient des perturbations physiologiques et environnementales.

Une nouvelle phase, dans la lutte contre les insectes, s'est alors ouverte, orientée non seulement vers la recherche de stratégies alternatives mais aussi vers une réflexion pour faire évoluer les insectes de synthèse afin de mieux prendre en compte les exigences environnementales dans le cadre d'un développement durable.

## **2-1- Définition et classification**

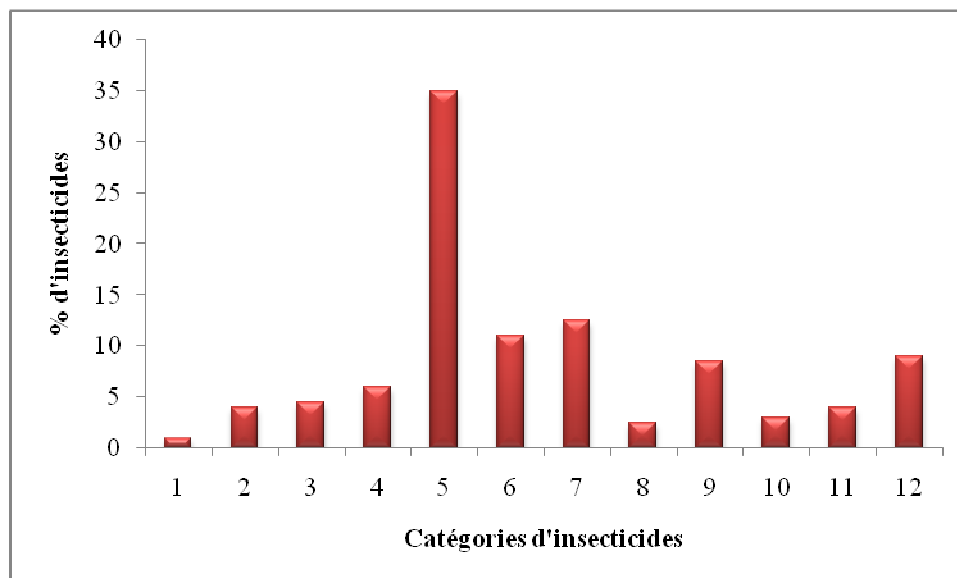
### **2-1-1- Une réalité complexe**

Un insecticide chimique est un produit issu de la synthèse chimique (composé synthétique ou héli-synthétique) qui a la propriété de tuer les insectes, à court ou à long terme. Les insecticides organiques de synthèse sont des molécules carbonées synthétiques et se distinguent des insecticides inorganiques ou minéraux.

433 molécules (Wood, 2004) sont classées par familles chimiques parmi lesquelles par ordre d'importance trois familles majoritaires : les organophosphorés, les carbamates, les pyréthri-noïdes de synthèse qui représentent à eux seuls 58% des molécules (figure 1). D'autres molécules sont, pour l'instant, rangées dans une catégorie à part (« inclassables ») dans laquelle se trouvent des molécules récemment mises sur le marché, les seuls représentants de leur famille chimique ou celles dont on ne connaît pas très bien le mode d'action.

### **2-1-2- Les trois générations des insecticides organiques de synthèse**

La première génération des insecticides organiques de synthèses est antérieure à 1940. Elle comprend les produits les plus anciens qui ont été utilisés contre les insectes. Deux groupes de composés ont été synthétisés à cette époque comme insecticides et acaricides : le dinitro-o-crésylate de potassium et le dinitro-orthocrésol (DNOC) (figure 2). Un second groupe de composés, les alkylthiocyanates, comme l'isobornylthiocyanate, a été développé à partir des années 30 (Thacker, 2002).



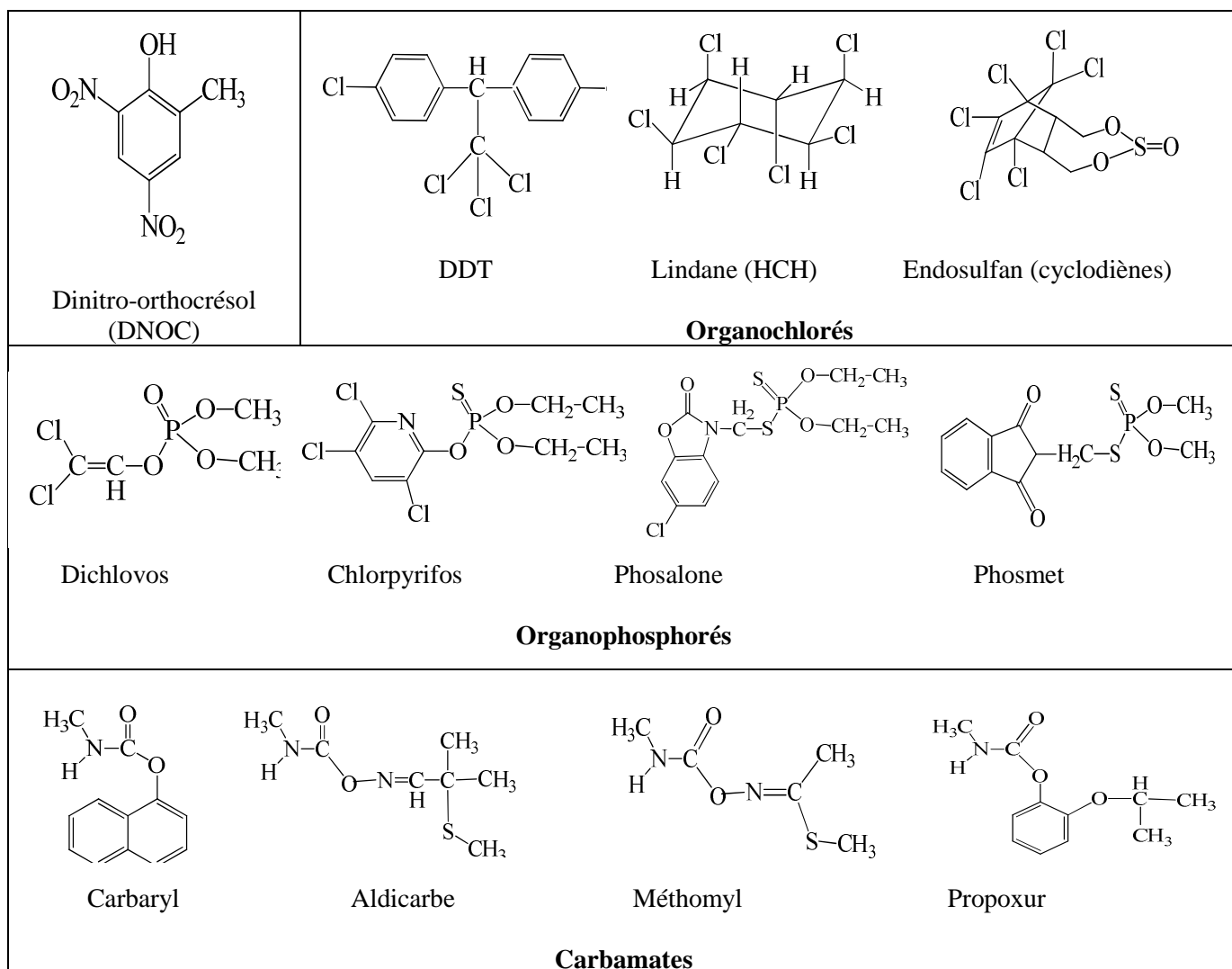
1. Dinitrophénols
2. Insecticides inorganiques (y compris arsénicaux et fluorés)
3. Fumigants
4. Organochlorés (DDT, HCH, Cyclodiènes)
5. Organophosphorés
6. Carbamates
7. Pyréthriinoïdes
8. Néonicotinoïdes
9. Régulateurs de croissance de l'insecte (RCI)
10. D'origine microbiologique
11. D'origine botanique
12. Autres (Pyrazole, Pyrrole, etc.)

**Figure 1. Différentes catégories d'insecticides (exprimées en pourcentage du nombre de molécules répertoriées par Wood, 2004).**

La deuxième génération est celle des molécules qui sont arrivées sur le marché au moment de la Seconde Guerre mondiale ; les hydrocarbures polyaromatiques comprenant :

- Les organochlorés que nous avons évoqués à travers l'exemple du DDT ;
- Les carbamates, dont les premières molécules insecticides, les dithiocarbamates, avaient été synthétisées dès 1931 (Fournier, 1988) ;

- Les organophosphorés mis au point par les Allemands, pendant les années 40-45, à partir des gaz de combat utilisés au cours de la Première Guerre mondiale.



**Figure 2. Les trois grandes familles de composés organiques de synthèse (Wood, 2004).**

Ce sont ces trois grandes familles de composés (Figure 2) que l'on a l'habitude de dénommer les insecticides organiques de synthèse. Leur développement supenta les autres insecticides qui devinrent marginaux. Ce sont eux, qui ont provoqué une révolution dans le domaine de la lutte contre les insectes fléaux.

En effet, à cette époque, ils étaient « bon marché », efficaces et apparaissaient sans effets secondaires notables. Nous savons maintenant qu'il n'en était rien, sans doute à cause de l'usage massif et inconsidéré qui en a été fait. Mais il faut garder en mémoire que, dans les années cinquante, ces produits ont représenté le savoir-faire d'une époque qui a permis d'accomplir des progrès considérables au niveau de la santé ainsi que de la production alimentaire.

La troisième génération d'insecticides organiques de synthèse est arrivée sur le marché à partir du dernier quart du vingtième siècle. Certains (Firm, 2003) classent dans cette catégorie tous les composés apparus à partir des années 70. Y sont alors répertoriés les pythriinoïdes de synthèse commercialisés à partir de 1974, mais aussi les phénylpyrazoles, comme le fipronil découvert en 1987 et commercialisé en 1992, les néonicotinoïdes, comme l'imidachlopride apparu à la même période, ou les benzoylurées comme diflubenzuron.

### **3- Principales familles d'insecticides organiques de synthèse**

Les organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyréthriinoïdes représentent la grande majorité des insecticides organiques de synthèse qui ont été employés ou sont utilisés actuellement.

#### **3-1- Les organochlorés**

Ces insecticides possèdent dans leur structure au moins une liaison carbone-chlore. On distingue trois familles d'insecticides organochlorés : celles du DDT et des HCH (hexachlorocyclohexane) ainsi que les cyclodiènes.

#### **3-2- Les carbamates**

Le remplacement des organochlorés a été accéléré par l'apparition et l'utilisation des carbamates qui sont une famille de composés organiques porteur d'une fonction  $R-NH-(C=O)O-R'$ . Il s'agit en fait des esters substitués de l'acide carbamique ou d'un amide substitué.

### **3-3- Les pyréthriinoïdes**

S'il y a un insecticide d'origine végétale qui a connu un succès sans précédent, c'est bien le pyrèthre, composé extrait du chrysanthème *Chrysanthemum cinerariifolium*. Cependant, ce biopesticide n'a jamais pu être utilisé en agriculture à cause de sa labilité en présence de la lumière solaire. Aussi est-ce très tôt que la chimie de synthèse s'est attachée à mettre au point des composés photostables : les pyréthriinoïdes (Ware, 1991).

### **3-4- Les organophosphorés**

Les organophosphorés contiennent un atome de phosphore dans leur structure chimique. Ils sont regroupés en trois grands groupes :

- Les dérivés aliphatiques, avec une chaîne carbonée ;
- Les dérivés phénylés qui contiennent un noyau phényle dans leur structure ;
- Les dérivés hétérocycliques dans lesquels le ou les cycles incluent des atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre.

Au regard de la synthèse bibliographique précédemment établie sur les insecticides organiques de synthèse. Notre choix s'est porté sur la synthèse de deux nouveaux composés organophosphorés linéaires de type phosphoramidates, et de déterminer leur toxicité envers des protistes ciliés d'eau douce particulièrement *Paramecium sp.*

## Synthèse des phényl phosphoramidates

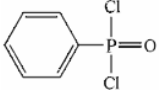
### 1-Introduction

Dans le but de préparer des composés phosphorylés tels que les phosphoramidates, notre choix s'est porté sur le Phényl dichlorophosphonique (PDCP), qui nous a semblé le plus adapté pour introduire le motif « **P=O** » en plus de sa grande réactivité.

### 2-Propriétés physiques et chimiques

Le Phényl dichlorophosphonique (Tableau 2) est un liquide incolore transparent légèrement volatile, d'odeur piquante et fumante. Stable dans les conditions recommandées de stockage, né dans des conditions normales de traitement. La décomposition par la chaleur peut provoquer le dégagement de gaz et de vapeurs irritantes des oxydants forts.

**Tableau 2. Propriétés physiques et chimiques de PDCP.**

<b>Formule moléculaire</b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>OP</b>
<b>Masse moléculaire</b>	194,99
<b>Formule structurelle</b>	
<b>Point de fusion</b>	3°C
<b>Point d'ébullition</b>	258°C
<b>Densité (d)</b>	1.393
<b>Densité de vapeur</b>	6.7
<b>Solubilité</b>	Eau

### 3-Réactivité de Phényl dichlorophosphonique

#### 3-1- Avec les amines

La combinaison de l'amine sur le PDCP permet l'accès aux composés de type phosphoramidates (Yangl *et al.*, 1998) (Figure 3).

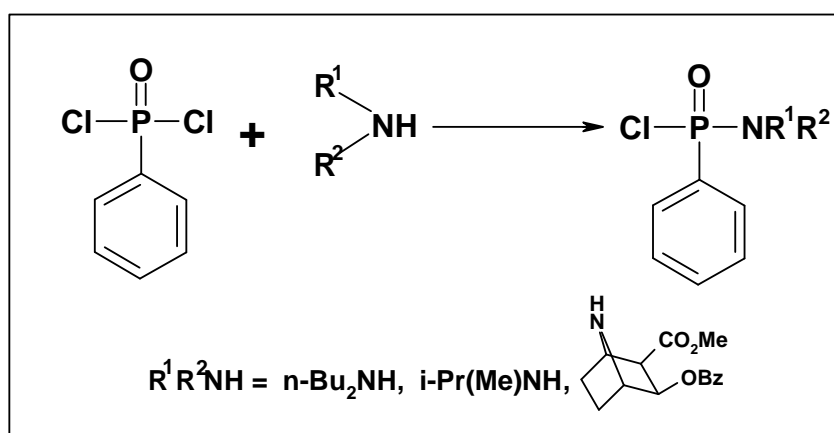


Figure 3. Réactivité de PDCP avec les amines.

#### 3-2- Avec les amino alcools

Le 1,3,2 oxozaphosphorino [4,3-a] a été synthétisé par la réaction homocalycotomine (1) avec les dérivés appropriés de dichlorophosphore. L'hétérocycle a été obtenu sous forme de deux isomères (1') et (1'') (Fulop *et al.*, 2000) (Figure 4).

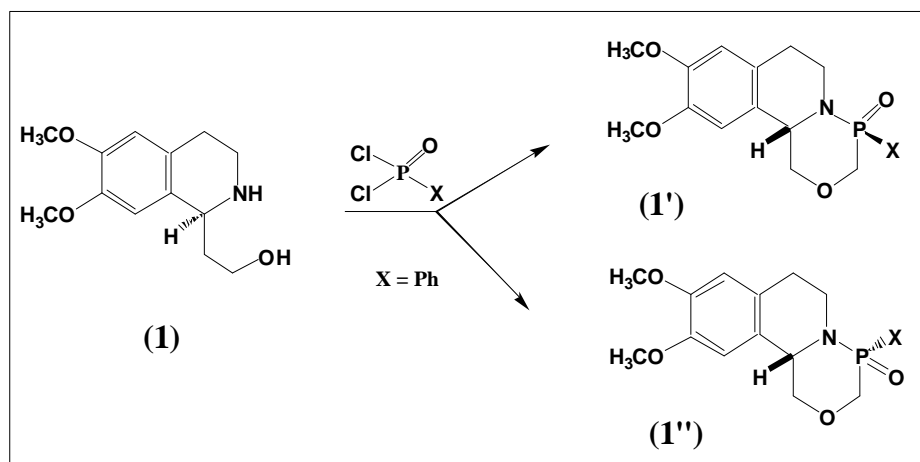


Figure 4. Réactivité de PDCP avec les amino alcools.

### 3-3- Avec les aminoesters

Une liaison P-N se forme par substitution nucléophile du chlore par l'ainoester (Mehellou *et al.*, 2007) en milieu triéthylamine (Figure 5).

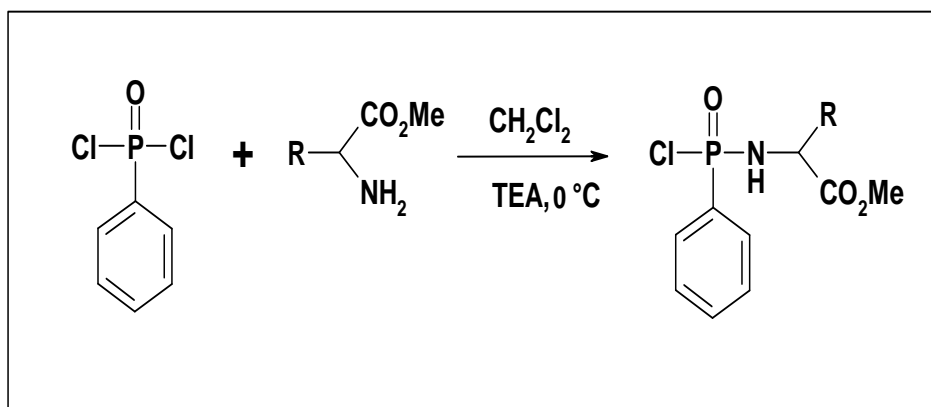


Figure 5. Réactivité de PDCP avec les aminoesters

### 3-4- Avec les diamines

La condensation de diamines avec le Phényl dichlorophosphonique en présence de triméthylamine en excès donne des composés hétérocycliques contenant le motif phosphoryle (Phényl Diazaphospholidine oxydes) (Tye *et al.*, 2002) (Figure 6).

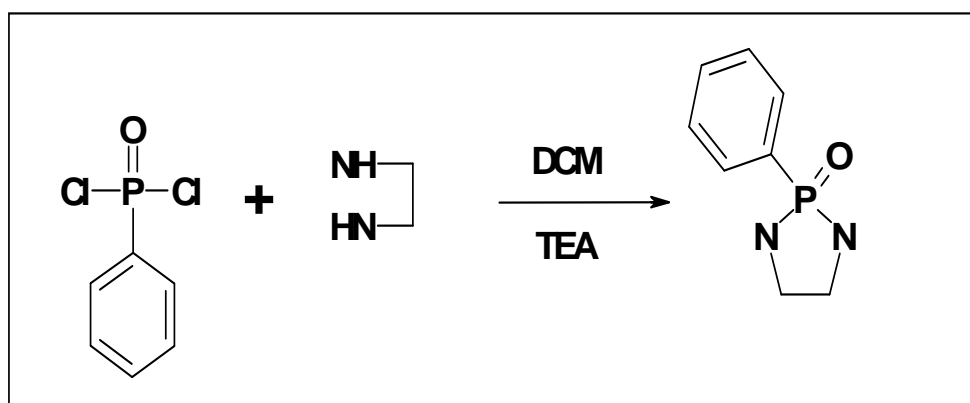


Figure 6. Réactivité de PDCP avec les diamines.

#### 4- Synthèse des Phényl phosphoramidates

Au cours de ces dernières années, la synthèse de nouveaux composés spécifiques potentiellement actifs et contenant des fonctions caractéristiques s'est développée et a connu un essor important. L'introduction du groupement phosphoryle (P=O) peut être apportée par plusieurs réactifs, notre choix s'est porté sur le phényl dichlorophosphonique (PDCP) (Yikang *et al.*, 2000) pour sa disponibilité d'une part et sa réactivité d'autre part.

Les produits précurseurs ; amines primaires présentent un site nucléophile (NH<sub>2</sub>), cette réactivité est mis a profit dans la réaction de phosphorylation. Les Phényl phosphoramidates PA-A et PA-B ont été préparé par réaction d'une amine primaire (cyclohexylamine et benzylamine) avec le phényl dichlorophosphonique en une seul étape dans l'acetonitrile comme solvant à -5°C pendant 12 h. Ces composés phosphorés ont été purifiés sur colonne de gel de silice éluée au CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9/1) (Figure 7).

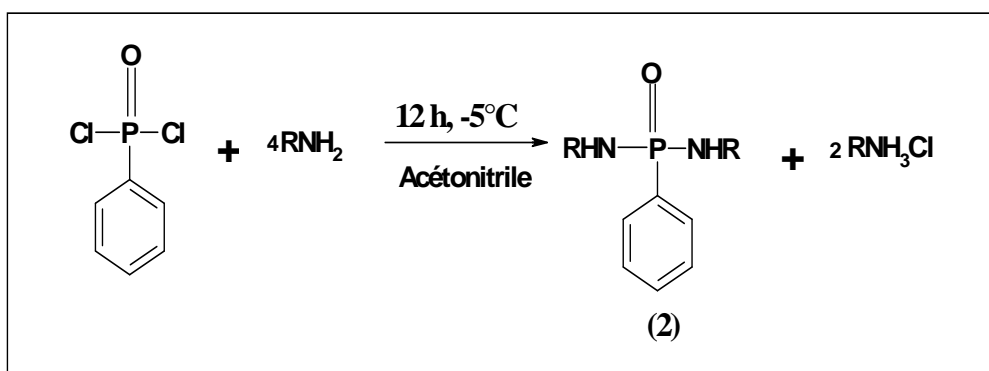


Figure 7. Synthèse des Phényl phosphoramidates.

#### 4-1- Caractéristiques physico-chimiques

Les phosphoramidates (PA-A et PA-B) se présentent sous forme d'une poudre blanche avec des rendements élevés. Leurs points de fusion compris entre (154-162°C). Ces composés sont solubles dans différents solvants polaires révélés au bleu de Molybdène et visible en UV (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des phényl phosphoramidates.

<i>Réf</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>Formule Brute</i>	<i>F°C</i>	<i>Rdt%</i>
PA-A	Cyclohexylamine	320	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> OP	159	89
PA-B	Benzylamine	336	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OP	154.5	91

#### 4-2- Etude structurale

Les structures des composés préparés ont été parfaitement élucidées par les méthodes spectroscopiques usuelles: infrarouge, résonance magnétique nucléaire du proton, du phosphore et C<sup>13</sup>.

- **En RMN  $^1\text{H}$**  : La formation de phosphoramidates est confirmée par l'apparition d'un signal du  $\text{NH-P=O}$  vers (2.40-3) ppm sous forme d'un singulet, le Phényle porté par le phosphore apparaît entre 7 et 8 ppm sous forme de multiplet et d'autres signaux correspondant au reste des protons des amines.
  
