



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité : Toxicologie

Intitulée

**Activités biologiques et génotoxicité de trois
amidophosphonates de synthèse chez des organismes
unicellulaires**

Présentée par : M^{me} Amina SAIB

Membre de Jury :

Mohamed Réda DJEBAR	Pr	Président	Université d'Annaba.
Houria BERREBAH	Pr	Directrice de thèse	Université d'Annaba.
Linda SOUIKI	M.C.A	Examinatrice	Université de Guelma.
Youcef HAMDI-PACHA	Pr	Examineur	INV, Alger
Malika BERREDJEM	Pr	Invitée	Université d'Annaba.

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Cette thèse est un moment très important de ma vie, parce que d'une part c'est un aboutissement de mon cursus universitaire et d'autre part c'est un rêve d'enfant qui se réalise. Bien entendu, je n'ai pas fait ce travail seule et à ce titre je voudrais remercier en espérant que je n'oublierai personne tous ceux qui y ont contribué.

Ces recherches ont été effectuées au laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba, sous la direction du Professeur **M.R. DJEBAR**. Je tiens à le remercier pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et l'intérêt qu'il a témoigné à mon égard, ainsi que son aide matérielle très précieuse.

Ma reconnaissance va tout particulièrement à Madame **H. BERREBAH-DJEBAR**, Professeur à l'Université de Annaba, qui a assuré la direction de ce travail. L'attention qu'elle a apporté à ma recherche, ses conseils, ses discussions critiques ainsi que sa disponibilité attentive et amicale, ont permis de mener à bien ce travail.

Ces mêmes remerciements s'adressent Monsieur **Y. H. PACHA**, Professeur à l'Université d'Alger et M^{me} **L. SOUIKI**, Maitre de conférences à l'université de Guelma, pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Merci à l'ensemble de ce jury, pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail mais aussi pour vos encouragements, pour vos conseils et vos réflexions.

J'adresse de très sincères, très grands et très nombreux remerciements à Madame **M.BERREDJEM**, Professeur à l'Université d'Annaba (laboratoire de Chimie Organique Appliquée). Je la remercie pour ses conseils et ses réponses à mes multiples questions, pour sa confiance, pour sa gentillesse et sa disponibilité ainsi que sa patience.

Je remercie le professeur **JEAN-PAUL BOURDINEAUD**, pour m'avoir accueillie parmi son équipe de recherche au sein de la station marine D'Arcachon CNRS, UMR EPOC. Je le remercie pour sa gentillesse, son humour, pour ses précieux conseils qui couvrent de larges domaines, pour ses suggestions et ses discussions scientifiques qui m'ont guidé au cours de mon congé scientifique. Je le remercie sincèrement pour la qualité de son aide en biologie moléculaire.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe de ce laboratoire et particulièrement **MARIA GONZALEZ**, pour son aide scientifique, pour son soutien moral et lui exprime tout mon respect.

Un grand merci à mon équipe de recherche, au **Dr. H. BENBOUZID** qui est comme une grande sœur pour moi. Merci pour ton aide, ton encouragement, merci pour tes débats scientifiques et tes réponses à toutes mes questions. Merci à tout ceux qui m'ont soutenu et encouragée : Madame **HENNOUNI, Labiba, Sabrina, Hana, Lynda** et un grand merci à l'équipe de recherche de l'Institut National de la Protection des Végétaux (**INPV**) et à la Directrice M^{me} **N. Amamra**

Je ne peux manquer de rappeler mon immense et éternelle reconnaissance à mes **Parents**, en leur dédiant ce travail. Je les remercie énormément pour les sacrifices consentis, pour l'attention et l'intérêt qu'ils n'ont jamais cessé de m'apporter, pour votre amour qui ne m'a jamais fait défaut, pour vos encouragements, votre soutien, votre aide moral depuis toujours, merci pour tout **MAMAN** et **PAPA**.

J'adresse aussi un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont soutenu durant cette période.

Résumé

La classe des amidophosphonates fait partie des organophosphorés ayant une multitude d'activités biologiques, néanmoins elle peut se révéler toxique pour l'Homme et son environnement. Ainsi, synthèse de nouvelles molécules et l'étude de toxicité se sont livrés à une course effrénée et des tests de toxicité s'avèrent très utiles.

Dans notre travail de recherche, nous avons décrit la synthèse de trois amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) effectuée selon la méthode d'Arbuzov (1906). L'étude de la toxicité de ces trois molécules a été effectuée à travers le suivi des paramètres physiologiques, la polarographie et les biomarqueurs du stress oxydant chez des modèles alternatifs, des micro-organismes ciliés d'eau douce : *Paramecium tetraurelia*.

Nous avons mis en évidence une activité antioxydante (*in vivo* et *in vitro*) ainsi qu'une activité antifongique sur deux souches (*Alternaria tenuis* et *Septoria tritici*). L'impact sur la stabilité de l'ADN génomique a également été abordé et ce en comparaison avec un analogue de structure commercialisé en Algérie : le chlorpyriphos éthyl.

Nos résultats ont révélé une cytotoxicité ; se traduisant par une inhibition de la croissance et une perturbation de la consommation d'O₂. Une perturbation du taux de protéines totales et une augmentation du taux de GSH et de MDA ainsi qu'une diminution de l'activité CAT et GST ont été observés.

Nous avons aussi mis en évidence une activité antifongique plus marquée par la molécule AP3, alors que le potentiel antioxydant semble moins important suggérant un modeste effet protecteur, témoignant ainsi une faible capacité à réduire la disponibilité des agents pro-oxydants.

Quand aux essais génotoxiques, évalués par la méthode RAPD-PCR, ils ont mis en évidence un effet génotoxique des trois molécules. Après 48 heures de traitement les trois amidophosphonates induisent une diminution du nombre de sites d'hybridation pour les deux amorces (OPB10, OPA9), contrairement au chlorpyriphos éthyl qui est à l'origine d'une augmentation du nombre de sites d'hybridation. Cependant après 72 heures, tous les composés testés provoquent des modifications à l'ADN.

Mots clés : *Paramecium tetraurelia*, stress oxydant, activité antifongique, RAPD-PCR, amidophosphonates.

Abstract

The amidophosphonates classes are part of organophosphorus having wide of biological activities, however this class can be toxic and harm human's environment. So, synthesis of new molecules and toxicity studies indulge in a race and toxicity tests are very useful.

In our research, we have described the synthesis of three amidophosphonates (AP1, AP2, and AP3) according to the method of Arbuzov (1906). In addition, we studied their toxicity through physiology, polarography and biomarkers of oxidative stress in freshwater microorganisms ciliated: *Paramecium tetraurelia*. We also highlighted their antioxidant activities (*in vivo* and *in vitro*) and antifungal on two strains (*Alternaria tenuis* and *Septoria tritici*), also, their effects on genomic DNA stability in comparison with a structural analogous marketed in Algeria: chlorpyrifos ethyl.

Our results reveal cytotoxicity among to protists; resulting growth inhibition, followed by O₂ consumption disturbance. Disturbance of total protein content, increase of GSH and MDA levels and decreased of CAT and GST activities was observed. All these disturbances were more pronounced under effects of AP3 and chlorpyrifos ethyl.

In addition, we have demonstrated an antifungal activity more pronounced for AP3 molecule. However, the antioxidant activity reveals a modest protective effect, reflecting a low capacity to reduce pro-oxidants availability.

Genotoxic tests were evaluated by RAPD-PCR method. We observed a genotoxic effect for the three molecules used. After 48 hours of treatment, the three amidophosphonates caused the decrease of hybridization sites number of both RAPD primers (OPB10, OPA9), whereas chlorpyrifos ethyl caused an increase of that number. However, after 72 hours of exposure, all the tested compounds caused modifications for DNA.

Key words: *Paramecium tetraurelia*, oxidative stress, antifungal activity, RAPD-PCR, amidophosphonates.

ملخص

طبقة amidophosphonates هي جزء من الفسفوريات عديدة الأنشطة البيولوجية، هذه الفئة يمكن أن تكون سامة ويمكن أن تضر بالإنسان والبيئة. وهكذا تكون تركيب جزيئات جديدة ودراسات السمية نشارك في سباق كبير واختبارات السمية تعد هامة جدا.

في بحثنا هذا وصفنا تركيب ثلاثة amidophosphonates (AP1، AP2، AP3) ، وفقا لطريقة Arbuzov (1906). درسنا سمية هذه ال amidophosphonates من خلال علم وظائف الأعضاء، تخطيط الاستقطاب والمؤشرات الحيوية عند كائنات حية دقيقة مهدبة المياه العذبة: *Paramecium tetraurelia*.