- **En infrarouge** : on remarque une bande d'absorption vers (1107.1-1253.6)  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison (**P=O**). La bande de groupement (**NH**) et (**C-N-P**) apparaissent respectivement vers (3155.3-3209.3)  $\text{cm}^{-1}$  et (1118.6-1029.9)  $\text{cm}^{-1}$ .

## **Protocoles expérimentaux de synthèse**

### **1- Techniques utilisées**

#### **1-1- La chromatographie**

C'est une technique de séparation très puissante qui permet de travailler sur des quantités allant jusqu'au microgramme ( $\mu\text{g}$ ). Les séparations chromatographiques sont basées sur les propriétés physiques des molécules « volatilité, solubilité et adsorption ». Les mélanges des substances à séparer sont placés dans des conditions dynamiques dans lesquelles deux de précédentes propriétés peuvent se manifester.

#### **1-1-2- La chromatographie sur colonne**

Cette technique de chromatographie solide-liquide est de type préparatif. Elle permet la séparation des quantités de substances qui peuvent varier de 500mg à plusieurs grammes, le tout dépend du diamètre de la colonne et de la quantité d'adsorbant.

Dans un premier temps, on remplit la colonne de la phase solide adsorbante imprégnée d'un solvant, le niveau du liquide dans la colonne est abaissé au sommet de l'adsorbant (on utilise souvent 20-30 g de silice pour 1 g de produit). L'échantillon à fractionner est dissout dans un minimum de solvant (celui qui est déjà utilisé) ; on le dépose au sommet de la colonne pour subir l'élution. Le solvant est ajouté à la colonne pour développer la séparation. L'effluent est récupéré sous forme de plusieurs fractions qui sont analysées par CCM. Les fractions de l'effluent contenant les mêmes substances sont conditionnées et isolées par évaporation du solvant. Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été effectuées avec de la silice Merck 60 H (Art.9385).

## **1-2- L'extraction**

L'extraction est une méthode de purification qui consiste à isoler une substance d'un solide à l'état pur, ou d'une solution par contact avec un solvant qui dissout sélectivement le produit désiré ; la séparation s'effectue dans une ampoule à décanter qui permet la séparation des phases organiques et aqueuses avec un minimum de perte.

## **1-3- La distillation**

C'est la principale méthode de séparation et de purification des liquides. Elle consiste à évaporer le liquide par chauffage, condenser les vapeurs obtenues et récupérer le condensat.

## **1-4- Résonance magnétique RMN**

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés à température ambiante sur un appareil : AC 200 BRUKER, AC 250 BRUKER. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au signal  $\text{CDCl}_3$  fixé à 7.24 ppm ou  $\text{DMSO-d}_6$  fixé à 2.49 ppm. La multiplicité des signaux est indiquée par une ou plusieurs lettre(s) minuscule(s) : S (singlets), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé), m (massif) les constantes de couplage J sont exprimées Hertz (Hz).

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer FT-1600. Les points de fusion non corrigés ont été déterminés en capillaire sur un appareil Electrothermal BÜCHI 510.

Les produits ont été relevés par pulvérisation de la ninhydrine à 5% dans l'alcool éthylique puis chauffage et à la lumière UV (245 nm) pour les composés comportant un ou plusieurs groupement(s) chromophore(s).

## 2- Préparation des phényl phosphoramidates

### 2-1- Mode opératoire général

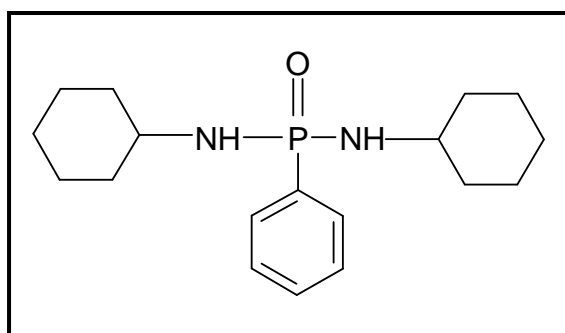
Dans un ballon de 250 ml sous agitation magnétique, est placé dans l'acétonitrile anhydre, 1 équivalent de phényl dichlorophosphonique. A l'aide d'une ampoule à brome surmontée d'une garde à  $\text{CaCl}_2$ , on additionne, goutte à goutte, 4 équivalents d'une amine primaire dans le même solvant à  $0^\circ\text{C}$ . Le mélange réactionnel est laissé sous agitation magnétique pendant 12 heures.

L'évolution de la réaction est suivie par CCM, qui montre la formation d'un produit moins polaire, soluble dans les solvants polaires, révélé par pulvérisation au Molybdène par une tache bleue, le produit il est révélé aussi à la ninhydrine.

### 2-2- Traitement

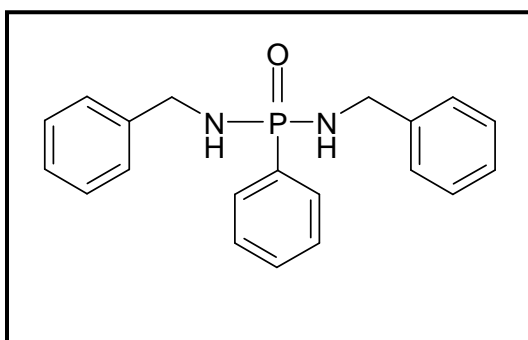
Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est dilué dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , lavé par l'eau distillée puis séché sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentré sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, élué au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (9/1).

#### ❖ N, N'-cyclohexylamine phosphoramidates



- **IR (KBr.  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ):** 1180.4  $\text{cm}^{-1}$  (**P=O**), 3155.3  $\text{cm}^{-1}$  (**NH**), 1461.9  $\text{cm}^{-1}$  (**C=C<sub>Ar</sub>**), 1110.9  $\text{cm}^{-1}$  (**C-N-P**).
- **RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm):** 7.90 (m, 2H, **H-Ar**); 7.50 (m, 3H, **H-Ar**); 3.15 (m, 2H, **CH-cyc**); 2.40 (d, 2H, **NH-P=O**); 1.90 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-cyc**); 1.65 (m, 4H, **CH<sub>2</sub>-cyc**); 1.15 (m, 12H, **CH<sub>2</sub> cycl**).

❖ **N, N' benzylamine phosphoramidates**



- **IR (KBr.  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ ):** 1253.6  $\text{cm}^{-1}$  (**P=O**), 3163  $\text{cm}^{-1}$  (**NH**), 1461.9  $\text{cm}^{-1}$  (**C=C<sub>Ar</sub>**), 1118.6  $\text{cm}^{-1}$  (**C-N-P**).
- **RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm):** 7.9 (m, 2H, **H-Ar**); 7.5 (m, 3H, **H-Ar**); 7.25 (m, 10H, **H-Ar**); 4.15 (2d, 4H, **CH<sub>2</sub>-N**); 3.0 (m, 2H, **NH-P=O**).

## Etude bibliographique sur les protistes ciliés

### 1- Rappel sur la biodiversité microbienne

Un des aspects les plus fascinants et les plus attrayants du monde microbien est son extraordinaire diversité avec ces trois domaines d'êtres vivants : Bacteria, Archea et Eucarya.

Le domaine Bacteria comprend un règne : le règne des Eubactéries (les vraies bactéries).

Le domaine Archea (du grec *arkhaios*, ancien) comprend aussi un règne: le règne des Archaeobactéries (les bactéries anciennes).

Le domaine Eucarya comprend quatre règnes qui incluent: les champignons, les algues, les protozoaires etqz tous les autres règnes.

Les Archaeobactéries, les Bactéries et les Eucaryotes d'aujourd'hui sont tous le produit de milliards d'années de sélection naturelle et tous hautement adaptés à l'environnement actuel et aucun d'entre eux n'est « primitif ».

#### 1-1- Rappel sur les protistes

En systématique, selon la classification classique, le terme Protiste (du grec *Protos* = premier) désigne l'un des règnes du vivant regroupant tous les êtres vivants mobiles et unicellulaires.

Le règne des Protistes se divise généralement en deux parties: les Protozoaires et les Protophytes.

Les Protozoaires sont des organismes unicellulaires, formant une entité paraphylétique, ils possèdent une cellule Eucaryote (c'est à dire possédant un vrai noyau, contrairement aux Bactéries, dites Procaryotes), très différenciée qui remplit de nombreuses fonctions nécessaires à la vie et comportant des organites complexes : "vacuoles pulsatiles", "cils", "flagelles" (Patterson, 1999).

On leur distingue cinq sous-embranchements (Adl *et al.*, 2005):

- Les **Actinopodes** qui émettent de fins pseudopodes rayonnants.
- Les **Cnidosporidies** sont des parasites dont le stade initial est un germe amiboïde et le stade final une spore pourvue d'un filament évaginable.

- Les **Rhizoflagellés** qui comprennent les rhizopodes et les flagellés.
- Les **Sporozoaires** (ou **Apicomplexes**) sont dépourvus à l'état adulte d'appareil locomoteur. Ce sont des parasites des cellules animales pourvus d'un complexe apical et se reproduisant par sporogonie.
- Les **Infusoaires** ou **Infusoires** sont des Protistes de grande taille (jusqu'à 300  $\mu\text{m}$  pour la paramécie). Ils sont munis d'un **macronucléus** et d'un **micronucléus**. On y distingue:

\*Les **Holotriches** (paramécie).

\*Les **Spirotriches** ayant une ciliature buccale en spirale à droite (Stylonichia).

\*Les **Péritriches** ayant une ciliature buccale en spirale à gauche (vorticelle).

Les Protophytes sont des organismes végétaux unicellulaires ou à cellules peu différenciées.

## 1-2- Phylogénie des Protistes

Les relations évolutives entre les divers groupes de Protistes, et même la composition de ces derniers, sont toujours un sujet de controverse. Cependant, certaines propositions pour une phylogénie naturelle ont été faites fondées sur les séquences d'ARN<sub>r</sub> et d'autres techniques de biologie moléculaire (Purves *et al.*, 2000).

Pour la classification phylogénétique moderne, le règne des Protistes n'est plus pertinent. Certains Protistes sont rattachés aux Opisthocontes d'autres à la lignée des algues brunes (Straménopiles) ou à la lignée verte des algues et plantes terrestres (Chlorophyta). D'autres Protistes sont divisés en lignées monophylétiques qui pourraient avoir rang de règne. Enfin, la position d'autres Protistes aux affinités incertaines est encore en cours d'étude.

Au total les scientifiques reconnaissent aujourd'hui une soixantaine de lignées. De plus, en phylogénétique moderne (figure 8), végétal et animal deviennent des termes obsolètes (Cavalier Smith *et al.*, 2003).

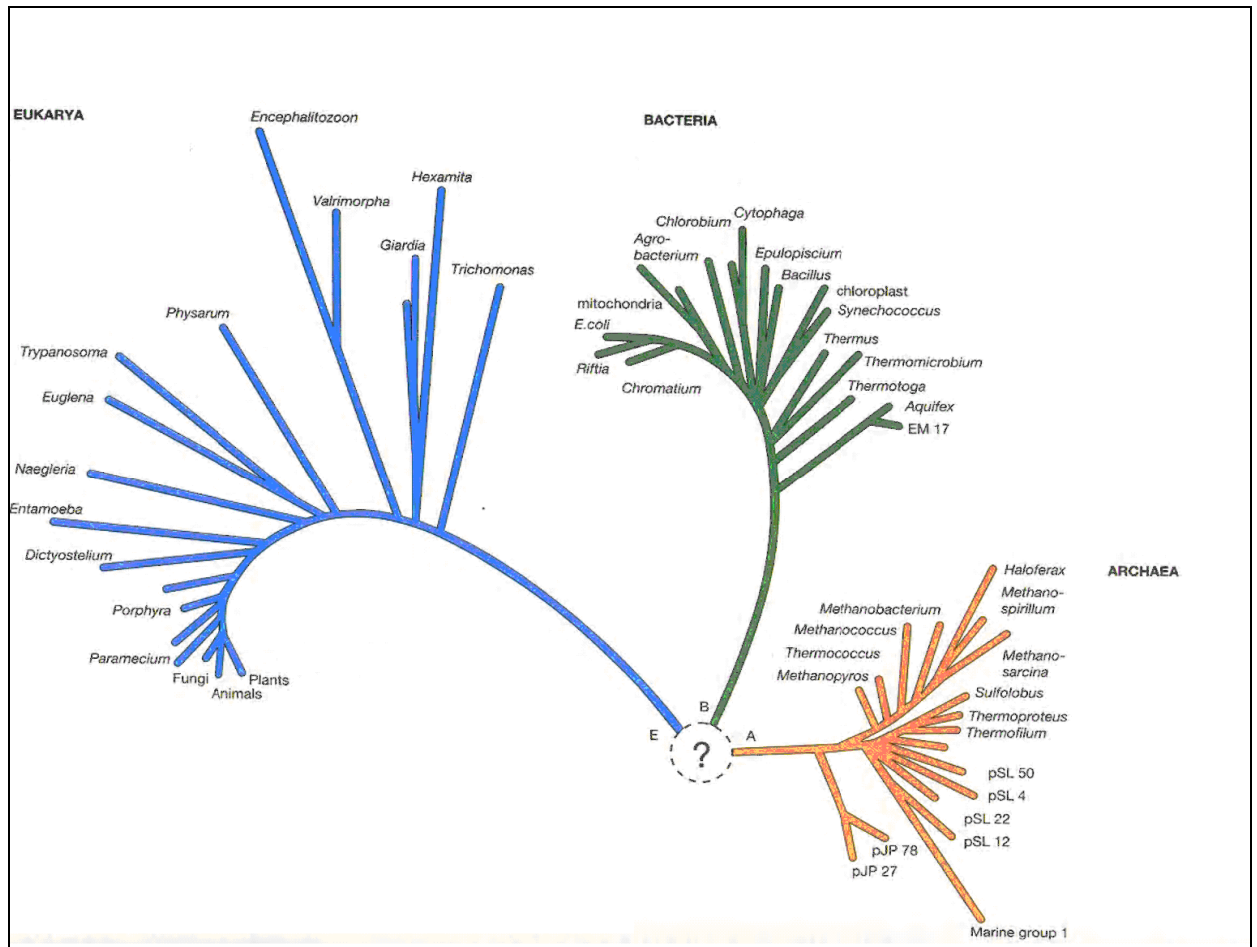


Figure 8. Position du genre *Paramecium* dans le système « Trois domaines » (Woese *et al.*, 2000).

### 1-3- Taxinomie

Les différentes espèces de paramécie ont été connues depuis plusieurs années, mais c'est en 1950 et grâce aux contributions de Fauré-Fremiet (1924) que le genre *Paramecium* doit sa position systématique en tant que cilié. Ses observations ont été confirmées par Corliss (1961) et Roque (1961).

D'après Müller, 1773 (Cudmore *et al.*, 1977), les paramécies appartiennent au :

Règne	: <i>Protista</i>
Embranchement	: <i>Ciliophora</i>
Classe	: <i>Oligohymenophora</i>
Ordre	: <i>Peniculida</i>

Famille : *Parameciidae*  
Genre : *Paramecium*

La systématique actuelle du genre *Paramecium*, après Corliss (1961) et Honigberg (1964), peut être établie comme suit :

Phylum : *Protozoa*  
Subphylum : *Ciliophora*  
Classe : *Ciliatea*  
Sous-classe : *Holotrichia*  
Ordre : *Hymenostomatida*  
Sous-ordre : *Peniculina*  
Famille : *Parameciidae*

*Paramecium caudatum*, espèce la plus courante et la mieux connue, de plus elle est largement utilisée comme matériel de recherche (Beaumont et Cassier, 1998).

## 2- Rappels sur la paramécie (*Paramecium sp.*)

Les paramécies sont des organismes unicellulaires (Protozoaires), de forme oblongue, dont le corps uniformément couvert de cils (ciliés, holotriches) est fréquemment visible à l'œil nu; en effet, leurs dimensions sont, selon les espèces prises en considération, comprises entre 70 et 350 $\mu$ .

Les représentants du genre *Paramecium* sont parmi les plus fréquentes des Protozoaires. Ils sont très abondants dans les eaux contenant des débris végétaux ou dans les infusions de foin (infusoires) car les bactéries dont ils se nourrissent pullulent à la surface des végétaux en décomposition. Le genre *Paramecium* inclut environ 15 espèces, actuellement enregistrées, mais moins de 10 peuvent être considérés comme *Paramecium* vrai.

En 1928, Wenrich définit les caractéristiques de 8 espèces en termes précis : *P. aurelia*, *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum*, *P. bursarja*, *P. calkinsj*, *P. polycaryum*, *P. woodruffi* et *P. trichium*.

Kahl (1935) a ajouté la description de : *P. traunsteineri*, *P. nephridjatum*, *P. chilodonides*, *P. glaucum*, *P. putrjnum*, *P. chlorelligerum*, *P. pyriforme* et *P. pseudoputrinum*.

Wichterman (1953) a fait une étude critique détaillée des 16 espèces, mais 2 espèces enregistrées avant par Kahl (1935) (*P. glaucum* et *P. pyriforme*) non pas été étudiées pendant que 2 autres espèces (*P. duboscquj* et *P. ficarium*) ont été mentionnées. Selon cet auteur, seules les 8 espèces décrites par Wenrich sont bien définies et appartiennent à 2 groupes :

- Groupe *Aurelia* (3 espèces) : *P. caudatum* 290 microns  
*P. aurelia* 170 microns  
*P. mutlimicronucleatum* 310 microns
- Groupe *Bursaria* (5 espèces) : *P. bursaria* 150 microns  
: *P. trichium* 70 microns  
: *P. calkinsi*  
: *P. polycaryum*  
: *P. woodruffi*

Pour chaque espèce il est possible de définir, en ce qui concerne la taille, un polygone de distribution spécifique et de mettre en évidence des différences géographiques ou d'origine nutritionnelle; ces dernières différences sont fugaces et non transmissibles. Les autres sont si mal définies qu'elles ne peuvent être considérées comme appartenant au genre *Paramecium*.

Quelques espèces ont été ajoutées au genre *Paramecium* et sont : *P. silesiacum*, *P. jenningsi*, *P. porculus*, *P. arcticum*, *P. africanum* et *P. pseudotrichium*. Ces espèces ont été établies sur la base des critères morphologiques qui sont les seuls qui peuvent être employés efficacement et facilement.

Par leur grande taille et l'extrême facilité de leur élevage, les paramécies constituent un matériel de choix pour l'étude morphologique, cytologique et cytochimique des protozoaires ciliés.

Leur cytoplasme limité par une mince cuticule présente une zone périphérique hyaline et visqueuse, cette cuticule est résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps de la paramécie, elle s'oppose à l'émission de pseudopodes. Après toute déformation, grâce à la présence de cette différenciation superficielle le corps de la paramécie reprend sa forme initiale (Beaumont et Cassier, 1998).

Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose. L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique.

La paramécie (figure 9) possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires :

- **Le macronucleus** : volumineux, polyploïde, ovoïde dont la fonction est indispensable à la survie de la cellule car il assure toutes les fonctions végétatives. Il se forme à chaque génération sexuelle par des réarrangements programmés de tout le génome germinale, qui aboutissent à des chromosomes redessinés pour l'expression des gènes.
- **Le micronucleus** : sphérique, de taille réduite, diploïde et souvent difficile à observer. Il subit la méiose et transmet l'information génétique à la génération sexuelle suivante (Cohen, 2007).

S'il existe un seul micronucleus chez *Paramecium caudatum*, *Paramecium aurelia* en possède deux.

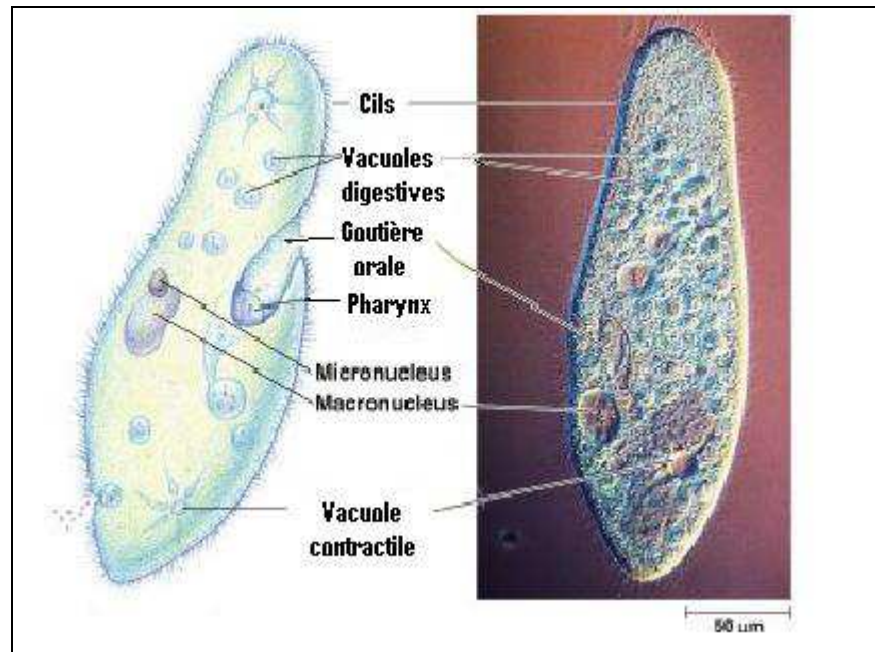


Figure 9. Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

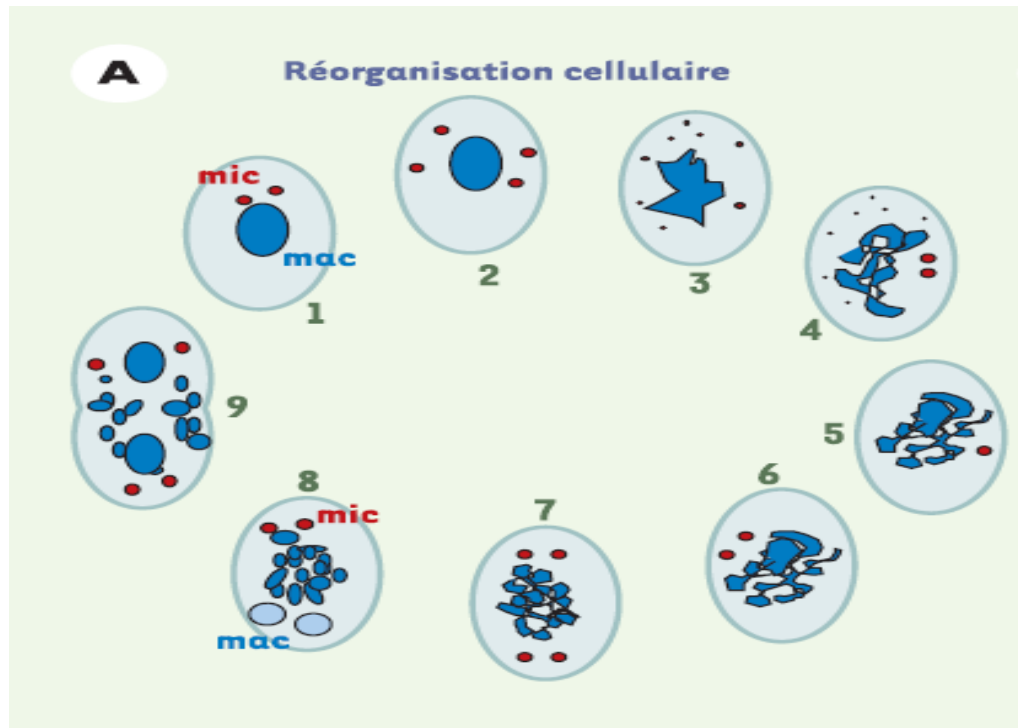
### 2-1- Mouvement

Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé. Une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle.

### 2-2- Reproduction

Les paramécies se reproduisent (figure 10) par :

- **Division cellulaire** : les micronucleus se divisant par mitose, le macronucleus se divisant simplement en deux micronucleus fils.
- **Conjugaison** : la conjugaison des paramécies est un processus sexuel de recombinaison génétique (des paramécies individuelles échangent un micronucleus pendant la recombinaison), mais ce n'est pas un processus de reproduction. Les deux mêmes cellules débutent et achèvent le processus et aucune nouvelle cellule n'est créée (Purves *et al.*, 2000).



**Figure 10. Cycle sexuel et réorganisation macronucléaire : Événements cellulaires**  
(Meyer *et al.*, 2005)

1. La paramécie en croissance végétative possède deux micronoyaux diploïdes (mic, en rouge) et un macronoyau (mac, en bleu) polyploïde (800 à 1 000 n). Des conditions de jeûne modéré induisent la réactivité sexuelle: en présence d'un partenaire de type sexuel complémentaire, la cellule conjuguera; sinon, elle subira l'autogamie. 2-3. Conjugaison et autogamie déclenchent la méiose des micronoyaux, aboutissant à 8 noyaux haploïdes dont 7 dégénèrent et un seul survit, tandis que le macronoyau entame un processus de fragmentation. 4. Le noyau haploïde survivant subit une mitose. 5. Dans le cas de l'autogamie, les produits de cette mitose fusionnent; dans le cas de la conjugaison, il y a échange réciproque de l'un des produits de cette mitose et fusion dans chaque conjugant pour donner un noyau zygotique diploïde. 6-7. Le noyau diploïde subit deux mitoses post-zygotiques. Le macronoyau a achevé sa fragmentation. 8. Les deux noyaux localisés au pôle postérieur de la cellule se différencient en macronoyaux. 9. À l'issue de ces processus sexuels, lors de la première division, les deux macronoyaux nouvellement formés sont répartis entre les deux cellules filles, tandis que les deux micronoyaux subissent chacun une mitose. Lors des divisions suivantes, le macronoyau se divise en même temps que les micronoyaux, tandis que les fragments de l'ancien macronoyau, qui ne répliquent plus leur ADN, sont répartis au hasard dans les cellules filles, et finalement dégradés.

### **2-3 Alimentation**

La paramécie possède un mécanisme d'alimentation permanent constitué par une cavité buccale (péristome) prolongée vers l'arrière : le vestibule; c'est une cavité tubulaire invaginée dans l'endoplasme (l'endoplasme contient les organites de la nutrition: le péristome et les vacuoles digestives) où les aliments sont collectés par la combinaison de l'action des cils couvrant le corps et les autres cils couvrant le vestibule, les paramécies se nourrissent des organismes comme les bactéries et autres protozoaires (Samworth et Morgan, 2000).

### **2-4- Respiration**

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (Wehner et Gehring, 1995).

### **2-5- Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie**

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé lors de l'invention du microscope au dix-septième siècle. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille, et la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle d'étude privilégié pour les scientifiques. Depuis 50 ans, une petite communauté de biologistes américains, européens et japonais l'utilise pour l'étude de l'organisation cellulaire et de l'hérédité, en particulier des phénomènes épigénétiques.

Des chercheurs du CNRS et du Génoscope ont réalisé le décryptage du génome somatique de la paramécie et découvert qu'il possède près de 40000 gènes, contre "seulement" 25000 pour l'homme. Ils ont ensuite démontré que ce patrimoine exceptionnel résultait d'au moins trois duplications successives de tout le génome.

Les duplications de génome sont des événements rares mais qui se sont produits de manière récurrente au cours de l'évolution des eucaryotes. Depuis longtemps, on postulait qu'elles pouvaient être à l'origine de transitions évolutives majeures, car le doublement du

nombre de gènes offre un large potentiel d'innovation, et donc d'adaptation des espèces (Cohen, 2007).

### 3- Justification du choix de *Paramecium sp.* comme modèle biologique

Afin d'être largement utilisables, les tests de toxicité doivent être simples, rapides, sensibles, répétables et peu chers (Giesy *et al.*, 1989). Les espèces utilisées lors de ces tests sont choisies afin de répondre au mieux à ces critères, qui se traduisent par les contraintes suivantes :

- Le taxon est présent, abondant et facilement identifiable (Marchese *et al.*, 1996) ;
- Sa distribution géographique est large (Bennett *et al.*, 1992) ;
- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala *et al.*, 1999) ;
- Sa culture et sa manipulation sont simples (Taylor *et al.*, 1991) ;
- Son habitat naturel correspond au compartiment aquatique testé (Taylor *et al.*, 1991) ;
- Il est sensible au produit testé (Mc Pherson *et al.*, 2000) ;
- Il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit et éventuellement sa bioaccumulation (Chapman, 2001).

*Paramecium sp.* est l'une parmi de nombreuses espèces qui soit susceptibles de satisfaire au moins partiellement ces critères. En effet, cette espèce eucaryote unicellulaire est, d'une part, facile à cultiver, sa taille permet de suivre, à faible grossissement, cycle cellulaire, conjugaison, comportement, sécrétion et morphogenèse, et de cribler visuellement des mutations touchant une gamme de fonctions cellulaires. Plusieurs particularités biologiques en facilitent l'étude biochimique. D'autre part, le processus d'autogamie, qui produit des clones 100% homozygotes et simplifie l'analyse toxicologique. L'ensemble de ces données expérimentales nous ont donc conduits à choisir *Paramecium sp.* comme modèle d'étude.

### Outils d'évaluation en écotoxicologie

L'évaluation de la toxicité d'un xénobiotique au sein d'un écosystème aquatique est complexe. Cette démarche suppose une approche intégrative de différents paramètres. En effet, la seule présence d'un xénobiotique dans un système écologique donné ne constitue pas, en soi, un élément suffisamment pertinent pour en déduire un risque pour les biocénoses. Des liens doivent être établis entre les niveaux externes d'exposition (mesures chimiques de la présence du contaminant dans l'écosystème), les niveaux internes de contamination tissulaire (sa bioaccumulation dans les organismes) et les effets biologiques induits. Ainsi, l'exposition, le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes aquatiques nécessitent une étude écotoxicologique multiparamétrique (Forbes *et al.*, 2006).

Contrairement au domaine de la toxicologie humaine, l'unité biologique visant à être préservée en écotoxicologie n'est pas l'individu mais la population. Cependant, les effets préjudiciables au niveau des populations exposées sont souvent difficiles à détecter. En effet, la plupart des effets induits à ce niveau d'organisation biologique ne tendent à se manifester que dans des situations d'exposition extrêmes (durées d'exposition importantes et/ou concentrations élevées). Ainsi, quand l'effet devient finalement identifiable au niveau populationnel, le processus toxicologique peut avoir pris des proportions telles que le point au-delà duquel des actions de remédiation ou de réduction du risque sont encore possibles a sans doute été dépassé (McCarthy, 1990).

Ainsi, dans le contexte environnemental, les biomarqueurs offrent l'avantage d'être des indicateurs sensibles démontrant que le contaminant a été internalisé par l'organisme, a été distribué dans les différents tissus et a induit des effets toxiques au niveau de cibles spécifiques (McCarthy et Shugart, 1990).

Dans le but d'aborder au mieux cette étude, il nous a paru pertinent d'explorer divers systèmes enzymatiques de biotransformation des xénobiotiques qui sont des biomarqueurs de choix car ils sont induits par de nombreuses classes de composés. Ils ont été largement explorés chez les cellules animales au cours de ces dernières années.

Leur fonctionnement est donc abondamment décrit dans la littérature et nous en rappellerons les grandes lignes. Par contre, ces systèmes ont encore été très peu explorés chez les protistes ciliés particulièrement *Paramecium sp.* largement utilisé comme modèle alternatif dans les tests toxicologiques et comme bio indicateur de pollution. Cette problématique s'intègre dans la thématique développée par le Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et représente donc une alternative intéressante, que nous avons cherché à développer dans notre étude.

## **1– Les biomarqueurs : notions et concepts**

### **1-1- Définition et rôle(s) biologique(s)**

Différentes définitions ont été données au terme "biomarqueur". Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique (WHO, 1993).

La définition ayant été retenue par Lagadic *et al.* (1997) est la suivante : un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental (Peakall, 1994).

A ce stade, il est important de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, ce que l'on considère comme biomarqueur consiste en une modification d'une structure ou encore en une variation anormale d'une activité biologique. Or, dans des conditions normales, toute structure ou activité biologique joue un rôle dans l'état d'homéostasie d'une cellule, d'un tissu, d'un organisme ou même d'une population. En ce sens, l'analyse de son rôle fonctionnel présente un intérêt important.

Ainsi, selon Depledge (1994), en deçà d'une certaine pression toxique (exposition à des concentrations et/ou des durées importantes), on considère que le métabolisme basal des

organismes suffit à assurer le maintien de leur homéostasie. En d'autres termes, le fonctionnement des différentes structures et activités biologiques "tamponne" l'action des polluants sur les individus lorsque celle-ci est relativement limitée. En effet, qu'elles soient spécifiquement impliquées dans la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures ou non, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxiques dans le milieu.

Néanmoins, au-delà d'un certain seuil (en termes de concentration du contaminant ou de temps de contact), les capacités de maintien de l'homéostasie peuvent être dépassées, ceci pouvant finalement mener à la manifestation d'effets néfastes à des niveaux hiérarchiques supérieurs. Ainsi, lorsque les capacités de compensation ne sont plus suffisantes pour limiter l'action des polluants toxiques, l'état de santé des individus contaminés peut évoluer vers une dégradation, réversible ou non selon le degré d'atteinte toxique.

### 1-2- Qualités requises

Un biomarqueur doit être un indicateur sensible de la biodisponibilité d'un polluant et de réponses biologiques précoces. De manière à évaluer objectivement les qualités des biomarqueurs, cinq critères sont généralement admis (Van Der Oost *et al.*, 2003):

- La technique analytique permettant de quantifier le biomarqueur doit être efficace (en termes de sensibilité, justesse et précision), d'un coût relativement peu élevé et facile à mettre en oeuvre ;
- La réponse doit être sensible pour constituer un paramètre d'alarme précoce ;
- Le niveau basal de la variable biologique doit être clairement identifié de manière à distinguer le bruit de fond naturel (variabilité naturelle) du niveau induit par la contamination (signal) ;
- Les mécanismes impliqués dans la relation entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant doivent être connus ou, tout au moins, supposés ;
- La signification toxicologique du biomarqueur (c'est-à-dire la relation entre sa réponse et un impact possible sur l'organisme) doit être établie.

## **2- Pistes de recherche retenues pour l'étude des xénobiotiques de synthèses**

Au regard de la synthèse bibliographique précédemment établie, certaines pistes d'études peuvent être dégagées. L'objet de cette section sera donc de décrire et de justifier les pistes retenues dans le cadre de notre travail. Nous présenterons pour cela chacune des différentes pistes de recherche du point de vue de leur application dans le domaine général de l'écotoxicologie.

### **2-1- Etude du stress oxydant**

Partant du principe que tous les xénobiotiques provoquent un stress oxydant au niveau des organismes exposés, il semble important de présenter de manière approfondie ce qu'est le stress oxydant et en quoi son étude peut être envisagée dans le cadre du présent travail.

#### **2-1-1- Le système antioxydant cellulaire**

Afin d'éliminer les espèces radicalaires et de limiter les dommages provoqués par le stress oxydant, les cellules disposent de trois mécanismes de défense antioxydant. On pourra ainsi citer : (i) l'élimination des espèces réactives et des catalyseurs de leur formation, (ii) l'induction de la synthèse d'antioxydants et (iii) l'augmentation de l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Une vue d'ensemble des mécanismes enzymatiques de défense qui contribuent à la détoxification des espèces réactives est proposée dans la figure (11). Ce schéma illustre la complexité des réactions qui coexistent au sein de la cellule lors d'un stress oxydant.

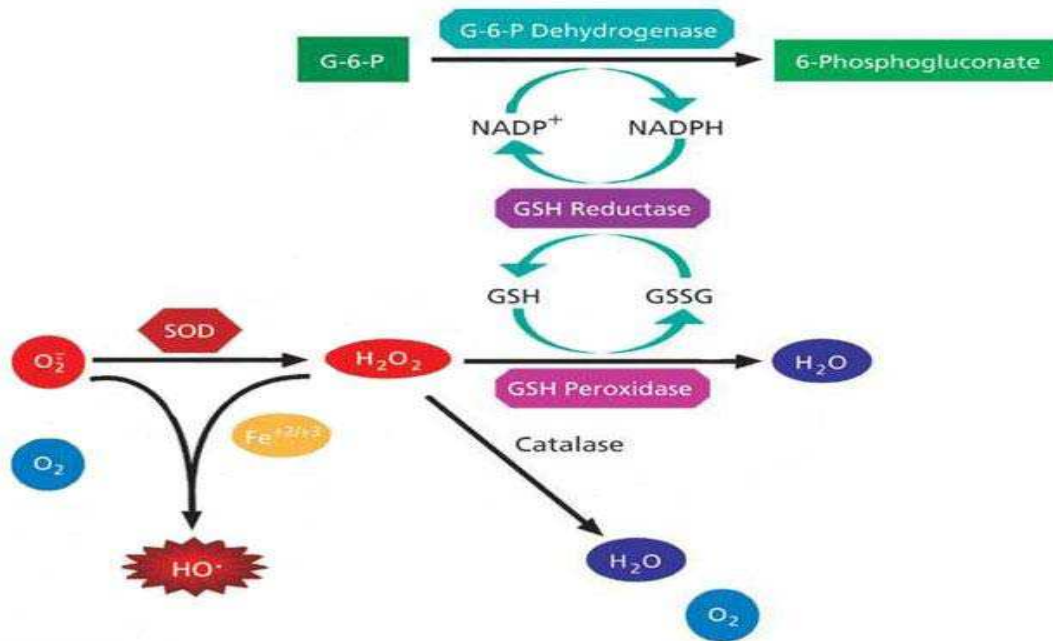


Figure 11. Systèmes enzymatiques impliqués dans la défense antioxydante cellulaire (Barillet, 2007).

### 2-1-2- L'étude du stress oxydant, son intérêt en écotoxicologie

Les caractères ubiquistes des processus oxydants et leur implication possible en tant que facteurs de toxicité ont suscité des recherches dans le domaine de l'écotoxicologie. La formation d'oxydants et le déficit en antioxydants étant des signes avant-coureurs potentiels de toxicité, ces paramètres constituent des indicateurs précoces d'une agression toxique, ce qui rejoint la définition précédemment donnée d'un biomarqueur. C'est ainsi que l'étude du stress oxydant et de ses implications toxicologiques chez les organismes aquatiques a été initiée il y a une vingtaine d'années, suite à la mise en évidence d'activités enzymatiques antioxydantes chez les poissons (Livingstone, 2001 ; Di Giulio *et al.*, 1989 ; Winston et Di Giulio, 1991 ; Cossu *et al.*, 1997).

L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse qui se traduit, en général, dans une première phase par une augmentation de l'activité des enzymes impliquées. L'induction d'activité est en général transitoire, relativement modérée et aspécifique. Ce phénomène traduit l'adaptation des organismes à un nouvel environnement. L'inhibition de certaines composantes des systèmes

antioxydants peut également survenir, en liaison avec l'altération de l'état des individus et la perte de l'homéostasie cellulaire. Ce phénomène d'inhibition est souvent associé à des effets de peroxydation lipidique qui constitue alors un indice de toxicité relatif à un état de non compensation des lésions cellulaires initiales. Il semble donc que le suivi de l'induction ou de l'inhibition des systèmes antioxydants en tant que biomarqueurs apparaît pertinent du fait qu'elles traduisent un état de souffrance cellulaire et de toxicité précoce.

La grande diversité des modèles animaux aquatiques, des types de polluants testés, des conditions d'exposition, et des organes étudiés rendent difficiles les comparaisons d'une étude à l'autre. Ainsi, divers scénarios (induction, inhibition ou absence d'effet) sont observés d'une étude à l'autre. Ces observations suggèrent que la mesure de ces paramètres donnera des informations sur la physiologie de l'organisme à un temps donné et pour des conditions d'expositions données. L'utilisation de ce type de paramètres en tant que biomarqueurs d'écotoxicité sera donc associée à un certain nombre de contraintes liées aux propriétés même des effets oxydants et des paramètres de défenses associés : durée de vie très courte des radicaux libres, action très localisée à un type de tissu ou à un organe, aspect transitoire de la réponse biochimique, systèmes de défenses multienzymatiques complexes (Otto et Moon, 1995; Bainy *et al.*, 1996; Paris-Palacios *et al.*, 2000).

La validation de biomarqueurs de stress oxydant nécessite donc, pour un organisme et un type de polluant donnés, d'identifier les organes cibles potentiels des toxiques et de caractériser la cinétique des réponses des paramètres biochimiques étudiés. De même, du fait de la complexité des systèmes antioxydants et de leurs nombreuses interactions au sein du métabolisme cellulaire, il est généralement nécessaire de mesurer plusieurs paramètres de la défense antioxydante pour pouvoir interpréter l'effet des polluants sur cette dernière.

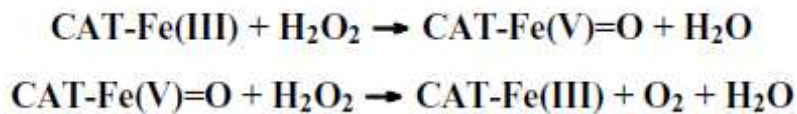
### **2-1-3- Biomarqueurs de stress oxydant retenus pour notre étude**

A la suite d'une étude bibliographique sur les biomarqueurs de stress oxydant, notre choix s'est porté sur le suivi de trois marqueurs de stress oxydant : l'activité de deux enzymes (catalase et glutathion S transférase) et la concentration d'une molécule clé du système antioxydant (le glutathion). Le choix d'une approche multiparamétrique dans le cas de l'étude du

stress oxydant a en effet été motivé par le fait que le système cellulaire de défense antioxydante est complexe et régi par de nombreuses interactions entre l'ensemble de ses éléments (figure 11).

### 2-1-3-1- L'activité catalase

La catalase est une enzyme présente chez tous les organismes aérobies. Chez les eucaryotes, elle est principalement située à l'intérieur des peroxysomes (corpuscules cytoplasmiques entourés d'une membrane simple). Ces derniers contiennent également des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène. La plupart des CAT sont formées de quatre sous-unités identiques contenant chacune un ion  $\text{Fe}^{3+}$  situé dans un noyau héminique (Pelmont, 1995). La CAT transforme le peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau moléculaires selon la réaction suivante :



### 2-1-3-2- L'activité glutathion S transférase

Les GSTs (Alpha, Bêta, Delta, Thêta, Mu, Pi, Sigma, Phi et Oméga) sont des enzymes qui catalysent la conjugaison d'un tripeptide, le glutathion réduit ( $\alpha$ -glutamyl-cystéinyglycine: GSH) à une multitude de substrats hydrophobes présentant un centre électrophile. Elles sont présentes aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes (Douglas, 1987).

Les GSTs peuvent détoxifier un large spectre de xénobiotiques initialement électrophiles ou devenus électrophiles après métabolisation. Ces composés peuvent être des herbicides ou des pesticides (thiocarbamates, organophosphates), des amines aromatiques, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo[*a*]pyrène -B[*a*]P-), des toxines (aflatoxine B1) ou des substances pharmaceutiques (paracétamol, nitroglycérine, bromosulfophthaléine).

Les GSTs catalysent de nombreuses réactions au cours desquelles le GSH (figure 12) sous la forme d'anion thiolate ( $\text{GS}^-$ ) joue le rôle d'un substrat nucléophile.

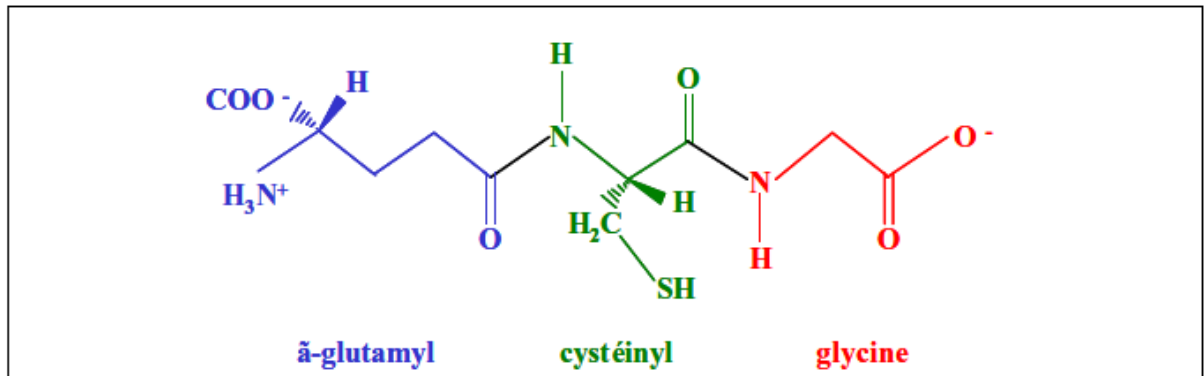
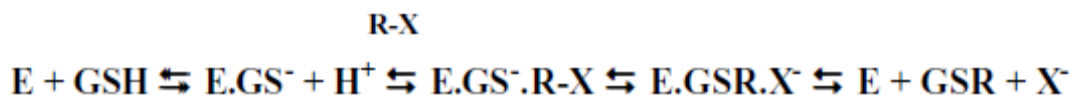


Figure 12. Glutathion réduit ou  $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine (d'après Armstrong, 1991).

La principale activité catalytique des GSTs est de faciliter la formation ou la stabilisation de l'anion thiolate. Celui-ci peut ensuite attaquer le centre électrophile (atome de carbone, d'oxygène, de soufre ou d'azote) d'un autre substrat (figure 13). Le composé en résultant est un conjugué thioéther (Beckett et Hayes, 1993). La réaction générale est la suivante (Armstrong, 1991):



E: enzyme.