لقد أثبتنا نشاط مضاد للأكسدة (انفيفو و انفيترو) ومضاد للفطريات على سلالتين (*Alternaria tenuis* و *Septoria tritici*). التأثير على استقرار الحمض النووي الجيني قد نوقش أيضا و ذلك مقارنة مع بنية مشابهة مسوقة في الجزائر: الكلوربيريفوس الإيثيل.

نتائجنا تكشف عن سمية خلوية أدت إلى تثبيط النمو، تليها انقطاع استهلاك الاكسجين، تعطل البروتين الكلي وزيادة في معدل GSH و MDA وانخفاض في نشاط CAT و GST

لقد أثبتنا أيضا نشاط مضاد للفطريات أكثر وضوحا تحت تأثير جزيء AP3 ، والنشاط المضاد للأكسدة يكشف عن تأثير وقائي متواضع، مما يدل على قدرة ضئيلة للحد من توافر الموالية للتأكسد.

بينما الاختبارات السمية الوراثية التي تم تقييمها من قبل RAPD-PCR ، أثبتت سمية وراثية تحت تأثير الجزيئات الثلاثة. بعد 48 ساعة من العلاج تؤدي ثلاث amidophosphonates الى انخفاض في عدد من المواقع التهجين لكلا الاشعال (OPA9, OPB10)، في حين الكلوربيريفوس إيثيل يؤدي إلي زيادة هذا العدد. ومع ذلك، وبعد 72 ساعة، كل المركبات التي تم إختبارها تسبب إحداث تغييرات في الحمض النووي.

الكلمات المفتاحية: اضطرابات الاكسدة، *Paramecium tetraurelia* , نشاط مضاد للفطريات ، RAPD-PCR

amidophosphonates,

Table des matieres	Numéros de pages
REMERCIEMENTS	1
RESUME	4
ABSTRACT	5
RESUME EN ARABE	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
CHAPITRE I – INTRODUCTION GENERALE	
1. Généralités.....	16
2. Mécanisme d’action des organophosphorés.....	18
3. Toxicocinétique des organophosphorés : le système ADME.....	19
4. Les phosphonates.....	20
5. Les amidophosphonates.....	22
Objectifs de l’étude	24
CHAPITRE 2- SYNTHÈSE DES AMIDOPHOSPHONATES MODIFIÉS A PARTIR D’ACIDES AMINES	
1. Introduction	27
2. La réaction d’Arbuzov.....	27
3. Les phosphites	28
3.1. Les trialkyles phosphites	28
3.2. Les dialkyles phosphites.....	26
4. Synthèse des amidophosphonates ou phosphonoacétamides par la réaction de Michaelis-Arbuzov.....	29
4.1. Caractéristiques physico-chimiques des amidophosphonates AP1, AP2, AP3.....	30
4.2. Caractérisation.....	31
5. Structures chimiques des amidophosphonates AP1, AP2, AP3.....	30

CHAPITRE 3- ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET POLAROGRAPHIQUE

1. Introduction	35
2. Matériel et Méthodes	37
2.1. Matériel biologique.....	37
2.1.1. La paramécie.....	37
2.1.2. Morphologie.....	39
2.1.3. Biologie.....	40
2.2. Matériel chimique.....	40
3. Méthodes.....	41
3.1. Culture pure de <i>Paramecium tetraurelia</i>	41
3.2. Traitement des paramécies	41
3.2.1. Cinétique de croissance cellulaire	42
3.2.2. Calcul du pourcentage de réponse	42
3.2.3. Détermination des doses létales médianes (DL ₅₀)	43
3.3. Etude Polarographique.....	43
4. Analyse statistique des résultats	43
5. Résultats	40
5.1. Effets des amidophosphonates sur la croissance des paramécies	44
5.2. Calcul du pourcentage de réponse	45
5.3. Détermination des doses létale médianes (DL ₅₀)	46
5.4. Effets des amidophosphonates sur le métabolisme respiratoire des paramécies.....	47
6. Discussion	48
7. Conclusion	50

CHAPITRE 4- ETUDE BIOCHIMIQUE ET ENZYMATIQUE

1. Introduction	52
Objectif du travail	53
2. Matériel et méthodes	54
2.1. Matériel biologique et chimique.....	54
2.2. Méthodes	54
2.2.1. Dosage des Protéines totales	54
2.2.2. Dosage du glutathion (GSH)	54
2.2.3. Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)	55
2.2.4. Mesure de l'activité Catalase (CAT)	56
2.2.5. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	56