R-X: substrat possédant un centre électrophile.

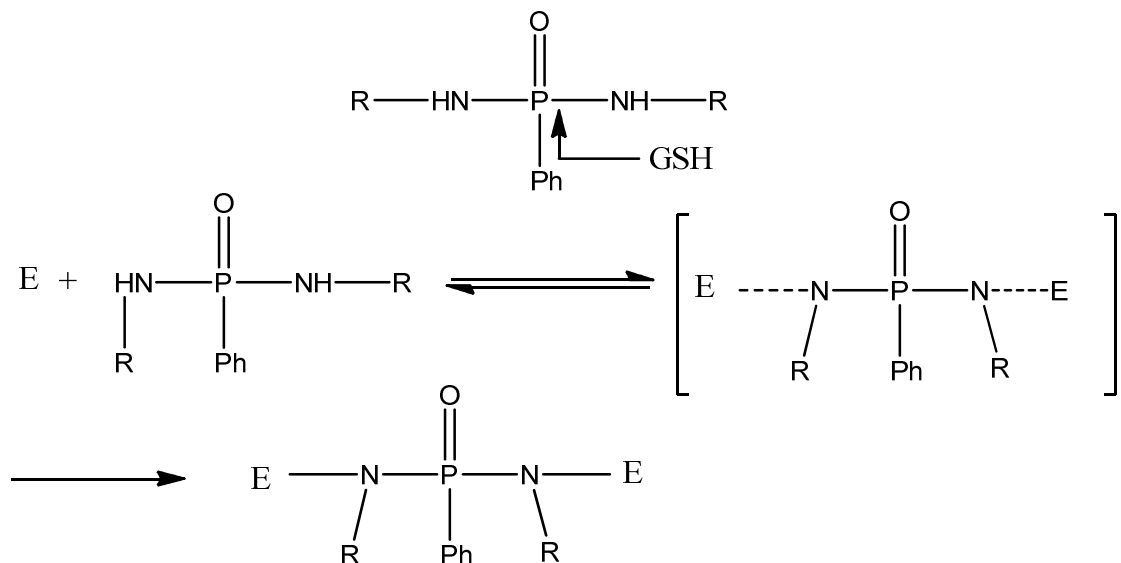


Figure 13. Les sites actifs des phosphoramidates vis-à-vis du GSH.

### **2-1-3-3- Le glutathion, un antioxydant non enzymatique**

Le glutathion est un tripeptide (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui représente l'un des antioxydants majeurs chez les vertébrés parmi les agents non enzymatiques du système antioxydant cellulaire. Le glutathion est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire.

En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, ce qui témoigne, là encore, de l'importance de la coopération entre les différents systèmes de défense anti-radicalaire. Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense anti radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase. L'étude de ce composé semble donc justifiée (Pompella *et al*; 2003).

## Matériels et méthodes

### 1- Technique d'isolement et d'identification de *Paramecium sp.*

#### 1-1- Technique d'isolement des paramécies

Des feuilles de laitue sont macérées puis infusées dans un récipient contenant de l'eau distillée. On laisse l'infusion dans un lieu tiède sombre et bien aéré. On filtre après quelques jours et on observe sans coloration les premiers flagellés, ces organismes se nourrissent aux dépens du voile bactérien. Cette culture va nous servir à isoler une seule paramécie à l'aide d'un capillaire sous stéréomicroscope (Leica DL 1000) afin de réaliser une culture pure.

Chaque cellule isolée séparément du filtrat est récupérée dans un tube eppendorf contenant 1 ml de milieu de repiquage préalablement bactérisé et laissée incuber pendant 24 h à 27°C. L'eppendorf ayant un nombre de cellules inférieur ou égale à 16 cellules est retenu pour l'étude (partant du principe qu'une paramécie effectue environ 4 divisions par 24 h donc 16 cellules).

#### 1-2- Décontamination des cellules

Les cellules choisies pour notre étude subissent une décontamination, à savoir une série de lavage de 15 min dans du Tris à 10 Mm pH 7.4. L'opération est répétée 5 fois.

Les cellules vivantes ainsi récupérées sontensemencées dans 1 ml de milieu de repiquage puis incubées à 14°C pour maintenir un stock de cellule avec des repiquages toutes les trois semaines.

#### 1-3- Identification de *Paramecium sp.*

Les principales clés d'identification des paramécies citées par Wichterman(1953) sont :

- la forme générale de la cellule (trapue ou allongée) ;
- le nombre de micronoyaux ;
- la forme du macronoyau.

L'observation microscopique (figure 14) nous a permis de :

- Calculer la taille de notre cellule à savoir 150 microns ;
- La présence de deux micronucleus ;
- Une forme générale fine et allongée.

Ces observations nous permettent de dire que notre cellule appartient au groupe Aurelia. La taille, la forme générale, ainsi que le nombre de micronucleus, nous permettent de conclure qu'il s'agit bien de *Paramecium aurelia*.



**Figure 14. *Paramecium aurelia* observée sous microscope photonique (x100).**

#### **1-4- Culture pure de *Paramecium aurelia***

Pour suivre pendant plusieurs jours la descendance d'une paramécie et réaliser sa courbe de croissance il est nécessaire de réaliser des cultures pures et de procéder à des repiquages périodiques.

Pour l'obtention de cultures pures de *Paramecium*, Wichterman (1953) recommande l'utilisation d'infusions de graminées ou de laitue, dans notre cas nous avons utilisé la laitue pour la préparation du milieu de repiquage (MR) selon la méthode de Beaumont et Cassier (1998), à savoir : Dissoudre 1.5 g de poudre de laitue dans 900 ml d'eau. Faire bouillir 20 min. Filtrer

l'infusion sur de la gaze (8 plis). Compléter à 1 L. Stériliser l'infusion filtrée 20 min à 120<sup>0</sup>c. Les flacons sont restérilisés à chaque ouverture.

Le milieu de repiquage est bactérisé avec une colonie bien individualisée de bactéries *Klebsiella pneumoniae* (V4R1). L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 24h, sans agitation, afin de permettre à la bactérie de pousser. Avant de mettre les paramécies en présence du milieu bactérisé, ajouter extemporanément du  $\beta$ -sitostérol (4 mg/ml dans l'éthanol à 100%), à une concentration finale de 0,8 mg/L (Laboratoire de Génétique Moléculaire. CNRS UMR 8541.Paris, France). Une fois que la culture de bactéries s'est bien développée, nous introduisons les paramécies.

## 2- Préparation des échantillons en vue des analyses biologiques

### 2-1- Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est le protiste cilié : *Paramecium aurelia*.

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 200 ml de culture pure de *Paramecium aurelia* (les tests sont répétés trois fois).

Les cultures sont disposées dans des erlen meyer stériles et bouchés avec de la gaze (figure 15), à une température de 30<sup>0</sup>c. La densité cellulaire est de 1000 cellules/ml correspondant à la phase exponentielle de la courbe de croissance de *Paramecium aurelia* atteinte au bout de 3 jours.

Avant chaque dosage, les cellules subissent une centrifugation douce pendant 15 min à 800 g (cette centrifugation permet de concentrer les cellules tout en les maintenant vivantes), grâce à un dispositif propre au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, le culot est bloqué pour éliminer le surnageant.

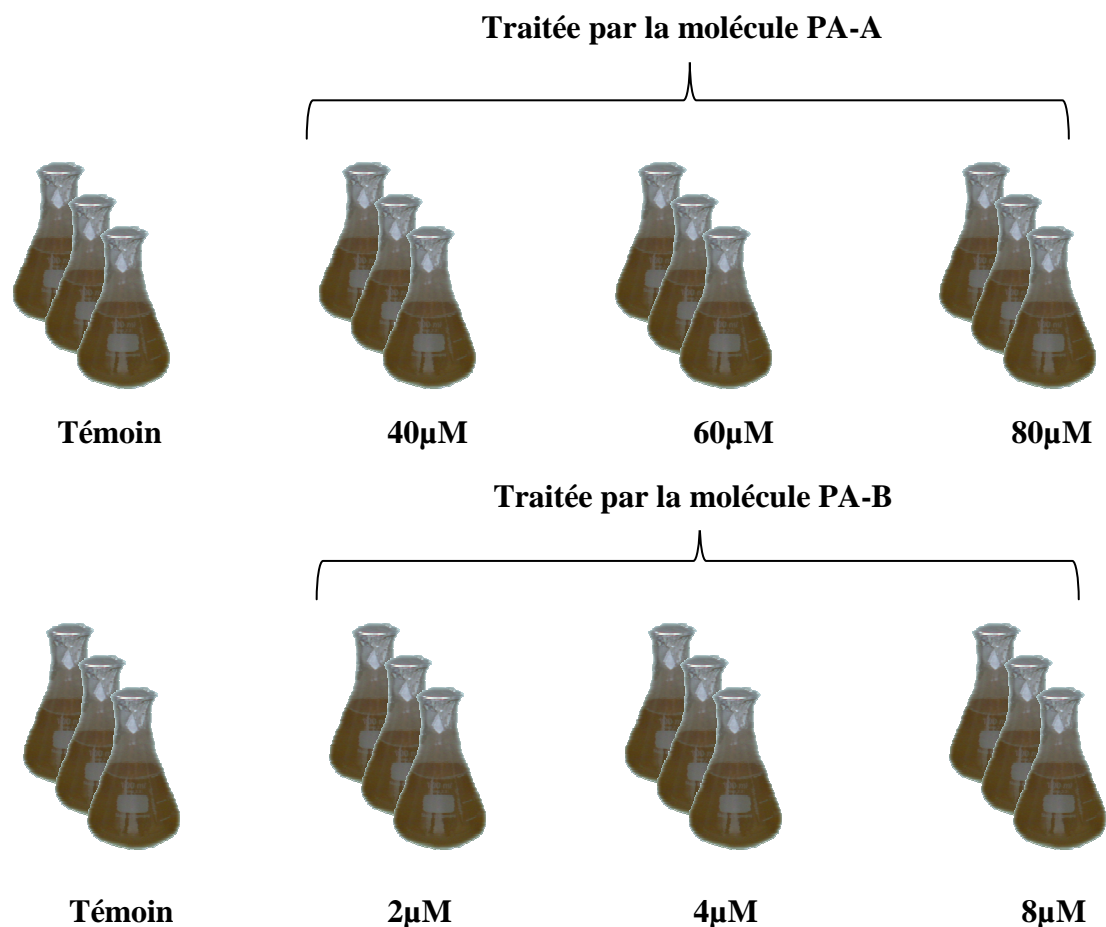


Figure 15. Tests de cytotoxicité des paramécies traitées par les molécules PA-A et PA-B.

## 2-2- Matériel chimique

Les xénobiotiques utilisés dans notre étude correspondent à 2 molécules chimiques de type : phosphoramidates dont la synthèse a été réalisée au niveau du laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, Université Badji Mokhtar de Annaba, dirigé par le Professeur Aouf N., avec la collaboration du Professeur BERREDJRM M. Ces deux molécules chimiques de synthèse ont été testées aux concentrations de: 40, 60 et 80  $\mu$ M pour la molécule PA-A, et 2, 4 et 8  $\mu$ M pour la molécule PA-B. Ces concentrations ont été retenues après plusieurs tests toxicologiques.

### 3- Protocoles expérimentaux mis en place

#### 3-1- Calcul du nombre de cellules

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Beisson *et al.* (2010). Il s'agit d'une méthode de comptages des cellules vivantes présentes dans chaque échantillon.

100 µl sont prélevés trois fois de chaque échantillon puis disposées dans des creusets (chaque creuset comporte trois cupules). Le comptage des cellules vivantes est réalisé sous microscope optique (Leïca DL 1000) à l'aide d'un compteur à main.

Le nombre de cellules vivantes correspond donc à la moyenne obtenue des trois répétitions.

#### 3-2- Calcul du nombre et du temps de génération

Le nombre ainsi que le temps de génération sont des paramètres qui permettent de confirmer la toxicité des xénobiotiques testés vis-à-vis des cellules. Le principe du calcul retenu dans le cadre de ce travail est celui détaillé par Dias *et al.* (2003) et ce après 24h de traitement.

La détermination du nombre de génération ( $n$ ), et le temps requis pour chaque génération ( $g$ ) est calculé suivant les équations (1) et (2) :

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\text{Log}2} \quad (1)$$

$$g = \frac{T_{24H}}{n} \quad (2)$$

Où :

$N_1$  : Nombre de cellule à 24h ;

$N_0$  : Nombre de cellule à  $T_0$ .

$T_{24h}$  : Temps de croissance= 24h

### 3-3- Calcul du taux de croissance cellulaire

La croissance cellulaire décrite par Suarez *et al.* (2010) est un paramètre qui permet de déterminer l'effet toxique des différentes concentrations d'un xénobiotique utilisé à un temps déterminé. Dans notre étude nous avons choisi le temps de 24h pour déterminer le taux de croissance cellulaire, car au-delà de ce temps, le nombre de cellules traitées par les différentes concentrations des deux xénobiotiques décroît considérablement.

Le taux de croissance cellulaire ( $\mu$ ), est obtenu à partir de l'équation suivante :

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln 2(t - t_0)}$$

Où  $t_0$  et  $t$  sont le temps initial et final de la période de croissance exponentielle, qui est exprimée en jour (j). Et  $N_0$  et  $N$  sont le nombre de cellules comptées par millilitres.

### 3-4- Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis de l'insecticide. Les valeurs positives de pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong *et al.*, 1999).

Le pourcentage de réponse est basé sur l'équation suivante :

$$\% \text{ Réponse} = 100 \frac{N_C - N_E}{N_C}$$

Où :

$N_C$  : Nombre des cellules témoins.

$N_E$  : Nombre final des cellules traitées.

### 3-5- Dosage de la charge protéique

#### 3-5-1- Principe de dosage des protéines totales

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Bradford (1976). IL s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines (la forme anionique est en effet stabilisée par des interactions hydrophobiques et ioniques, ce colorant réagissant avec des restes de l'arginine et en moindre importance avec de l'histidine, la lysine, la tyrosine, la trypsine et la phénylalanine). Par conséquent, il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

#### 3-5-2- Protocole expérimental

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéine standard : la BSA (albumine de sérum bovin). Cette gamme comprend 5 points : 0, 50, 100, 200 et 400 mg/L. Elle est préparée dans un tampon phosphate à 100 mM pH 7,8 dont la préparation est réalisée à partir de deux solutions : une solution A de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  à 26,8 g/L et une solution B de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 13,6 g/L (l'ajustement de la solution A à pH 7,8 se faisant à l'aide de la solution B).

Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon.

On dépose alors 1 ml de blanc (eau distillée), ou d'échantillon dans chaque tube à analyser. Ces derniers sont soniqués. Deux cent microlitres de réactif de Bradford sont ensuite ajoutés avant de procéder à une agitation de quelques secondes des tubes ainsi préparée. S'en suit alors une incubation de 20 à 30 min à température ambiante (la coloration restant stable environ 1h). A l'issue de cette incubation, les tubes brièvement agités subissent une lecture de l'absorbance à 595 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6305, U.V. et Visible).

### 3-6- Dosage du taux de glutathion total (GSH)

#### 3-6-1- Principe du dosage

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

#### 3-5-2- Protocole expérimental

- Mettre 3ml de milieu de cultures individuellement (témoins et traités) en présence de 1ml d'EDTA à 0,02M.
- Broyer les échantillons aux ultrasons (SONICS, VCX 130PB) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Vortexer et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours pendant 5minutes.
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6305, U.V. et Visible).

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

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg}} (\mu\text{M} / \text{mg})$$

*I* : Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.

*1,525* : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).

*13100* : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à 412 nm).

*0,8* : Le volume de l'homogénat.

*0,5* : Le volume du surnageant.

### **3-7- Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)**

#### **3-7-1- Principe du dosage**

La mesure de l'activité de la GST consiste à fournir à l'enzyme un substrat (en général du chlorodinitrobenzène (CDNB), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de la GST et du 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 340 nm. Il est possible de quantifier cette absorption au moyen d'un spectrophotomètre chaque minute pendant 5 minutes. La valeur de la DO mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST (Habig *et al.*, 1974).

#### **3-7-2- Protocole expérimental**

- Mettre 3ml de milieux de cultures individuellement (témoins et traités) en présence d'1ml de tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 6) ;
- Broyer les échantillons aux ultrasons (SONICS, VCX 130PB) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons ;
- Centrifuger l'homogénat à 4000tours pendant 30 minutes ;
- Prélever 0.2ml du surnageant auquel on ajoute 1,2ml du mélange : CDNB (1mM), GSH (5mM), Tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 7).
- Mesurer les DO à 340 nm toutes les minutes pendant 5 minutes (Spectrophotomètre JENWAY 6305, U.V. et Visible).

La concentration de la GST est obtenue après application de la formule suivante :

$$GST = \frac{A \times V}{e \times d \times v \times mg} (\mu M / mn / mg)$$

*A* : Absorbance.

*V* : Volume totale de la cuve = 1400µl.

*e* : Coefficient d'extinction moléculaire du CDNB = 9,6m/M.cm.

*d* : Epaisseur de la cuve = 1cm.

*v* : Volume du surnageant = 200µl.

### 3-8- Mesure de l'activité catalase (CAT)

#### 3-8-1- Principe du dosage

La catalase est dosée par la méthode spectrophotométrique décrite par Boscoloa (2003). Il s'agit de mesurer la chute d'absorbance liée à la disparition du peroxyde d'hydrogène, le substrat de l'enzyme.

#### 3-8-2- Protocole expérimental

La mesure de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de La décroissance de l'absorbance enregistrée pendant trois minutes (Spectrophotomètre JENWAY 6305, U.V. et Visible) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire  $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ .

Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100µl de l'extrait enzymatique brut, 50µl de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3% et 2850µl de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

L'activité catalase est obtenue après application de la formule suivante :

$$CAT = \frac{\Delta DO}{0.040 \times mg} \text{ (nmole / min / mg)}$$

### 3-9- Etude du métabolisme respiratoire

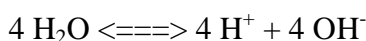
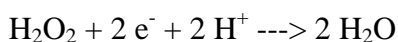
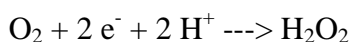
#### 3-9-1- Principe du dosage

Un oxygraphe utilise une électrode à oxygène couplée à un dispositif électronique de mesure. L'électrode à oxygène est constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent reliées par une solution de KCl conductrice. Le tout est séparé du milieu à étudier par une membrane en téflon. Cette membrane est imperméable à l'eau et aux ions (concentration constante du KCl), mais perméable à l'oxygène dissous dans le milieu (Djebar et Djebar, 2000).

Cette technique utilisée pour la mesure de l'activité respiratoire des organites cellulaires (Figure 16), a été adaptée au niveau du laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour le suivi du métabolisme respiratoire des microorganismes et racines (Sbartai *et al.*, 2009 ; Rouabhi *et al.*, 2007 et 2009)

#### 3-9-2- Protocole expérimental

L'électrode est soumise à une tension de 0,6 - 0,7 V. Dans ces conditions, l'oxygène est réduit en eau par les électrons issus de la cathode :



La solution de KCl entièrement dissociée ( $K^+ + Cl^-$ ) permet à l'argent de l'anode de donner 4 électrons :  $4 Ag \rightarrow 4 Ag^+ + 4 e^-$

Le courant produit est proportionnel à la concentration en oxygène de la solution de KCl, cette concentration est en équilibre avec celle de l'oxygène dissous dans le milieu. Au bout d'un temps de latence, le courant est proportionnel à la concentration en oxygène du milieu. Un système électronique transforme le courant produit en une tension proportionnelle à la concentration en dioxygène du milieu qui l'entoure (figure 16).

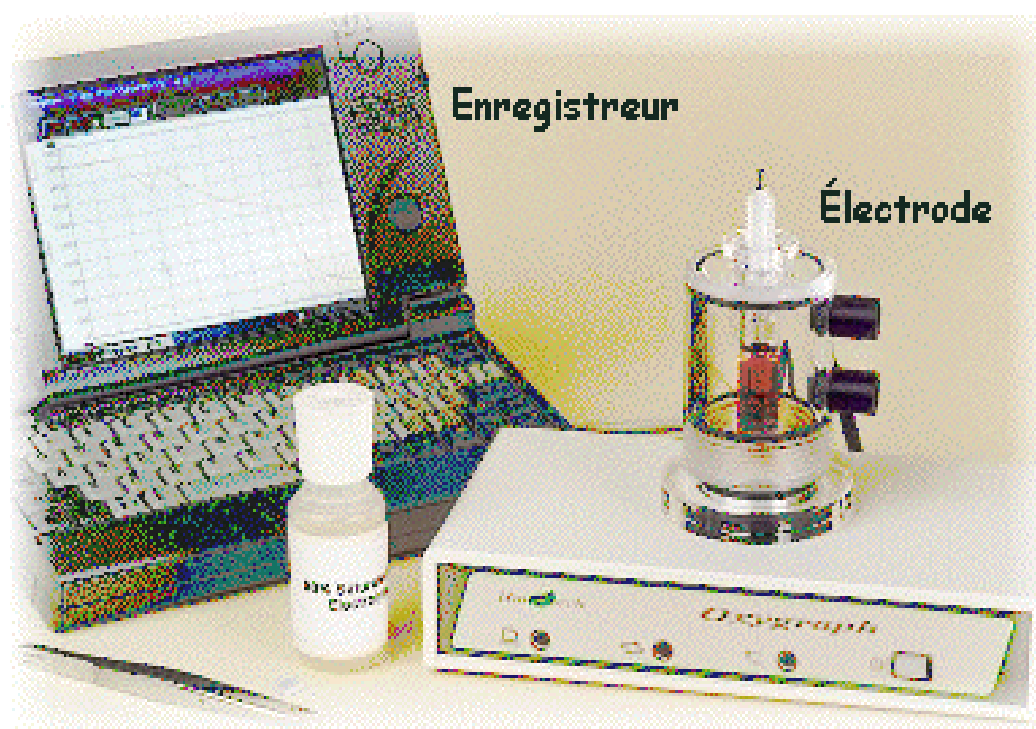


Figure 16. Schéma de l'Electrode à Oxygène (Hansatech Instruments).

### 3-10- Résonance magnétique RMN

Après traitement des cellules par les différentes concentrations de PA-A et PA-B, nous avons isolé puis purifié les molécules du milieu biologique, ces dernières subissent des analyses en RMN du proton dont les spectres ont été enregistrés à température ambiante sur un appareil : AC 400 BRUKER. Cette analyse nous a permis d'identifier les structures des deux phosphoramidates avant et après l'utilisation en milieu biologique.

### 3-11- Détermination de la concentration inhibitrice (CI50)

La détermination de la concentration qui, dans des conditions standards, inhibe 50% de l'accroissement d'une population de paramécies est dite CI50 (Bonnet, 2003). Les taux d'inhibition sont corrigés par la formule d'Abbott (1925) qui permet de connaître la toxicité réelle du xénobiotique. Les différents taux subissent une transformation angulaire d'après les tables établies par Bliss.

Pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (CI50). Les taux de normalité corrigés obtenus sont transformés probits et permettent d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées. Le test  $C^2$  permet un bon ajustement de la droite. Depuis la courbe, on détermine la dose CI50 selon les procédés mathématiques de Finney (1971). La méthode de Swaroop (1966) permet le calcul de l'intervalle de confiance de la CI50.

La formule d'Abbott est la suivante :

$$100 \frac{X - Y}{X}$$

Où

$X$  : Nombre de vivants des témoins;

$Y$  : Nombre de vivants des traitées.

### 3-11- Analyse statistique

Dans l'analyse statistique(X, 2000), nous avons procédé à :

\*L'analyse de la variance à un facteur contrôlé pour effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes.

\*La comparaison de  $p - 1$  moyenne à un témoin, élaborée par Dunnett, qui est la différence entre la moyenne des échantillons témoins et la moyenne d'un des échantillons quelconque parmi ceux traités (Dagnelie, 1999).

$$D_{1-\alpha/2} \sqrt{2CM_r / n}$$

## Résultats

### 1- Cytotoxicité et stress oxydant du PA-A

#### 1-1- Effet du PA-A sur la morphologie et la paroi des paramécies

La figure (17) montre l'effet du PA-A aux différentes concentrations sur la morphologie et l'intégrité de la paroi des paramécies. Ainsi, nous avons remarqué la présence de bourgeonnements ainsi que des boursouflures irrégulières sur les membranes cellulaires et ce que quelque soit la concentration du PA-A utilisée.

**T:** Paramécie témoin

**A:** Paramécie traitée par 40  $\mu\text{M}$  du PA-A

**B:** Paramécie traitée par 60  $\mu\text{M}$  du PA-A

**C:** Paramécie traitée par 80  $\mu\text{M}$  du PA-A

#### 1-2- Effets sur la croissance cellulaire

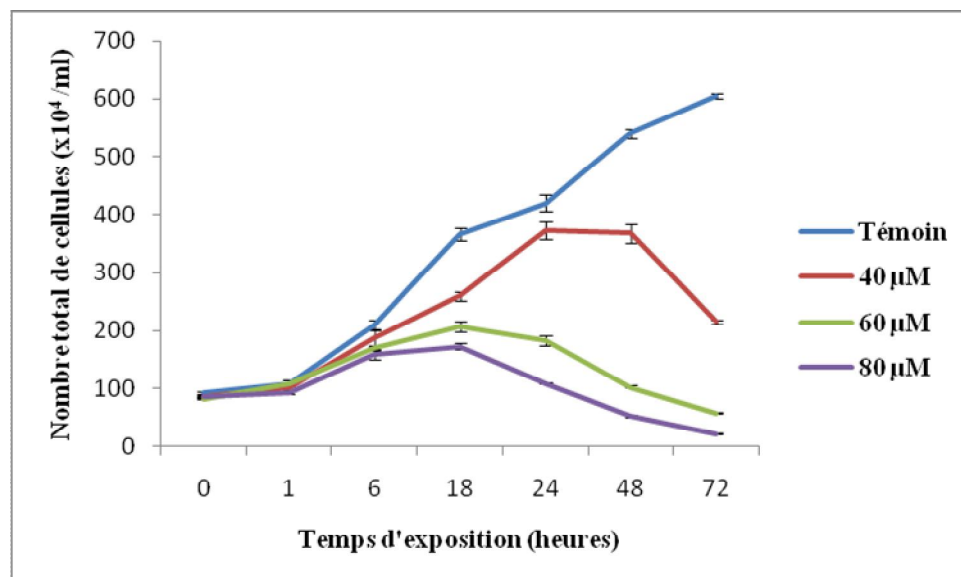


Figure 18. Effet de PA-A (40, 60 et 80  $\mu\text{M}$ ) sur la croissance cellulaire en fonction du temps

La figure (18) illustre l'effet de PA-A sur l'évolution de la croissance des paramécies. Toutes les mesures ont été effectuées pendant la phase exponentielle de croissance. Nous constatons une

croissance normale des paramécies témoins dont le nombre est de  $100 \times 10^4$  cellules à  $T_0$  pour atteindre au 3<sup>ème</sup> jour un nombre de  $605 \times 10^4$  cellules, parallèlement, nous constatons que pour la plus faible concentration du PA-A ( $40 \mu\text{M}$ ), l'évolution de la croissance cellulaire semble similaire à celle des cellules témoins, et ce jusqu'à 24h de traitement. Au-delà de 48h de traitement, nous constatons, une forte déplétion très hautement significative ( $p < 0.001$ ) du nombre de cellules qui persiste jusqu'à la fin du traitement (72h).

Concernant le traitement par les fortes concentrations du PA-A, nous remarquons que durant les 6 premières heures

Au-delà de 18h de traitement, une forte déplétion du nombre de cellules est observée pour celles traitées par les concentrations de 60 et  $80 \mu\text{M}$  de PA-A, cette déplétion semble persister en fonction du temps.

### 1-3- Calcul du pourcentage de réponse (P.R.)

La figure (19) montre que le pourcentage de réponse des paramécies est dose –dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes du PA-A, il passe de 64.46% à la concentration de  $40 \mu\text{M}$  et atteint 96.44% à la concentration de  $80 \mu\text{M}$  où nous constatons une inhibition d'environ 40% de la croissance des paramécies.

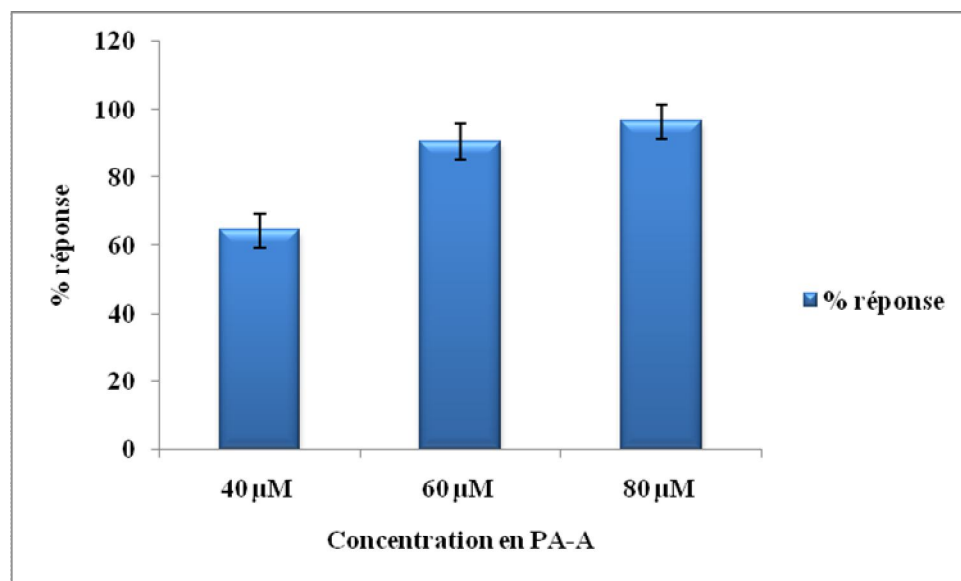


Figure 19. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de PA-A.

#### 1-4- Détermination de la concentration inhibitrice CI 50

La concentration inhibitrice 50% (CI 50) permet de caractériser la toxicité d'un xénobiotique. Nous remarquons que la concentration inhibitrice diminue en fonction de la durée d'exposition (tableau 7), en effet, elle passe de 73.097  $\mu\text{M}$  à 18h de traitement pour atteindre 60.548  $\mu\text{M}$  après 24h de traitement.

**Tableau 7. Valeurs du Slope et de la CI 50 à 18h et 24h de traitement**

Exposition	PA-A	
	CI 50 ( $\mu\text{M}$ )	Slope
18 h	73.097	0.0119
24 h	60.548	0.2333

#### 1-5- Détermination du temps et du nombre de génération cellulaire

Le tableau (8) regroupe les valeurs obtenues après calcul du nombre de génération ( $n$ ) ainsi que du temps de génération ( $g$ ) et ce après 24h de traitement.

**Tableau 8. Valeurs du nombre de génération après 24h d'exposition au PA-A**

Concentrations	PA-A	
	$n$	$g$
Témoin	2.182±0.30	11.00±0.1
40 $\mu\text{M}$	2.142±0.083	11.204±0.46
60 $\mu\text{M}$	1.146±0.099	20.942±1.614
80 $\mu\text{M}$	0.318±0.036	75.471±10.158

Nous constatons que le temps de génération augmente d'une manière dose-dépendante, alors que l'évolution du nombre de génération est inversement proportionnel aux concentrations croissantes du PA-A.

### 1-6- Détermination du taux de croissance des paramécies

Nous avons regroupé dans le tableau (9) les valeurs obtenues après calcul du taux de croissance ( $\mu$ ), et ce après 24h de traitement.

**Tableau 9. Détermination du taux de croissance des paramécies après 24h d'exposition du PA-A**

PA-A	Témoin	40 $\mu$ M	60 $\mu$ M	80 $\mu$ M
$\mu$	0.392 $\pm$ 1.01	0.383 $\pm$ 1.02	0.205 $\pm$ 0.80	0.057 $\pm$ 0.02

Dans le tableau (9) nous constatons que le taux de croissance des paramécies témoins qui est de 0.392 demeure plus élevé que celui obtenu avec les différentes concentrations en PA-A. Cependant, le taux de croissance est inversement proportionnel aux concentrations en PA-A.

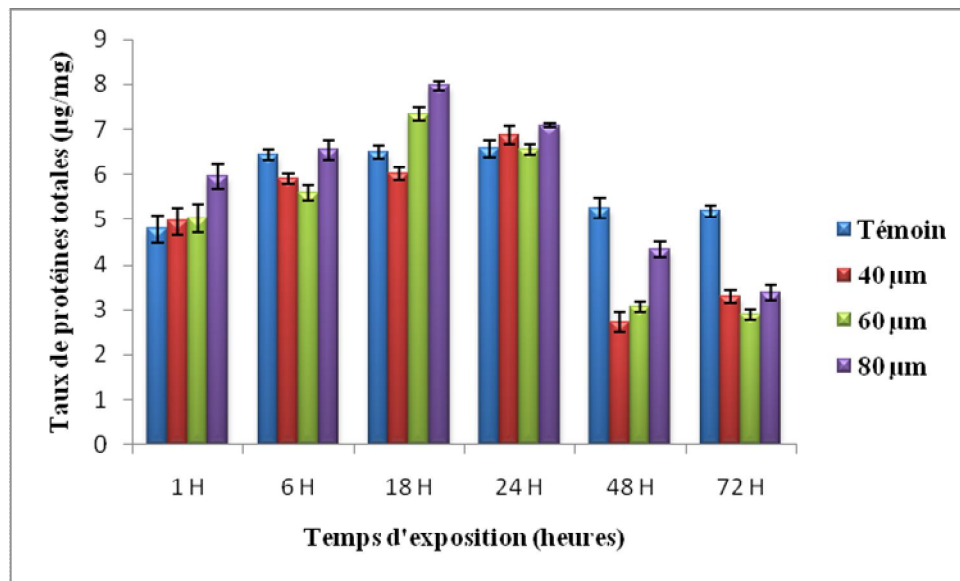
L'étude statistique montre que PA-A a un effet inhibiteur ( $p < 0.05$ ), et ce pour toutes les concentrations. Résultat confirmé par le test de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

### 1-7- Variation du taux de protéines totales

La figure (20) met en évidence les variations du taux de protéines totales en fonction du temps et des différentes concentrations du PA-A.

Nous constatons qu'aux premiers temps d'exposition (1h et 6 h), le taux de protéines totales évolue d'une manière quasi comparable à celui des témoins.

Cependant pour les plus fortes concentrations du PA-A (40 et 60  $\mu$ M), le taux de protéines totales augmente de manière hautement significatives ( $p < 0.01$ ) notamment au temps 18h.



**Figure 20. Effet des différentes concentrations du PA-A sur les variations du taux des protéines totales en fonction du temps.**

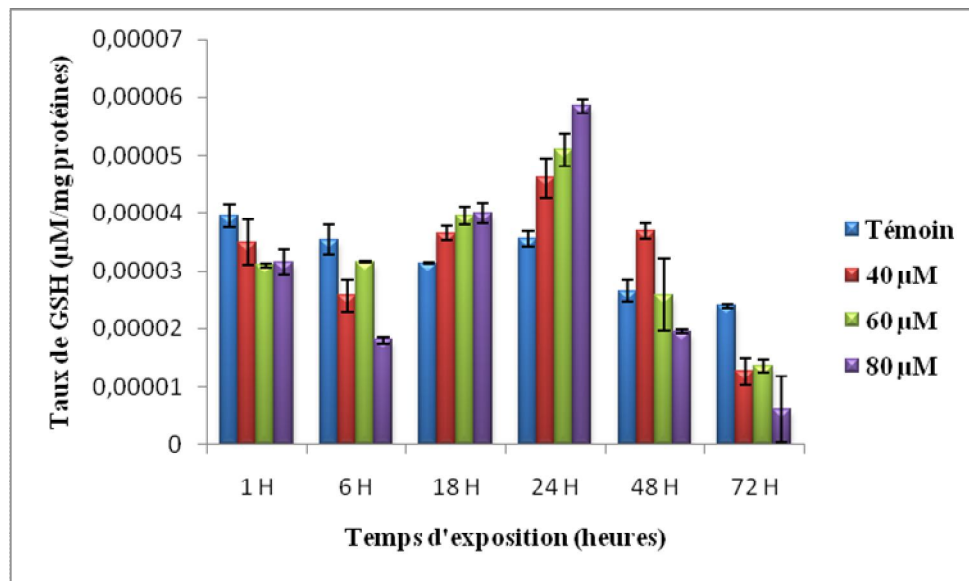
Après 24h de traitement, une déplétion progressive et très hautement significative ( $p < 0.001$ ) du taux de protéines totales est observée et ce pour les différentes concentrations du PA-A testées.

### 1-8- Taux de glutathion total

Dans la figure (21) nous avons représenté les résultats des variations des taux de GSH obtenus chez les paramécies traitées par les différentes concentrations du PA-A en fonction du temps.

Après 6h d'exposition, nous observons une induction dose-dépendante de la GSH en fonction du temps.

A partir de 24h de traitement, l'ensemble des conditions d'exposition investiguées semble induire une déplétion très hautement significative ( $p < 0.001$ ) du taux de glutathion total, qui se poursuit jusqu'à la fin du traitement (72h).



**Figure 21. Effet des concentrations croissantes du PA-A sur le taux de GSH en fonction du temps.**

### 1-9- Effet du PA-A sur le métabolisme respiratoire de la paramécie

La figure (22) illustre l'effet du PA-A sur le métabolisme respiratoire des paramécies témoins et traitées aux différents temps de traitement.

Entre 1h et 6h de traitement, nous constatons une légère diminution de l'activité respiratoire, et ce pour toutes les concentrations du PA-A utilisés.

A partir de 18h et jusqu'à 72h, la différence de consommation d'O<sub>2</sub> entre les cellules témoins et celles traitées aux plus fortes concentrations du PA-A (60 et 80 µM) diminue de manière très hautement significative ( $p < 0.001$ ) pour atteindre les 70% au temps 72h. Cette différence n'est que de 20% à la plus faible concentration du PA-A (40 µM).

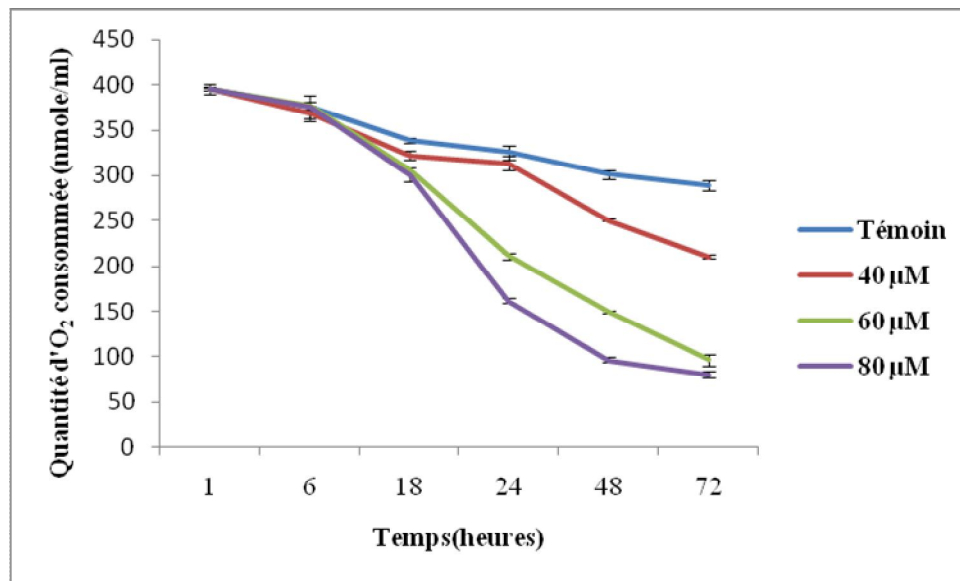


Figure 22. Effet de PA-A sur le métabolisme respiratoire

## 1-10- Etude du stress oxydant

### 1-10-1 Effets du PA-A sur l'activité glutathion S-transférase

Les données obtenues après dosage de l'activité GST exprimées en  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines sont regroupées dans la figure (23).

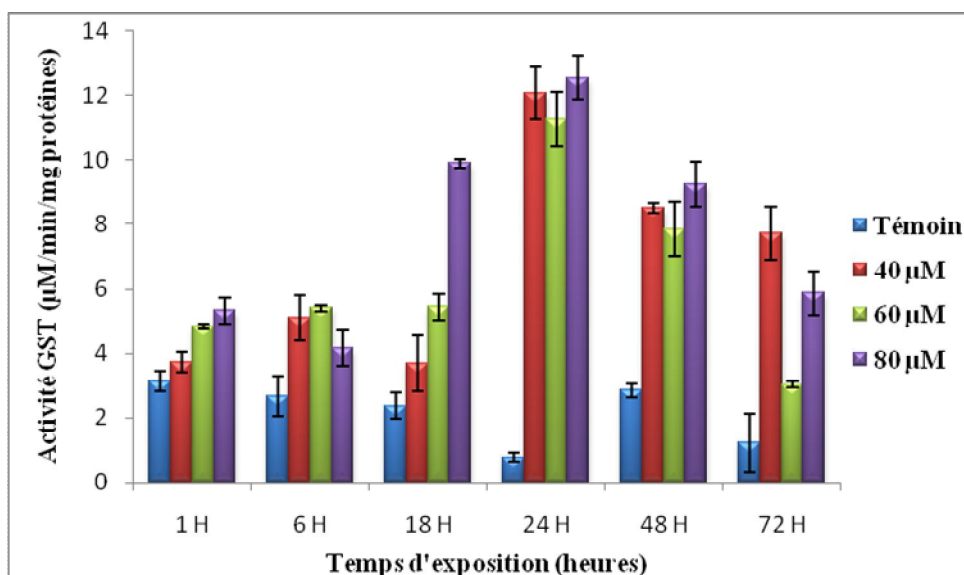


Figure 23. Variation de l'activité GST en fonction du temps et des concentrations croissantes du PA-A chez la paramécie.

Nous remarquons qu'entre 18h et 24h de traitement, une induction dose-dépendante de l'activité glutathion S-transférase semble apparaître chez les cellules traitées par les différentes concentrations de PA-A.

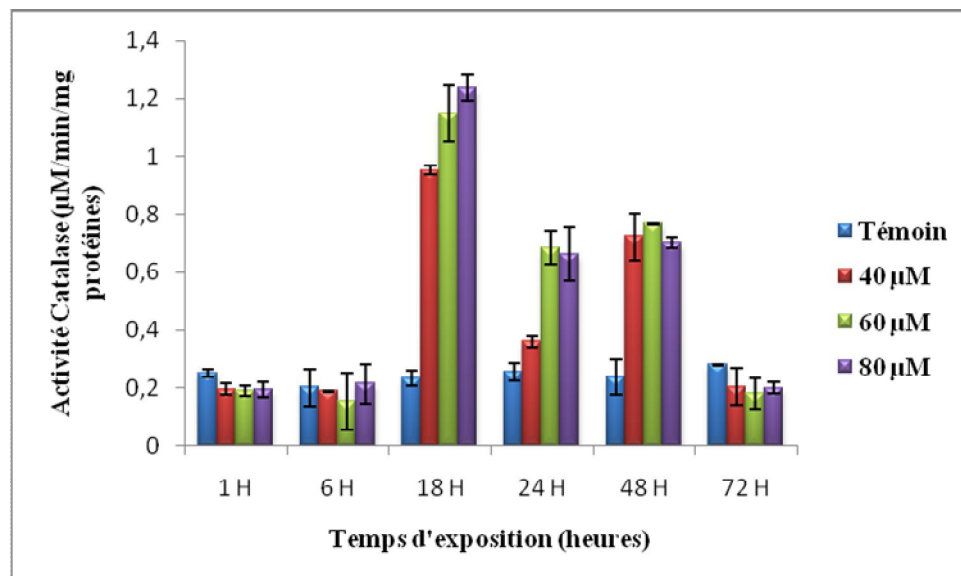
Dès 48h de traitement, une déplétion très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité GST est observée en fonction du temps, et ce pour toutes les concentrations de PA-A.

### 1-10-2- Effets du PA-A sur l'activité catalase

Dans la figure (24) nous avons représenté les résultats des variations de l'activité catalase obtenus chez les paramécies traitées par les différentes concentrations de PA-A.

Nos résultats montrent qu'après 6h de traitement, une importante induction dose-dépendante de l'activité catalase est à noter, dont le maximum est observé au temps 18h (1.23  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protéines).

A partir de 24h d'exposition et aux plus fortes concentrations du PA-A, une diminution très hautement significatives ( $p < 0.001$ ) de l'activité catalase est observée, et ce en fonction du temps, où à 72h de traitement, l'activité catalase diminue pour devenir équivalente à celle des témoins.



**Figure 24. Variation de l'activité catalase en fonction du temps et des concentrations croissantes du PA-A chez les paramécies.**

## **2- Etude de la toxicité du PA-B sur les paramécies**

### **2-1- Effet du PA-B sur la morphologie et la paroi des paramécies**

La figure (25) montre l'effet du PA-B aux concentrations de 2, 6 et 8  $\mu\text{M}$  sur la morphologie et l'intégrité de la paroi des paramécies. Nous avons constaté que quelque soit la concentration du PA-B utilisée, il y a présence de bourgeonnements ainsi que des boursouflures irrégulières sur les membranes cellulaires.