3. Analyse statistique des résultats	57
4. Résultats.....	57
4.1. Effets des amidophosphonates sur le taux des protéines totales.....	57
4.2. Effets des amidophosphonates sur les variations du taux de GSH	58
4.3. Effets des amidophosphonates sur l'activité Glutathion S-transférase	59
4.4. Effets des amidophosphonates sur l'activité catalase.....	60
4.5. Effets des amidophosphonates sur peroxydation lipidique	61
5. Discussion et conclusion.....	62

**CAPITRE 5- EVALUATION FONGITOXIQUE SUR DEUX SOUCHES FONGIQUES
*SEPTORIA TRITICI ET AALTERNARIA TENUIS***

1. Introduction.....	67
2. Matériel et Méthodes.....	68
2.1. Matériel biologique.....	68
2.1.1. Isolement et identification des souches fongiques.....	68
2.2. Matériel chimique	70
2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique.....	70
2.3.1. Choix du milieu de culture.....	70
2.3.2. Evaluation de l'activité antifongique des molécules AP1, AP2 et AP3	70
2.3.2.1 Détermination des diamètres des zones d'inhibitions.....	71
2.3.2.2. Détermination des pourcentages d'inhibitions.....	71
2.3.2.3. Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.....	71
3. Analyse statistique des résultats	72
4. Résultats.....	72
4.1. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP1.....	72
4.2. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP2.....	73
4.3. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP3.....	74
4.4. Détermination des pourcentages d'inhibition.....	75
4.5. Détermination des CMI.....	76
5. Discussion	77
6. Conclusion.....	78

CHAPITRE 6- EVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES AMIDOPHOSPHONATES

1. Introduction.....	80
1.1. Sources cellulaires des EOR.....	81
1.2. Stress oxydant et ses conséquences biologiques	81
1.3. Systèmes de défenses antioxydants.....	82
Objectif du travail.....	82
2. Matériel et Méthodes.....	83
2.1. Matériel biologique.....	83
2.2. Matériel chimique	83
2.3. Méthodes	84
2.3.1. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> : effet piègeur du radical DPPH.....	84
2.3.2. Etude de l'activité antioxydante <i>in vivo</i>	84
3. Analyse statistique.....	85
4. Résultats.....	86
4.1. Etude <i>in vitro</i> : Effet piègeur du radical DPPH.....	86
4.2. Etude <i>in vivo</i> : Effets des différentes amidophosphonates sur les défenses antioxydantes des paramécies	87
5. Discussion.....	89
6. Conclusion.....	91

CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA CONTAMINATION AUX AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR

1. Introduction	93
1.1. Les voies de réparation de l'ADN.....	96
1.2. Le génome de la paramécie.....	97
2. Matériel et Méthodes.....	97
2.1. Conditions d'expositions.....	97
2.2. Préparation de l'ADN génomique de <i>Paramecium tetraurelia</i>	98
2.3. Sélection des amorces	98
2.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD)	99
2.5. Analyse des produits PCR	100
3. Analyse statistique.....	103

4. Résultats : Effet des amidophosphonates sur la stabilité du génome de la paramécie.....	104
5. Discussion et conclusion.....	105
CONCLUSION GENERALE.....	108
PERSPECTIVES.....	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	111

Liste des figures

Titres	Numéros de pages
Figure 01. Structure générale des organophosphorés (Costa, 2006).	16
Figure 02. Structures chimiques de certains pesticides organophosphorés.....	17
Figure 03. Structure chimique d'un phosphate et d'un phosphonate.....	20
Figure 04. Structures chimique des anti-inflammatoires contenant le motif phosphonate.....	21
Figure 05. Structures chimiques des cyclopropyl-phosphonates.....	21
Figure 06. Structure chimique de pyrrole phosphonate.....	21
Figure 07. Structures chimique des aminophosphonates.....	22
Figure 08. Structures chimiques de quelques amidophosphonates ayant une activité biologique....	23
Figure 09. Réaction d'Arbuzov.....	27
Figure 10. Mécanisme réactionnel de la réaction d'Arbuzov.....	28
Figure 11. Addition de triéthylphosphite sur un dérivé halogéné.....	28
Figure 12. Equilibre phosphonate / phosphite.....	29
Figure 13. Addition de diéthylphosphite sur un dérivé halogéné.....	29
Figure 14. Mécanisme réactionnel de la réaction d'Arbuzov.....	30
Figure 15. Structures chimiques des trois amidophosphonate de synthèse.....	33
Figure 16. Présentation de la paramécie A- Vue d'une paramécie en microscopi électronique à balayage, la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence (anticorps anti-tubuline). B- Paramécie vue en contraste de phase (Gogendeau, 2005)	38
Figure 17. Structure d'une paramécie selon Brugerolle (1986)	38
Figure 18. Structure détaillée d'un cil et d'un trichocyste observés sous microscope électronique à transmission), x 5 300 (Cohen <i>et al.</i> , 1988).....	39
Figure 19. Structure détaillée du noyau de la paramécie observé sous microscope électronique à transmission, x 8 500 (Cohen <i>et al.</i> , 1988).....	39
Figure 20. Effets des amidophosphonates sur la croissance des paramécies en fonction du temps.....	44
Figure 21. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des amidophosphonates (AP1, AP2, AP3)	45
Figure 22. Effets des amidophosphonates sur le métabolisme respiratoire....	47