**T:** Paramécie témoin

**A:** Paramécie traitée par 2  $\mu\text{M}$  du PA-A

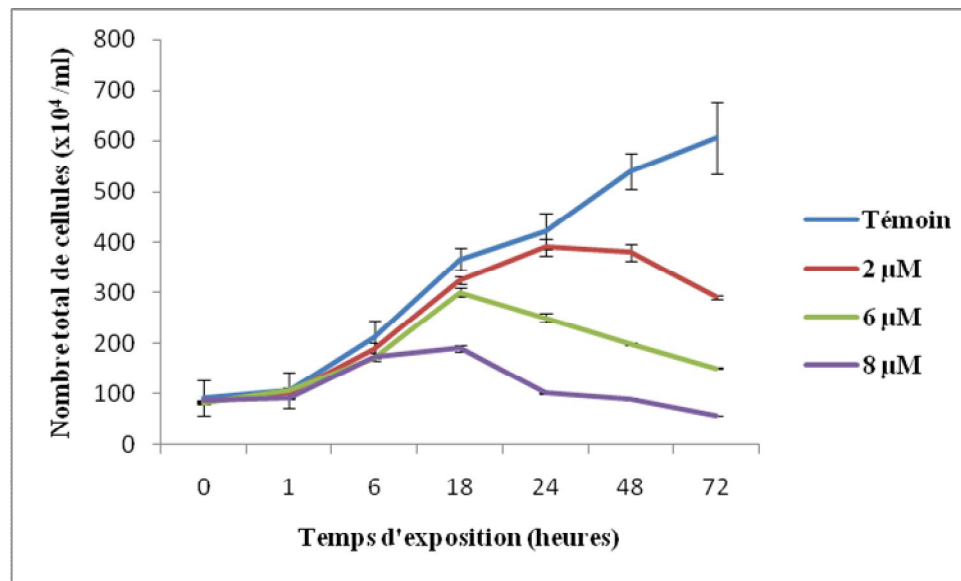
**B:** Paramécie traitée par 6  $\mu\text{M}$  du PA-A

**C:** Paramécie traitée par 8  $\mu\text{M}$  du PA-A

### **2-2- Effets sur la croissance cellulaire**

La figure (26) représente l'évolution du nombre de cellules en présence du PA-B en fonction du temps, traduisant ainsi les variations de la croissance cellulaire. Toutes les mesures ont été effectuées pendant la phase exponentielle de croissance.

Entre 1 et 6h de traitement, les cellules traitées par les différentes concentrations de PA-B présentent un nombre de cellules similaire à celui du témoin.



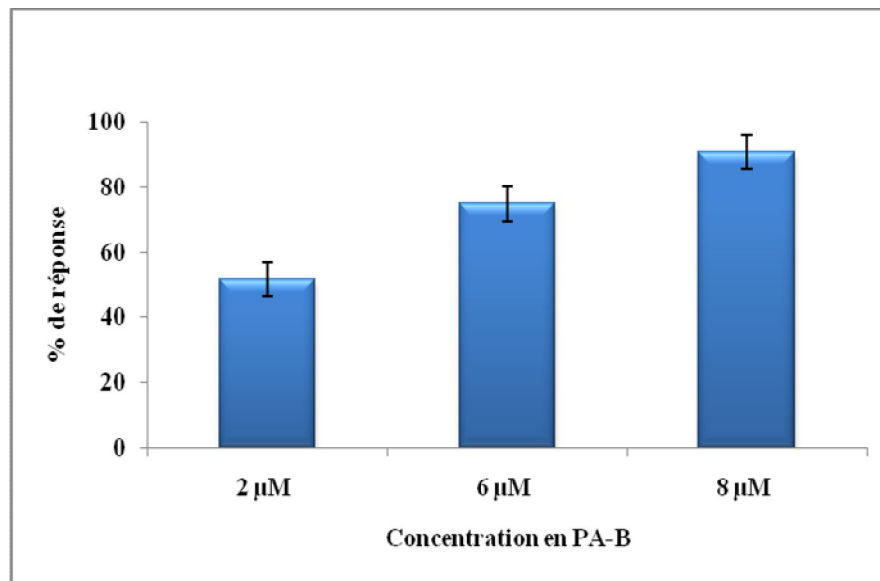
**Figure 26. Effet des différentes concentrations du PA-B sur la croissance cellulaire en fonction du temps.**

Au-delà de 18h de traitement, une déplétion très hautement significatif ( $p < 0.001$ ) du nombre de cellules est observée pour les cellules traitées par les plus fortes concentrations (4 et 8 µM) du PA-B, cette déplétion semble persister en fonction du temps.

La déplétion du nombre de cellules pour la plus faible concentration du PA-B (2µM) n'est observée qu'après 24h de traitement, et persiste jusqu'à la fin du traitement (72h).

### 2-3- Calcul du pourcentage de réponse (P.R.)

La figure (27) montre que le pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis du PA-B est dose-dépendant, il passe de 51,84% à la concentration de 2 µM à 90,57% pour la concentration 8 µM où presque la totalité de la population est inhibée.



**Figure 27. Pourcentage de réponse des paramécies traitées au PA-B aux concentrations de 2, 4 et 8  $\mu\text{M}$ .**

#### 2-4- Calcul de la concentration inhibitrice CI 50

Afin de caractériser la toxicité du PA-B, il est nécessaire de déterminer la concentration inhibitrice 50% (CI 50). Les taux de normalité corrigés obtenus sont transformés en probits et permettent d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées. Depuis la courbe, on peut déterminer toutes les doses remarquables, ainsi que le Slope.

Nous avons déterminé dans le tableau (4) la CI 50 à différents temps de traitements.

**Tableau 4: Valeurs du Slope et de la CI 50 à 18h et 24h de traitement**

Exposition	PA-B	
	CI 50 ( $\mu\text{M}$ )	Slope
18 h	9.495	0.0118
24 h	4.969	0.1145

Nous remarquons que la concentration inhibitrice diminue avec la durée d'exposition au PA-B. En effet, elle passe de 9.495  $\mu\text{M}$  à 18h et diminue pour atteindre 4.969  $\mu\text{M}$  après 24h de traitement.

### 2-5- Détermination du temps et du nombre de génération cellulaire

Le tableau (5) regroupe les valeurs correspondant au calcul du nombre de génération ( $n$ ) ainsi que du temps de génération ( $g$ ) et ce après 24h de traitement.

**Tableau 5. Détermination du nombre et du temps de génération après 24h d'exposition au PA-B**

Concentrations	PA-B	
	$n$	$g$
Témoin	2.192±0.15	10.768±0.51
2 $\mu\text{M}$	2.229±0.12	10.947±0.56
4 $\mu\text{M}$	1.594±0.11	15.056±1.66
8 $\mu\text{M}$	0.475±0.12	50.52±10.85

Dans le tableau (5), nous constatons que le temps de génération est proportionnel à la concentration en PA-B, alors que le nombre de génération est inversement proportionnel aux concentrations du xénobiotique.

### 2-6- Effets du PA-B sur le taux de croissance des paramécie

Nous avons regroupé dans le tableau (6) les valeurs obtenues après calcul du taux de croissance ( $\mu$ ), et ce après 24h de traitement au PA-B.

Tableau 6. Détermination du taux de croissance après 24h d'exposition

PA-B	Témoin	2 $\mu$ M	4 $\mu$ M	8 $\mu$ M
$\mu$	0.456 $\pm$ 0.0414	0.395 $\pm$ 0.62	0.286 $\pm$ 0.83	0.04 $\pm$ 0.24

Ainsi, nous remarquons que le taux de croissance des cellules témoins (0.456) est plus élevé que celui des paramécies traitées avec les différentes concentrations en PA-B. En effet, il est de 0.456 chez les témoins et de 0.04 chez les traitées avec la plus forte concentration (8  $\mu$ M). Nous constatons également que le taux de croissance est inversement proportionnel aux concentrations en PA-B.

L'étude statistique confirme l'effet inhibiteur ( $p < 0.05$ ) du PA-B sur le taux de croissance cellulaire, et ce pour toutes les concentrations. Le même résultat est obtenu pour le test de simultanéité de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

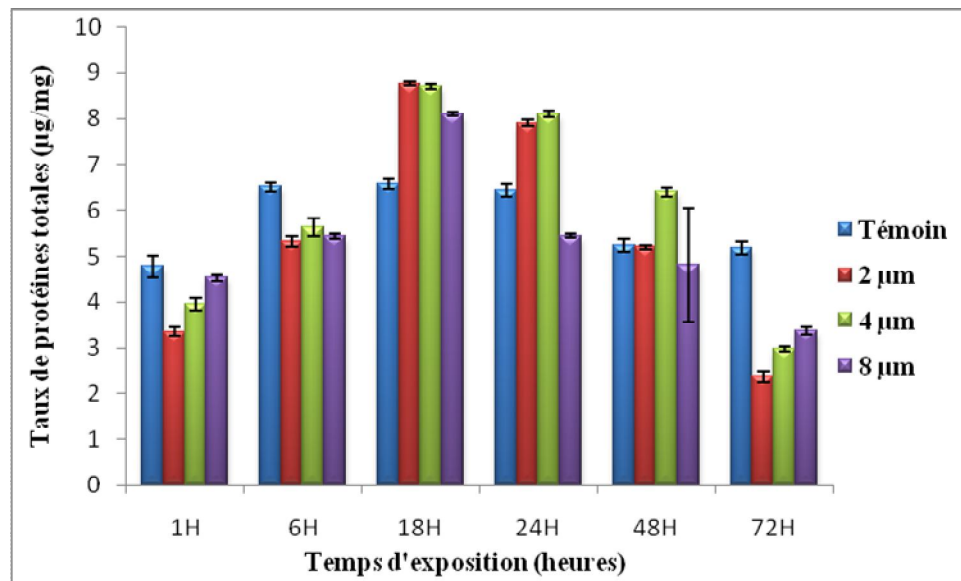
### 2-7- Effet du PA-B sur l'évolution du taux de protéines totales

La figure (28) représente l'évolution du taux de protéines totales en fonction des différentes concentrations du PA-B dans un intervalle de temps (1, 6, 18, 24 et 72h).

Entre 1 et 6h d'exposition, le taux de protéines totales tend à augmenter pour toutes les concentrations du PA-B testées, mais également pour les cellules témoins.

A partir de 18h de traitement, une induction du taux de protéines totales est observée et ce pour les différentes concentrations du PA-B par rapport au témoin.

Au-delà de 48H de traitement, nous constatons une déplétion très hautement significatives ( $p < 0.001$ ) du taux de protéines totales pour les différentes concentrations de PA-B. Cette déplétion se poursuit jusqu'à 72h de traitement, où nous remarquons un taux de protéines d'environ 3  $\mu$ g/mg pour les différentes concentrations du PA-B inférieur à celui des cellules témoins (5.18  $\mu$ g/mg).



**Figure 28. Effet de PA-B aux concentrations de 2, 4 et 8 µM sur l'évolution du taux protéines totales en fonction du temps.**

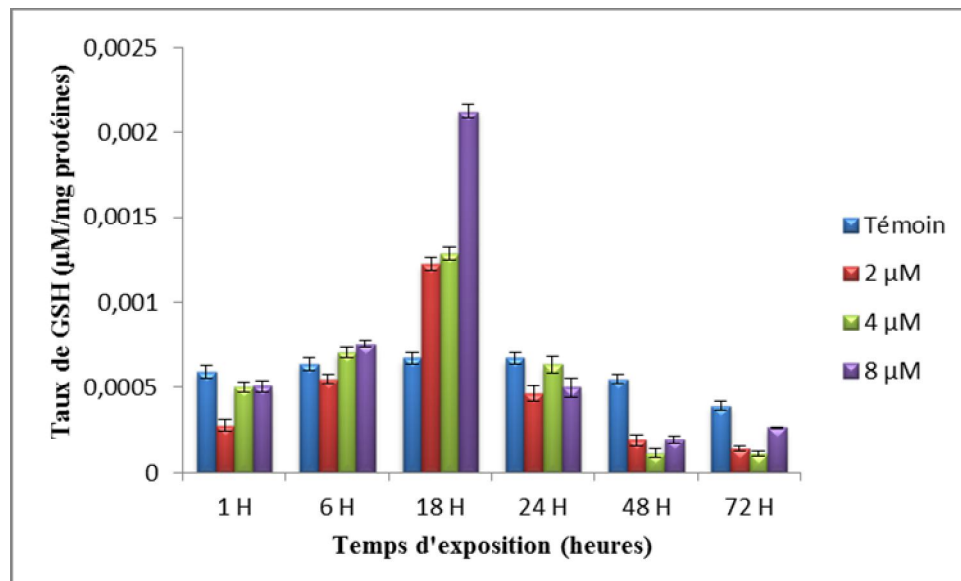
### 2-8- Effets du PA-B sur l'évolution du taux de GSH

Concernant la quantité totale de glutathion, les résultats obtenus sont résumés dans le figure (29) représentant la variation de la quantité du GSH en fonction des différentes concentrations de PA-B dans un intervalle de temps (1h, 6h, 18h, 24h et 72h).

Si l'on s'intéresse plus dans le détail à ce qui se passe au niveau des différents temps d'exposition, on peut voir que pour les durées d'expositions les plus courtes (1h et 6h), le taux de GSH pour toutes les concentrations reste quasi constant et proche de celui du témoin.

Au-delà de 6h de traitement, nous constatons une induction du taux de GSH et ce pour les différentes concentrations du PA-B par rapport au témoin, en effet, il est de  $0.657 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{mg}$  protéines pour les cellules témoins, et d'environ  $1.5 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{mg}$  protéines pour les cellules traitées par les concentrations croissantes du PA-B.

Après 24h de traitement, l'ensemble des conditions d'exposition investiguées semblent indiquer une déplétion très hautement significatives ( $p < 0.001$ ) du taux de GSH qui semble se rapprocher de celle du témoin. Cette déplétion se poursuit au temps 72h, où l'on constate le taux de GSH ( $0.1 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}/\text{mg}$  protéines).



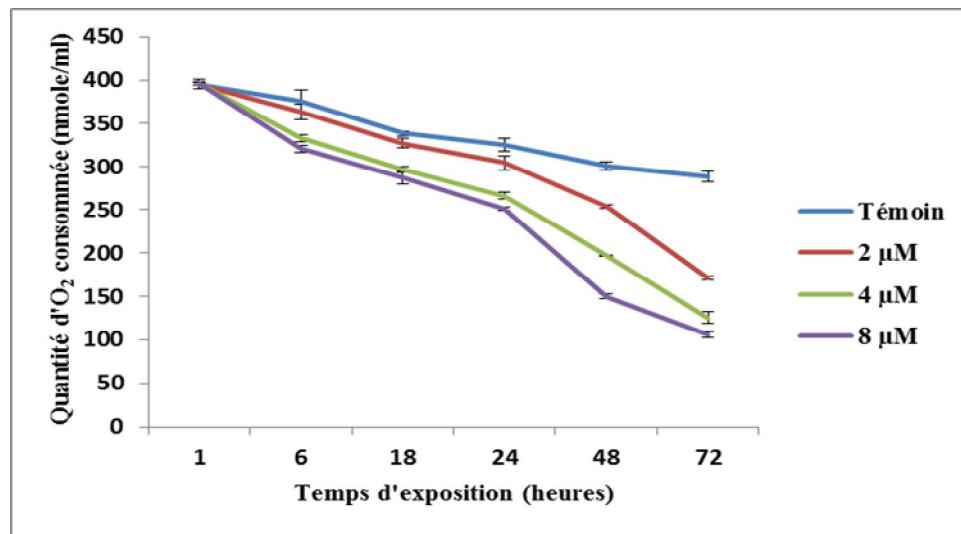
**Figure 29. Evolution du taux de GSH au cours de l'exposition des paramécies aux différentes concentrations du PA-B.**

## 2-9- Effet de PA-B sur le métabolisme respiratoire des paramécies

La figure 30 illustre l'effet du PA-B sur le métabolisme respiratoire après 72h de traitement.

Nous constatons que les cellules témoins présentent une respiration tout à fait normale avec une consommation d'O<sub>2</sub> qui passe de 395.22 nmole/ml après 1h de traitement à 289.12 nmole/ml à la fin du traitement (72h).

Après 1h de traitement, nous constatons que la consommation d'O<sub>2</sub> des paramécies traitées par les différentes concentrations du PA-B et les témoins sont similaires (environ 375 nmole/ml).



**Figure 30. Effet des différentes concentrations du PA-B sur le métabolisme respiratoire des paramécies après 72h de traitement**

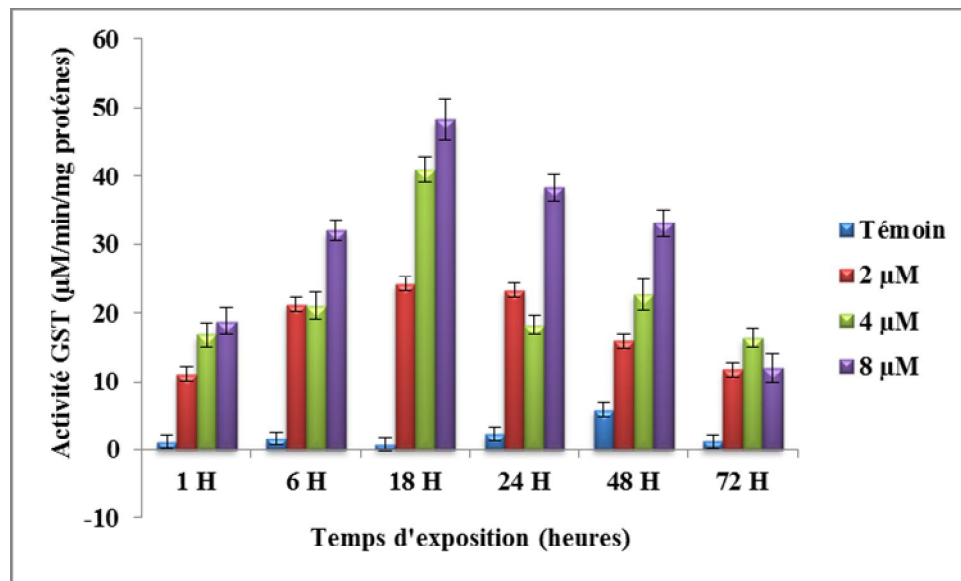
Au-delà de 6h et jusqu'à 72h de traitement, nous constatons que la différence de consommation d'O<sub>2</sub> entre les cellules témoins et celles traitées aux plus fortes concentrations du PA-B (4 et 8 µM) baisse de manière et atteint les 60% au temps 72h. Cette différence n'est que de 40% à la plus faible concentration du PA-B (2 µM).

## 2-10- Etude du stress oxydant

### 2-10-1- Effet du PA-B sur l'évolution de l'activité GST

L'activité de la glutathion S-transférase est illustrée dans la figure (31).

Dès 1h de traitement, une induction dose-dépendante de l'activité glutathion S-transférase semble apparaître chez les cellules traitées par les différentes concentrations du PA-B, en effet, cette induction se poursuit pour atteindre son maximum à savoir 48.28 µM/min/mg de protéines à la plus forte concentration (8 µM) par rapport aux cellules témoins dont l'activité GST atteint 0.77 µM/min/mg de protéines et ce à 18h de traitement.



**Figure 31. Evolution de l'activité glutathion S-transférase en fonction du temps au cours de l'exposition aux différentes concentrations du PA-B.**

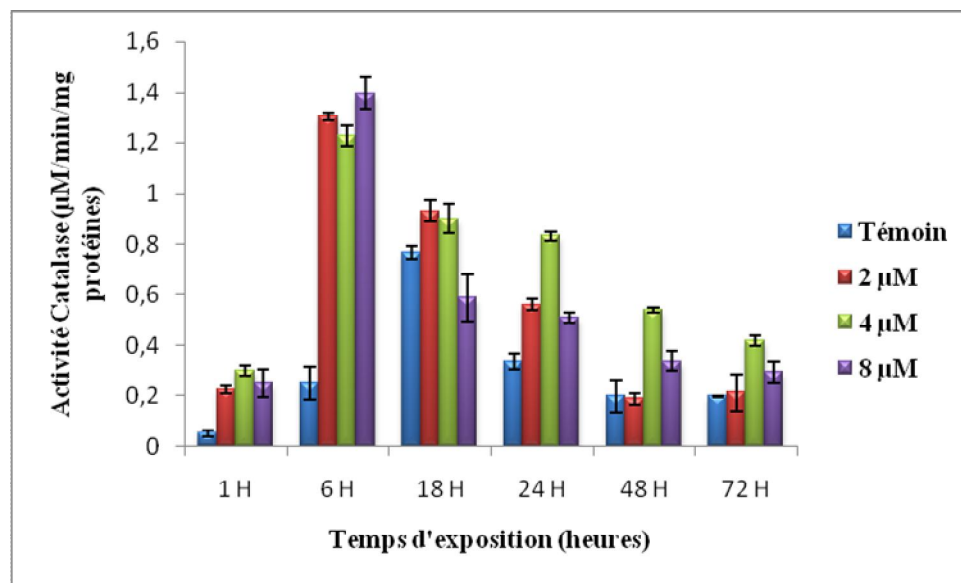
A partir de 24h de traitement, une déplétion très hautement significatives ( $p < 0.001$ ) de l'activité GST est observée et ce pour toutes les concentrations en PA-B. Cette déplétion ce poursuit jusqu'à la fin du traitement.

### 2-10-2- Effet du PA-B sur l'évolution de l'activité catalase

L'évolution de l'activité catalase au cours de l'expérimentation est illustrée dans la figure (32). Ainsi, si l'on s'intéresse plus dans le détail à ce qui se passe au niveau des différents temps d'exposition, on peut constater que pour la durée d'exposition la plus courte (6h), une légère évolution dose-dépendante de l'activité, mais ces valeurs restent toujours supérieures au témoin.

Après 6h de traitement, on retrouve une importante induction de l'activité catalase et ce pour les trois concentrations en PA-B par rapport au témoin.

Au-delà de 18h d'exposition, une diminution très hautement significatives ( $p < 0.001$ ) de l'activité catalase est observée et ce quelque soit la concentration en PA-B, mais ces valeurs restent toujours supérieures au témoin. Cette inhibition est constatée également pour la durée d'exposition la plus longue (72h).



**Figure 32. Effet du PA-B aux concentrations de 2, 4 et 8 µM sur l'activité catalase en fonction du temps**

Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes terrestres et aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales. Le souci de contrôler la qualité des différents compartiments environnementaux par rapport à leur niveau de contamination par des substances chimiques toxiques tels que les pesticides, les engrais et les autres polluants est devenu une préoccupation internationale majeure notamment depuis la Conférence de Rio en 1992 sur le développement et l'environnement.

Nous tenterons dans cette étude de suivre la synthèse de deux composés organophosphorés, largement utilisés dans les milieux agricoles (Nivsarkar *et al.*, 2004), et de mettre en évidence leurs effets sur les paramètres morphologiques, biochimiques et physiologiques des modèles biologiques non cibles considérés comme d'excellents modèles alternatifs mais également des bio-indicateurs de la pollution. Notre choix s'est porté sur des protistes ciliés: *Paramecium .sp* qui sont des cellules eucaryotes, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et terrestre, caractérisées par un court cycle de vie, une multiplication rapide et un comportement normal susceptible d'être affecté par la présence de polluants (Beal et Aderson, 1993). Cet aspect nous a conduit à les utiliser comme outils d'évaluation de l'impact des xénobiotiques sur l'environnement (Sauvant *et al.*, 1999).

Partant du principe que les phosphoramidates utilisés dans notre étude sont de nature lipophile, donc pénètrent sans aucune difficulté à l'intérieur de la cellule où ils peuvent s'accumuler et générer des processus cytotoxiques. Toutefois, les cellules ont développé des mécanismes de biotransformation visant à inactiver les xénobiotiques en métabolites plus hydrosolubles donc plus facilement excrétables, ainsi nous sommes nous posés la question suivante :

### Quels sont les effets des deux xénobiotiques utilisés sur les paramètres cytotoxiques?

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule (Sauvant *et al.*, 1999 ; Perez-Rama *et al.*, 2001).

Ainsi nos résultats montrent que quelque soit la concentration des deux xénobiotiques de synthèses utilisés, la croissance est inhibée en fin de traitement (72h). La toxicité se manifeste en premier lieu par une importante déplétion du nombre de cellules et ce dès le début du traitement aux plus fortes concentrations des deux xénobiotiques. Ceci nous amène à confirmer l'influx des xénobiotiques à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la paroi cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive des xénobiotiques mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998). Ces résultats sont en accord avec ceux de Einicker-Lamas *et al.* (2002) qui a étudié la toxicité du Zinc et du Cuivre sur *Euglena gracilis* (algue chlorophyllienne flagellée), Redouane-Salah (2004), Benhadid (2005) et Rouabhi(2007).

Le changement du comportement locomoteur des paramécies sous l'effet des deux xénobiotiques s'est traduit dans notre travail, et dès les premières heures du traitement par des mouvements désordonnés et une nage vers l'arrière appelée « Backward swimming », caractéristique principale de la toxicité chez les protistes ciliés. Ces observations sont en accord avec les travaux de Venkateswara Rao *et al.* (2006), qui ont mis en évidence l'apparition du phénomène "Backward swimming" dans le cas d'une exposition de *Paramecium caudatum* à l'acephate, un composé organophosphoré.

D'un autre coté, la présence de bourgeonnements ainsi que des boursouflures irrégulières sur les membranes cellulaires sous l'impulsion des deux xénobiotiques s'explique par un système de défense des paramécies, appelé trichocystes, c'est le phénomène d'exocytose qui est un processus cellulaire qui permet la sortie dans le milieu extracellulaire de produits synthétisés dans la cellule au sein de compartiments membranaires.

C'est la dernière étape d'un processus biologique complexe appelé voie de sécrétion (Cohen, 2008). Les travaux de Venkateswara Rao *et al.* (2006) ont démontré que l'exposition de *Paramecium caudatum* à l'acéphate, provoquait la rupture des membranes des vacuoles contractiles, ayant pour conséquence l'augmentation du volume cellulaire, conduisant ainsi à la lyse de la cellule.

Le pourcentage de réponse (Wong *et al.*, 1999) ainsi que la CI50 sont des paramètres qui confirment bien l'évolution des courbes de croissance des paramécies traitées par les différentes concentrations des xénobiotiques utilisés. Le nombre ainsi que le temps de génération ont permis de déterminer les concentrations toxiques des deux xénobiotiques testés vis-à-vis des cellules (Dias *et al.*, 2003). Il en est de même concernant la croissance cellulaire (Suarez *et al.*, 2010), qui confirme l'effet dose-dépendant des deux molécules testées en fonction du temps d'exposition, et ont permis de conclure que la molécule PA-B semble plus toxique que la molécule PA-A, et ce après 24h de traitement.

Le système glutathion représente la réponse biologique initiale des microorganismes face à des perturbations ou contaminations du milieu dans lequel ils vivent (Stegeman *et al.*, 1992). Il est assuré par le glutathion lui-même en présence de plusieurs enzymes qui constituent les éléments essentiels de ce système (Huggett *et al.*, 1992), (Lagadic *et al.*, 1997) et (Kammenga *et al.*, 2000).

A partir de ces données, il convient de se poser la question suivante :

### **Quels sont les effets des deux xénobiotiques sur les marqueurs non enzymatiques ?**

Dans notre travail, nous avons montré que le taux des protéines augmente d'une manière dose-dépendante en présence des deux molécules PA-A et PA-B, ces résultats vont dans le même sens que ceux de Peccini *et al.* (1994) ; Masaya *et al.* (2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins).

Notre hypothèse est que l'augmentation du taux de protéines totales pourrait être liée au déclenchement du processus de détoxification à travers l'induction de la transcription des gènes de la  $\gamma$ -glutamyl cystéine synthétase et des glutathion-S-transférases (GST- $\alpha$  et GST- $\pi$ ), ainsi que l'augmentation du taux de protéines et de molécules anti oxydantes (Nzengue, 2008).

Le système de défense antioxydant est présent chez toutes les cellules aérobies et neutralise les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques. L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un stress chimique (Winston et Di Giulio, 1991). 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, les métaux lourds et les polluants (Dickinson et Forman, 2002).

Le GSH est un composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire. En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense antiradicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (Barillet, 2007).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation dose -dépendante du taux de GSH et ce dès les premières heures de traitements par les deux molécules testées, cette augmentation peut être expliquée par la formation d'une liaison directe de type N=P entre l'azote du glutathion et le phosphore des phosphoramidates testés car le glutathion dispose d'un groupement acide carboxylique, d'un groupement amine, d'un groupement sulfhydrile (-SH) et de deux pontages peptidiques susceptibles d'être impliqués dans des réactions avec les xénobiotiques. Son groupement fonctionnel -SH jouerait alors un rôle important dans cette liaison.

De plus, sous l'effet d'un stress oxydant sévère, les capacités de la cellule à réduire le glutathion oxydé (GSSG) par le biais de la glutathion réductase (GR) peuvent être dépassées, aboutissant alors à une accumulation de GSSG dans le cytosol (Sies et Akerboom, 1984; Cadenas et Sies, 1985; DeLeve et Kaplowitz, 1991). Afin de protéger la cellule d'un déséquilibre de la balance redox, celle-ci peut exporter activement le GSSG comme cela a notamment été démontré sur des érythrocytes issus de nombreuses espèces animales (oiseaux, rongeurs, équidés, ovins, poissons, Homme) (Srivastava et Beutler, 1969 ; Kondo, 1980) ainsi que sur des hépatocytes de rat (Sies *et al.*, 1972). De plus, dans le cadre d'un fonctionnement physiologique normal, il existe un renouvellement constant du glutathion dans le milieu intracellulaire (Barillet, 2007).

D'un autre côté, la réduction du taux de GSH (après 24h pour la molécule PA-A et 18h pour la molécule PA-B) peut être expliquée par l'augmentation de l'utilisation de ce dernier par la CAT ainsi que la GST dans les réaction de conjugaison, ceci est confirmé par nos résultats qui indiquent une induction de ces enzymes en présence des deux xénobiotiques testés, ces résultats sont en accord avec ceux de (Canesi *et al.*, 1999 ; Regoli *et al.*, 1998). Le GSH piège les espèces réactives de l'oxygène car il réagit notamment avec le radical hydroxyle (OH) et  $O_2^-$  (Saez *et al.*, 1990).

A partir de ces données, nous nous sommes intéressés à la réponse cellulaire au stress généré par ces xénobiotiques. Ainsi, le stress oxydant a fait l'objet d'une étude multiparamétrique. Ce choix a été motivé de façon à obtenir une vision panoramique des conséquences de la présence des xénobiotiques et la réponse du système de défense antioxydant. Chacun des biomarqueurs retenu joue un rôle précis dans l'enchaînement des étapes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Dans notre travail, il semblerait que l'ensemble du système antioxydant cellulaire ait été perturbé. Nous verrons donc comment l'utilisation des deux molécules de synthèses a pu moduler la réponse observée au niveau des biomarqueurs de stress oxydant.

### Quels sont donc les effets des deux xénobiotiques testés sur les marqueurs enzymatiques ?

Lorsque les micro-organismes sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont stressés. Ce stress peut être intense, et provoquer la mort de ces micro-organismes sans que ces derniers n'aient pu réagir, il peut aussi être moins intense, permettant alors aux micro-organismes de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic *et al.*, 1997).

Le suivi des marqueurs enzymatiques retenus pour l'étude du stress oxydant nous a permis de constater que, quelle que soit l'enzyme considérée (GST ou CAT), une augmentation de leur activité survient à la suite d'une exposition aux molécules : PA-A et PA-B.

Nous avons ainsi constaté, une augmentation de l'activité CAT après 18 h d'exposition pour la molécule PA-A, et dès 6h d'exposition pour la molécule PA-B. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Wenning *et al.* (1988), car la catalase est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide à la contamination par les xénobiotiques. En effet, l'activité catalase consiste en une transformation du peroxyde d'oxygène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ). Or la production de  $H_2O_2$  est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme notamment nos xénobiotiques de synthèses (Brown *et al.*, 2004), ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, Lipides et protéines) (Vlahogianni *et al.*, 2007).

Nous avons également mis en évidence une augmentation de l'activité GST dès 24 h pour la molécule PA-A, et après 18 h d'exposition pour la molécule PA-B. En effet, la GST qui constitue une seconde ligne de défense efficace vis-à-vis de nombreuses substances hautement toxiques issues des interactions des espèces réactives de l'oxygène avec les macromolécules cellulaires. Ces enzymes défendent la cellule des effets délétères du stress oxydant (Martin, 2003).

Aussi, les modalités de diminution des activités CAT et GST au-delà de 24h et jusqu'à la fin du traitement, semblent suggérer que le dépassement d'un seuil d'accumulation des deux molécules de synthèses à l'intérieur des paramécies est nécessaire à la manifestation d'effets toxiques. Nous pourrions attribuer cette toxicité chimique au "dépassement d'un seuil d'accumulation" au-delà-duquel la pression chimique exercée par ces xénobiotiques serait suffisante pour faire diminuer l'activité CAT.

L'hypothèse de l'existence d'un seuil d'apparition des effets chimiotoxiques des molécules PA-A et PA-B testés vis-à-vis des activités CAT et GST semble donc confirmée, mais ne nous permet pas d'établir clairement quels ont été les mécanismes moléculaires à l'origine des perturbations observées. Néanmoins, une autre hypothèse pourrait permettre d'identifier des pistes mécanistiques de ces atteintes enzymatiques. Parmi ces mécanismes susceptibles d'expliquer les perturbations des mécanismes enzymatiques observés: l'altération des enzymes par le biais de dommages oxydatifs. Nous pouvons nous attendre au fait que les chutes d'activité observées en fin de traitement soient dues à des phénomènes oxydatifs (Davies, 2003).

En effet, les protéines (et donc les enzymes du système cellulaire de défense antioxydante) présentent de nombreux sites réactifs susceptibles d'être endommagés lors d'un stress oxydatif. Ces altérations vont pouvoir apparaître sur différents sites de ces macromolécules et, en premier lieu, au niveau de la chaîne polypeptidique définie par la séquence des acides aminés qui les compose (Stadtman, 1990 ; Davies, 1987 et 2005).

Cette chaîne est généralement décrite comme étant constituée par une structure répétitive sur laquelle s'articulent des chaînes latérales qui correspondent aux résidus non engagés dans la liaison peptidique des acides aminés. Les métaux sont capables d'agir à ces deux niveaux d'organisation de la séquence en acides aminés *via* des phénomènes oxydatifs liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Concernant la structure répétitive, les phénomènes oxydatifs sont généralement attribuables aux espèces radicalaires. Ces derniers peuvent alors interagir avec d'autres macromolécules mais, le plus généralement, vont entraîner la fragmentation de la protéine (Garrison, 1987 ; Wolff et Dean, 1986).

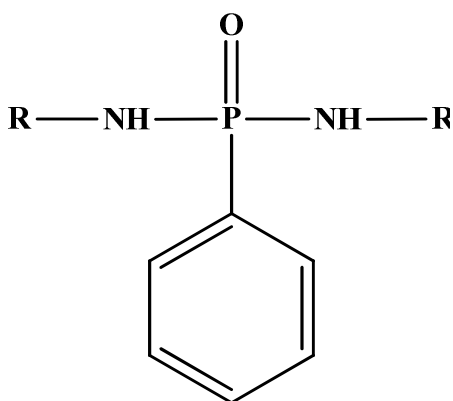
Les chaînes latérales peuvent également être l'objet d'altérations oxydatives (Davies *et al.*, 1987). On retiendra sommairement que les conséquences de ces altérations peuvent prendre la forme de fragmentations de la chaîne, de dimérisations ou d'agrégations intra ou interchaînes, de ruptures des liaisons disulfures ou encore de formations d'espèces radicalaires (groupements thiyles ou peroxydes par exemple). Dans ce dernier cas, la formation d'espèces radicalaires peut être à l'origine de réactions en chaînes aboutissant notamment à l'oxydation d'autres macromolécules comme l'ADN, les lipides et les autres protéines (Davies, 1996 ; Gebicki et Gebicki, 1999 ; Hawkins et Davies, 2001 ; Salvi *et al.*, 2001 ; Davies, 2005). Ainsi, plusieurs études ont montré que l'oxydation d'acides aminés présents dans la partie hydrophobe d'une protéine (c'est-à-dire, ceux qui sont enchâssés au centre de celle-ci), peuvent aboutir à des changements de la structure tertiaire (Davies, 2005).

De même, la rupture ou la formation de ponts disulfures peuvent changer la structure tridimensionnelle de la protéine (Thomas, 1999). Enfin, l'oxydation de certains acides aminés peut influencer sur la dégradation des protéines. Ces altérations de la structure moléculaire des enzymes peuvent alors réduire l'affinité de ces protéines envers leur substrat, affecter le site actif de l'enzyme de sorte que l'action catalytique soit perdue, ou bien encore abaisser la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (Beatty *et al.*, 1980 ; Levine, 1983 ; Charron *et al.*, 2000).

Nous ne pouvons que formuler des hypothèses quant à l'origine de ces observations. Cependant, au regard de la littérature, il semble probable que les mécanismes suggérés (dommages oxydatifs, action directe des xénobiotiques qui seraient capable d'induire une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène de manière rapide sur les cellules) aient effectivement été mis en jeu. A partir de ces données, il convient de se poser la question suivante :

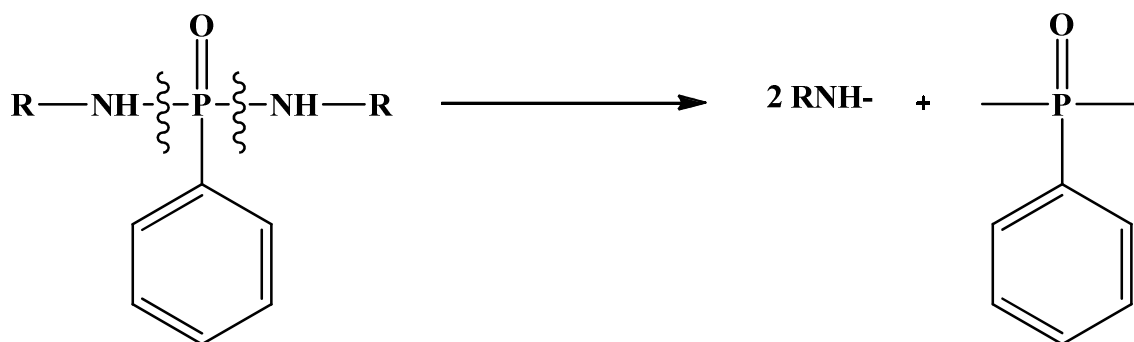
### Quel est le mode d'action des molécules sur les paramécies?

Après la fin du traitement des cultures cellulaires par les phosphoramidates testés (figure 33), nous avons analysé les molécules par une étude structurale en résonance magnétique nucléaire.



**Figure 33. Structure des phosphoramidates testés.**

Les molécules testées contenant deux sites actifs; le motif phosphonate (P=O) et l'amine (NH). La dégradation des molécules est confirmée par le spectre RMN, la disparition du signal du proton porté par l'azote a été observée. Nous avons proposé pour cette biodégradation le mécanisme suivant (Figure 34):



**Figure 34. Mécanisme de biodégradation des deux molécules testées.**

Nous savons que les systèmes enzymatiques de détoxification utilisent des molécules d'O<sub>2</sub> pour leur activité, il en est ainsi des mono-oxygenases et des oxydases (Lagadic *et al.*, 1997 ; Bounias, 1999 ; Youbi, 2005) ceci nous amène à nous poser la question suivante :

### **Quels sont les effets des deux xénobiotiques sur le métabolisme respiratoire ?**

Il semble évident que l'oxygène est un élément indispensable pour la vie des micro-organismes, ainsi au moment de l'élimination des xénobiotiques, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les cytochromes P450 (CYP450), vont réagir avec l'oxygène (Guengerich, 1991). L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui échappent à la chaîne respiratoire (Cadenas *et al.*, 1977). En effet il est connu que la mitochondrie est le site principal de génèse des ROS. La combinaison directe de l'oxygène apporté aux cellules avec ces électrons implique la formation des anions superoxydes qui sont à l'origine des phénomènes radicalaires, ces derniers peuvent alors dismuter soit spontanément, soit de façon enzymatique pour donner de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle °OH, le plus réactif des radicaux oxygénés libres (ROL).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une diminution du métabolisme respiratoire des paramécies traités par les différentes concentrations du PA-A et PA-B par rapport aux cellules témoins, et ce à partir de 18h de traitement.

Parallèlement, nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité CAT pour la molécule PA-A toujours à partir de 18h de traitement. En effet à 18h de traitement l'activité CAT est au maximum, ceci n'est guère surprenant puisque nous savons que la catalase joue donc un rôle dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant et constitue avec la SOD la première ligne de défense (Ribera *et al.*, 2001) bien que la stimulation de la consommation d'O<sub>2</sub> observée dans notre travail particulièrement aux premiers temps de traitement peut s'expliquer par la mise en route de la première phase de métabolisation à savoir

la phase de fonctionnalisation qui fait intervenir les monooxygénases à CytP450 pour fixer un atome d'O<sub>2</sub> sur le substrat.

Le même processus a été observé pour la molécule PA-B, sauf que le déclenchement du système de détoxification intervient beaucoup plus précocement, à savoir dès 6h de traitement.

---

## *Conclusion & Perspectives*

---

Le protiste cilié utilisé dans notre travail occupe une position privilégiée dans les écosystèmes aquatiques, notamment par ce qu'il constitue à la fois l'un des éléments de base des réseaux trophiques et un modèle alternatif de choix pour l'étude de l'impact de la pollution sur notre environnement.

Les deux xénobiotiques testées sur nos cellules sont des molécules issues d'une synthèse de phényl phosphorodiamidates dérivés d'amines primaires (benzylamine et phényl éthyl amine) avec le phényl dichlorophosphonique en une seule étape, et c'est donc sur la base du constat d'un manque de connaissances concernant l'interaction phosphoramidates/protiste cilié que notre travail de recherche a été initié, et divers essais ont été conduits, avec un nouveau bilan pouvant être proposé aujourd'hui.

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'isolement d'une seule cellule afin de réaliser une culture pure de *Paramecium sp.* ce qui nous a permis par la suite d'identifier nos paramécies. En effet, leur forme, leur taille ainsi que les deux micronucleus confirment qu'il s'agit de *Paramecium aurelia*.

Cette étude montre l'intérêt de *Paramecium sp.* comme espèce modèle cellulaire pour l'évaluation de la toxicité des composés organophosphorés, particulièrement les phosphoramidates. Ainsi, au terme de notre travail, nous avons déterminé la cytotoxicité des xénobiotiques testés dont la synthèse avait pour but d'obtenir deux composés organophosphorés moins toxiques que ceux utilisés dans l'industrie vis-à-vis de notre modèle biologique. Cette toxicité se manifeste par la perte de linéarité de la trajectoire et une perturbation de la mobilité. D'un autre côté, la présence des deux xénobiotiques testés induit également une inhibition dose-dépendante de la croissance cellulaire, une diminution du taux de croissance cellulaire et une augmentation du temps de génération, et ce après 24h de traitement, mettant ainsi en évidence une cytotoxicité des xénobiotiques testés.

En ce qui concerne l'étude des biomarqueurs d'exposition nous avons mis en évidence le déclenchement d'une batterie de processus enzymatiques telles que la stimulation de l'activité CAT et GST connus pour leur rôle dans la détoxification ainsi qu'une augmentation du taux de protéines totales et du taux de GHS.

## *Conclusion & Perspectives*

Une perturbation du métabolisme respiratoire confirmant ainsi l'effet de ces molécules sur la chaîne respiratoire mitochondriale citée dans la bibliographie. En conclusion, nous pouvons d'ores et déjà avancer que la molécule PA-B semble plus active que la molécule PA-A. En effet les résultats obtenus révèlent que PA-B est 10 fois plus toxique que PA-A ainsi il semblerait que la présence du radical benzylamine confère à la molécule la toxicité que nous avons pu mettre en évidence, contrairement au radical cyclohexylamine qui a été fixé sur la molécule PA-A comme nous le montrons sur le schéma récapitulatif suivant (Figure 35) :

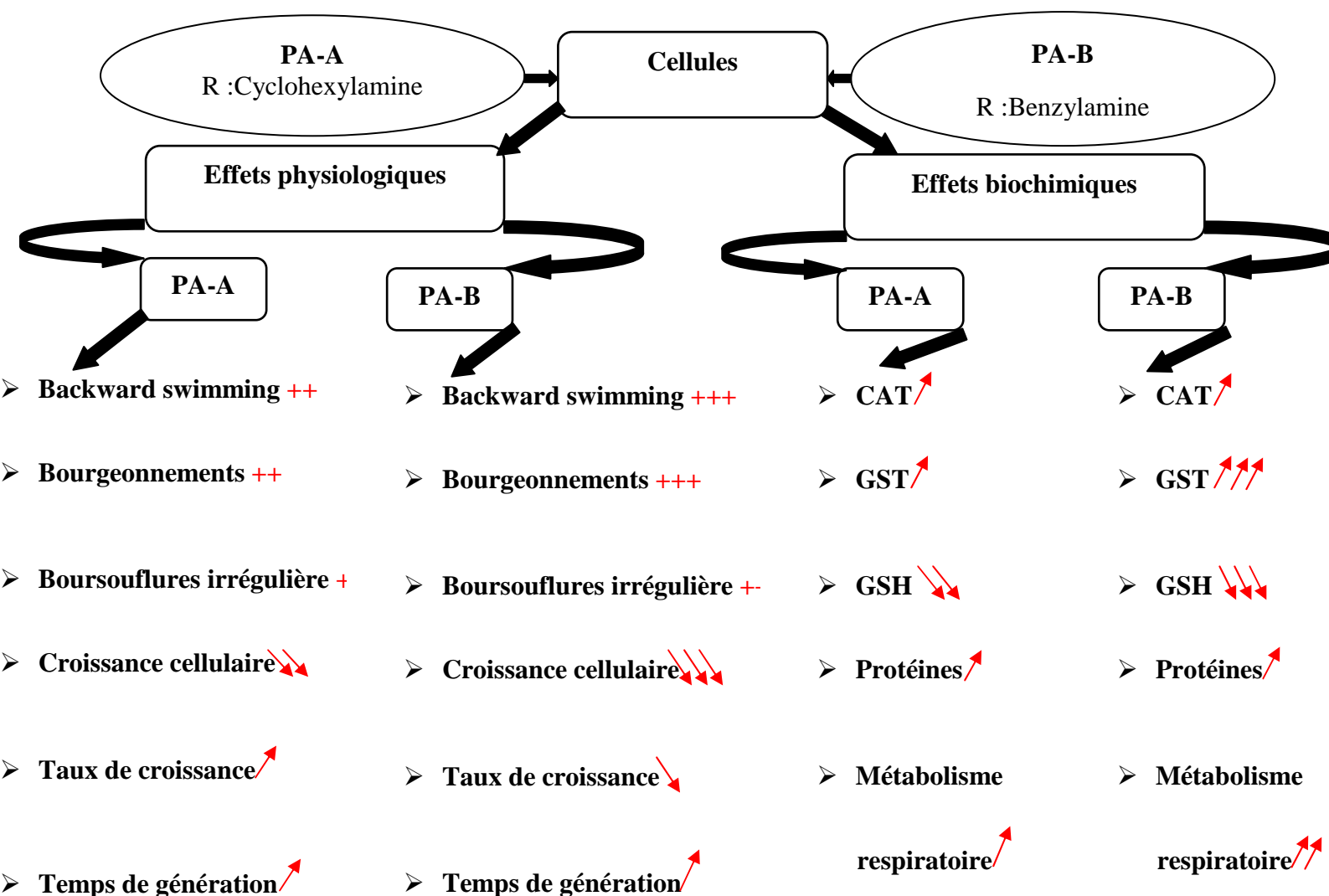
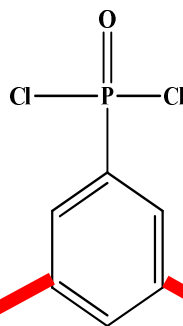


Figure 35. Effets physiologiques et biochimiques des phosphoramidates observés.

## Conclusion & Perspectives

Au terme de ce travail, nous proposons l'hypothèse suivante résumée dans la figure(36) :

### Phosphoramidate commercialisé



PA-A  
 $C_{18}H_{29}N_2OP$

PA-B  
 $C_{20}H_{21}N_2OP$

Boursouflures

PA-A  
PA-B

Protéines

Transcription

Stress oxydatif

$O_2 + H_2O$

$H_2O_2$

CAT

GSSH

GSH

GST

GS-PA

Elimination

Radicaux Libres

$Ca^{2+}$

Perturbation  
du mouvement

Mort cellulaire ?

Figure 36. Mécanisme d'action des PA-A et PA-B selon Benbouzid et Berrebbah, 2012.

---

## *Conclusion & Perspectives*

---

En perspectives, il serait intéressant :

- D 'élargir les tests de cytotoxicité sur des cellules animales en culture ;
- Analyser de manière fonctionnelle les entités moléculaires induites par le stress chimique et, identifier et caractériser les gènes impliqués dans les processus mis en jeu dans la signalisation des stress chimiques et/ou dans la régulation de la réponse cellulaire ;
- Etudier le devenir de ces toxiques, leurs différentes formes de stockage (spéciation), afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la concentration et de la biotransformation de ces éléments au niveau cellulaire ;
- Etablir un répertoire de gènes jouant un rôle important dans la tolérance des cellules aux xénobiotiques afin de développer, à long terme, une approche biotechnologique de bioremédiation qui consisterait en particulier à produire des cellules susceptibles d'accumuler, en grandes quantités, des xénobiotiques, et qui pourraient être utilisées pour la dépollution des eaux contaminées.

---

## *Références Bibliographiques*

---

**Abbott, W.S.; 1925:** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol.* 18: 265-267.

**Adl S.M. et al.; 2005:** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399-451.

**Amaroli, A., Trielli, F.; Sifredi F.; Chessa, MG. & Delmonte Corrado, MU.; 2010:** Nitric oxide production inhibited by xenobiotic compounds in the protozoan *Paramecium primaurelia*. *Ecological Indicators*, Vol.10, No.2, pp. 212-216, ISSN 1470160x.

**Amiard J-C., Caquet T.and Lagadic L. ; 1998 :** Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, edited by par L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard and F. Ramade (Paris: Lavoisier, Technique et Documentation), pp. XXI-XXXI.

**Armstrong R.N.; 1991:** Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), 131-140.

**Bainy A.C.D., Saito E., Carvalho P.S.M. et al.; 1996:** Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site, *Aquatic Toxicology*, 34 (2): 151-162.

**Barillet S.; 2007.** Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.

**Beal D.L. and Anderson R.V.; 1993 :** Response of Zooplankton to retenone in a small pond.*Bull.Environ.Contam.Toxicol.*51 : 551-556.

**Beatty K., Bieth J. and Travis J., 1980:** Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin, *Journal of Biological*.

- Beaumont et Cassier ; 1998** : Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3<sup>ème</sup> édition DUNOD, pp : 123-143.
- Beckett G.J. and Hayes, J.D.; 1993**: Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, **30**, 281-380.
- Beisson J., Be´termier M., Bre´ M., Cohen J., Duharcourt S., Duret L., Kung C., Malinsky S., Meyer E., Preer J.R. et al.; 2010**: *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. Cold Spring Harb. Protoc., 2010, pdb.emo140.
- Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. & Djebbar M.R.; 2012**: Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2012, 1–9.
- Bennett J. and Cabbage J.; 1992**: Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. of Ecology, Olympia, WA. 29pp.
- Berrebbah H.; 1990** : Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l’Université Pierre et Marie Curie, Paris VII : 144 pages.
- Bonnet J.C., Vrillon, J.L., 1990**. L’escargot *Helix aspersa* biologie – élevage. Edition INRA, 14-15.
- Boscolo R. and Roychowdhury V. P.; 2003**: On the Uniqueness of the Minimum of the Information-Theoretic Cost Function for the Separation of Mixtures of Nearly Gaussian Signals”. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Independent Component Analysis and Blind Signal Separation (ICA2003)*, 137--141, Nara, Japan.
- Bounias M.; 1999**: Traité de Toxicologie Générale, Edition Springer, pp: 58-583.
- Bradford M.M.; 1976**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.

- Brown J.H., Gillooly J.F., Allen A.P., Savage V.M. and West G.B.; 2004:** Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85: 1771–1789.
- Cadenas E. and Sies H., 1985:** Oxidative stress: Excited oxygen species and enzyme activity, *Advances in Enzyme Regulation*, 23: 217-237.
- Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I. and Stoppani A.O.M.; 1977 :** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reduction from beef heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, 248-257.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M. and Gallo, G., 1999:** Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, **46**, 67-76.
- Cavalier Smith T. and Chao E.E.Y.; 2003:** Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154: 341-58.
- Chapman P.M.; 2001:** Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* 463, 149–169.
- Charron R.A., Fenwick J.C., Lean D.R. et al., 2000:** Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Photochemistry and Photobiology*, 72 (3): 327-333.
- Cohen J.; 2007:** Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.). Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.
- Cohen J.; 2008 :** Utilisation de la paramécie comme modèle unicellulaire pour l'étude de la fusion membranaire exocytotique. *C.N.R.S., Centre de génétique moléculaire, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.*
- Corliss J. O., Lacy D. And Palay S. O.; 1961:** Fixing and staining of Protozoa in the *Microtomist's Vade-Mecum* (Bolles-Lee). London, *XII e* ed.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C. et al., 1997 :** Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques, *in* Masson, ed., *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamentaux*: Paris, p. 149-164.

**Cudmore Larison David & Charles, Newton Abbot; 1977:** The Center of Life, A Natural History of the Cell.

**Dagnelie P.;1999:** Statistique théorique et appliquée. Tome 1. Statistique descriptive et bases de l'inférence statistique. Paris et Bruxelles, De Boeck et Larcier, 508 p.

**Dajoz R. ; 1969 :** Contribution a L'Étude des Coléoptères Mycetophagidae. II - Un Coléoptère Mycetophagidae nouveau du Brésil: Caserus convexus. Bulletin de la Société Entomologique de France 74:79-81.

**Davies K.J.; 1987:** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9895-9901.

**Davies K.J. and Delsignore M.E.; 1987:** Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, Journal of Biological Chemistry, **262** (20): 9908-9913.

**Davies K.J., Delsignore M.E. and Lin S.W.; 1987:** Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids, Journal of Biological Chemistry, 262 (20): 9902-9907.

**Davies M.J.; 1996:** Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage, Archives of Biochemistry and Biophysics, 336 (1): 163-172.

**Davies M.J.; 2003:** Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, Biochemical and Biophysical Research Communications, 305 (3): 761-770.

**Davies M.J. ; 2005:** The oxidative environment and protein damage, Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1703 (2): 93-109.

**DeLeve L.D. and Kaplowitz N.; 1991:** Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity, Pharmacology and Therapeutics, **52** (3): 287-305.

**Depledge M.H.; 1994:** The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools, *in* M. C. Fossi, and C. Leonzio, eds., Nondestructive biomarkers in vertebrates: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, p. 261-285.

- Dias N., Mortara R.A. and Lima N.; 1999:** Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100 in vitro : 1-9.
- Di Giulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J. et al.; 1989:** Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1103-1123.
- Dickinson, D. A., Forman, H. J.; 2002:** Cellular glutathione and thiols metabolism *Biochemical pharmacology*, **64**, 1019-26.
- Djebar M.R. et Djebar H.; 2000:** Bioénergétique, les mitochondries végétales. *Revue des Sciences et Technologies. Synthèse : publication de l'université de ANNABA. Edition Végator*, pp : 103.
- Douglas K.T.; 1987:** Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes". *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **59**: 103–67.
- Druez D., Marano F., Calvayrac R., Volochine B. and Soufir J.C.; 1989:** Effect of gossypel on the morphology, mobility and metabolism of a flagellated protist, *Dunaliella bioculata*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 21(2): 367-374.
- Einicker-Lamas M., Mezian G.A., Fernandes T.B., Silva F.L.S., Miranda K., Attia M. and Oliveira M.M.; 2002:** *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environment Pollution*, 120: 779-786.
- Faure-Frémiot; 1924:** Contribution à la connaissance des infusoires planctoniques. *Bull. Biol. Fr. Belg., suppl.* 6 : 1-171.
- Finney D.J.; 1953:** *Probit Analysis*, second ed. England: Cambridge University Press.
- Firn R.; 2003:** Strategies for the control of Pest and Diseases. M. 730 Lecture 4, University of New York.
- Forbes V.E., Palmqvist A. and Bach L.; 2006:** The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (1): 272-280.

- Fulop F., Frro E., Martinek T., Gunther G. et Sillanpaa R. ; 2000:** *J. Mol. Str.*, 554, 119-125.
- Gebicki S. et Gebicki J.M.; 1999:** Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides, *Biochemical Journal*, 338 (3): 629-636.
- Génoscope; 2007:** Centre National de Séquençage. France.
- George G.S. and Bouchanan G.; 1990:** Isolation, properties and incubation of plaice liver cytosolic glutathion S-transférase. *Fish. Physiol. Biochem.*, 8(6): 437-449.
- Giesy, J.P. and Hoke, R.A.; 1989:** Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection. *J. Great Lakes Res.* 15:539-569.
- Gräf F. and Stahr K.; 1999:** A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER). In: Atlas of Benin and Niger.
- Guengerich F.P.; 1991:** Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. Minireview. *J. Biol Chem.*, 266, 10019-10022.
- Habig W., Bhaimi A., Zekhnini A. , Narbonne J.F. , Mathieu M. and Moukrim A.;1997 :** Etude du cycle de reproduction de deux espèces de moules *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* dans la baie d'Agadir (sud du Maroc). *Haliotis* 26 : 51-62.
- Hawkins C.L. et Davies M.J. ; 2001:** Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1504 (2-3): 196-219.
- Honigberg ; 1964:** Morphology and evolution of Ciliophora. III. Diagnoses and Phylogenesis of 53 Saproelbiontes mainly of the order Heterotrichida. *Arch. Protistenk.*, 107 : 185-294.
- Huggett R.J., Kimerie P.M., Mehrle JR & Bergman H.L.; 1992:** Biomaekers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers, pp: 347.
- Jaeschke H.; 1995:** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 209, 104-111.

- Kahl A.; 1930-1935:** Wimpertiere Oder Ciliata (Infusoria) *in: Dahl Tierwelt Deutschlands Jena. G. Fischer* (19, 21, 25, 26).
- Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Kohler H.R., Simonsen V., Triebkorn R. and Weeks J.M.; 2000:** Biomarkers in terrestrial for ecotoxicological soil risk assesement. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol 164. G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/New York/NY 10010, Springer-Verlag. 93-147.
- Kamola Z.; 1995:** Notes on the Use of Invertebrates,espacially Ciliates, in Studies on Pollution and Toxicity.*Folia biologica(Krakow)*, vol 43, No 1-2.
- Kondo T., Dale G.L. et Beutler E.; 1980:** Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77** (11): 6359-6362.
- Kosmala, A.; Charvet, S.; Roger, M.C. and Faessel, B.; 1999:** Impact assesment of a wastewater treatment plant effluents using in stream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Res.*, **33**(1), 266-278.
- Lagadic L., Caquet T. et Amiard J.C. ; 1997 :** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions, *in* Masson, ed., *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects fondamenaux*: Paris, p. 1-10.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F.; 1997:** Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux. Edition Masson, pp: 33-53-97.
- Levine R.L.; 1983:** Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue, *Journal of Biological Chemistry*, **258** (19): 11823-11827.
- Livingstone D.R.; 2001:** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, *Marine Pollution Bulletin*, **42** (8): 656-666.
- Marchese M.R. & Brinkhurst R.O.; 1996:** A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* **334**: 163-168.

- Martin J.W.; 2003:** NHM and Smithsonian researchers team to study marine biodiversity. *The Naturalist* : 9.
- 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) : 983.
- Matsumura F.; 1975:** Toxicology of insecticides. Plenum Press, N.Y.
- Meyer E et Beisson J. ; 2005 :** Épigénétique: la paramécie comme modèle d'étude. *MEDECINE/SCIENCES n° 4, vol; 21 : 377-83.*
- McCarthy J.F.; 1990:** Concluding remarks: Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program., *in* J. F. McCarthy, and L. R. Shugart, eds., *Biomarkers of Environmental Contamination*: Boca Raton, FL, USA, Lewis, p. 429-440.
- McCarthy J.F. and Shugart L.R.; 1990:** Biological markers of environmental contamination, *in* J. F. McCarthy, and L. R. Shugart, eds., *Biomarkers of environmental contamination*: Boca Raton, FL, USA, Lewis Publishers, p. 3-16.
- McPherson CA, Chapman PM.; 2000:** Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40:656-665.
- Mehellou Y., McGuigan C. et Jan Balzarinib A. B.;2007:** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett* ., 17, 3666–3669.
- Meneghini R.; 1997:** Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 783-792.
- Nivsarkar M., Gupta A. K. and Kaushik M.P.; 2004:** *Tetrahedron Lett.*, 45, 6863–6866.
- Nzengue Y. ; 2008 :** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium , du cuivre et du zinc : place des métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France .299 p.

**Otto D.M.E. and Moon T.W.; 1995:** 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl effects on antioxidant enzymes and glutathione status in different tissues of rainbow trout. *Pharmacol Toxicol* **77**: 281-287.

**Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S. and Vernet G.; 2000:** Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate, *Aquatic Toxicology*, **50** (1-2): 109-124.

**Patterson D. J.; 1999:** The diversity of eukaryotes. *American Naturalist* 154: S96-S124.

**Peakall D.; 1994:** Biomarkers: the way forward in environmental assessment, *Toxicology and Methods in Enzymology*, 105: 445-451.

**Pelmont, J. ; 1995 :** *Enzymes, catalyseurs du monde vivant* (Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble), 1039 p.

**Perez-Rama M., Abalde A.J., Herrero L.C. and Torres E.; 2001:** Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(9): 2061-2066.

**Peccinni E., Staudenmann W., Albergoni V., Gabrieli R.D. and James P.; 1994:** Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*, 226: 853-859.

**Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., Tata V.D. and Casini A.F.; 2003:** The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1499-503.

**Purves W.K. ; Orians G.H. ; Heller H.G. et Sadava D.; 2000:** *Le monde du vivant*, 2<sup>ème</sup> édition Flammarion, pp : 552-577.

**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.

**Regoli F., Nigro M. And Orlando E.; 1998:** Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol*, **40**, 375-392.

**Rouabhi R., Djebbar-Berrebbah H., and Djebbar M.R.;2007:** Evaluation of toxicity of two pesticides: Flucycloxuron and Diflubenzuron on a cellular model, *Paramecium sp. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 71/2a, 2006:* 83-90.

**Rouabhi R.; Djebbar H. & Djebbar, M.R.; 2009:** Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. *Am-Euras. J. Toxicol. Sci.* Vol., 1(2). September 2009. 74-80. ISSN: 2079-2050; EISSN: 2079-2069.

**Saez, G.T., Bannister, W.H. and Bannister, J.V.; 1990:** Free radicals and thiolcompounds: the role of glutathione against free radical toxicity.CRC Press, Boca Raton, 237–254.

**Salvi A., Carrupt P.-A., Tillement J.-P. et al.; 2001:** Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding, *Biochemical Pharmacology*, 61 (10): 1237-1242.

**Sauvant M.P., Pepin D. and Piccini E.; 1999:** Tetrahymena pyriformis.A tool for toxicological studies.*Chemosphere*, 38(7) : 1631-1669.

**Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Smaghe G. and Djebbar MR.; 2009:** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci.* 1: 13-18.

**Sies H., Gerstenecker C., Menzel H. et al.; 1972:** Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides, *Federation of European Blochemical Societies Letters*, **27** (1): 171-175.

**Sies H. and Akerboom T.P.M., 1984:** Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues, *Methods in Enzymology*, **105**: 445-451.

**Srivastava S.K. and Beutler E.; 1969:** The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate, *Biochemical Journal*, 114 (4): 833-837.

**Stadtman E.R.; 1990:** Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences, *Free Radical Biology and Medicine*, **9** (4): 315-325.

**Stegeman J.J., Brouwer M., Digiulio R.T., Frlin L., Fowler B.A., Sanders B.M. and Van Veld P.A.; 1992:** Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers, pp: 235-335.

susceptibility to enzymic hydrolysis, *Biochemical Journal*, 234 (2): 399-403.

**Suarez G., Sierra J. C., Erova T. E., Sha J., Horneman A. J. & Chopra A. K. ; 2010 :** A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol* 192, 155–168.

**Swaroop, S.; 1966:** Statistical methods in malaria eradication, Geneva, World Health Organization (Monograph Series, No. 51).

**Taylor E.J., Maund S.J. and Pascoe D; 1991:** Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* Meigen (Insecta: Diptera) and *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea: Amphipoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21: 371–76.

**Thacker J.R.M.; 2002:** An introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge University Press, Cambridge.

**Thomas J.A.; 1999:** Oxidative stress - Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stress.

**Tye H., Eldred C. and Wills M.; 2002:** *Tetrahydron lett.*, 43, 155-158.

**Van Der Oost R., Beyer J. and Vermeulen N.P.E.; 2003:** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13 (2): 57-149.

**Van Emden H.F. & Service M.W.; 2004:** Pest and control vector. Cambridge University Press, Cambridge.

**Venkateswara Rao, J.; 2006:** Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on biochemical parameters of tilapia *Oreochromis mossambicus* *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 143:492 – 498.

**Viguie C.A., Frei B., Shigenaga M.K., Ames B.N., Packer L. and Brooks G.A.; 1993:** Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J. Appl. Physiol.*, 75, 566-572.

**Ware G.W.; 1991:** Fundamentals of pesticides. A self-instruction guide. 3<sup>rd</sup> edition. Thomson Publishing, Fresno, CA.

**Weeckbeker G. and Cory J.G.; 1988 :** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 Cells in vitro, 40, 257-264.

**Wehner et Gehring; 1995:** Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive. Deboeck Université.Thieme Verlag, pp : 286-287.

**Wenning R.J., Di Giulio R.T. and Gallagher E.R., 1988:** Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Aquat. Toxicol.* 12:157-170.

**Wenrich D.H.; 1928:** Eight well defined species of *Paramecium*. *Trans. Amer. Micr.SOC.*, 47 : 274-282.

**WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS); 1993:** Environmental Health Criteria 155 - Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles, Geneva, World Health Organization.

**Wichterman N.R.; 1953:**The Biology of *Paramecium*. *Blakiseon* (Pa), 527 p.

**Winston G.W. and Di Giulio R.T.; 1991:** Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquatic Toxicology*, 19 (2): 137-161.

**Woese C.R., Olsen G.J., Ibba M. and Soll, D.; 2000:** Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev*, pp: 64.

**Wolff S.P. and Dean R.T., 1986:** Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis, *Biochemical Journal*, 234 (2): 399-403.

**Wong C.K., Cheung and Ming-Ho Yo.; 1999:** Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environmental pollution*, 105 : 175-183.

**Wood A.; 2004:** Compendium of Pesticide Common names. [http://www.alanwood.net/pesticides/class\\_pesticides.html](http://www.alanwood.net/pesticides/class_pesticides.html).

**X; 2000:** Minitab reference manual, release 12-21 for windows. PA State College, Minitab, 1047 p.

**Yangl G., Zhao'l K. and Landry D. W ; 1998 :** *Tetrahedron Lett.*, 39 , 2449-2450.

**Yikang W. and Xin S; 2000:** *Tetrahedron Asymm.*, 11, 4359.

**Youbi M.; 2005:** Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse de Magister de l'Université Badji Mokhtar de Annaba.