Figure 23. Effets des amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) sur les variations du taux de protéines totales en fonction du temps.....	57
Figure 24. Effets des amidophosphonates sur le taux de GSH en fonction du temps.....	58
Figure 25. Effets des amidophosphonates sur les variations de l'activité GST.....	59
Figure 26. Variation de l'activité catalase en fonction du temps et des différents amidophosphonates chez les paramécies.....	60
Figure 27. Effets des amidophosphonates sur la variation du taux d MDA.....	61
Figure 28. Isolement et identification des souches fongiques: (A) <i>Septoria tritici</i> , (B) <i>Alternaria tenuis</i>	68
Figure 29. Conidiophores et spores d' <i>Alternaria tenuis</i> sous microscope photonique (G×60).....	69
Figure 30. Spores de <i>Septoria tritici</i> sous microscope photonique (G×60).....	69
Figure 31. Traitement des souches étudiées : (A) <i>Alternaria tenuis</i> , (B) <i>septoria tritici</i>	70
Figure 32. Cibles biologiques et dommages oxydatifs induits par les EOR (D'après Kohen et Nyska, 2002).....	81
Figure 33. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses enzymatiques (D'après Pincemail <i>et al.</i> , 2002).....	82
Figure 34. Structure du DPPH (Molyneux ,2004).....	84
Figure 35. Effet piègeur des amidophosphonates vis-à-vis du radical DPPH pour le test <i>in vitro</i>	86
Figure 36. Les différents types de lésions primaires de l'ADN (Cachot et Dégremont, 2009)	94
Figure 37. Conséquences des cassures de brin de l'ADN (Jha, 2008).....	95
Figure 38. Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR)	100
Figure 39. Courbe de dissociation théorique de l'ADN	101
Figure 40. Courbe de dissociation théorique de l'ADN	102

Liste des tableaux

Tableaux	Numéros de pages
Tableau 01. Récapitulatif des paramètres étudiés selon les objectifs du programme de recherche	25
Tableau 02. Caractéristiques physico-chimiques des amidophosphonates nouvellement synthétisés AP1, AP2, AP3	30
Tableau 03. Valeurs des DL50 et du Slope de chaque amidophosphonates et le chlorpyriphos éthyl	46
Tableau 04. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm± l'écart type) de <i>Septoria tritici</i> et <i>Alternaria tenuis</i> traitées avec la molécule AP1	72
Tableau 05. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm± l'écart type) de <i>Septoria tritici</i> et <i>Alternaria tenuis</i> traitées avec la molécule AP2	73
Tableau 06. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm ± l'écart type) de <i>Septoria tritici</i> et <i>Alternaria tenuis</i> traités avec la molécule AP3	74
Tableau 07. Pourcentage d'inhibition I' (%) d'AP1, AP2 et AP3 vis-à-vis des deux souches testées	75
Tableau 08. CMI des molécules (AP1, AP2 et AP3) en milieu liquide	76
Tableau 09. Effets des différents amidophosphonates sur les paramètres biochimiques des paramécies	87
Tableau11. Nombre de sites d'hybridation par unité de génome, après RAPD-PCR réalisée sur l' DNA génomique de <i>Paramecium tetraurelia</i> témoin et traitées avec les amidophosphonates	104

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE

1. Généralités

Le terme pesticide est un terme générique qui regroupe plusieurs familles de produits dont l'usage est différent. Il s'agit des insecticides, des herbicides, des fongicides et des produits algicides (Das *et al.*, 2003 ; Ayela *et al.*, 2007). Les principales molécules actives appartiennent à plusieurs classes chimiques qui diffèrent par leur mode d'action et leur toxicité. Outre ces classes chimiques très répandues, d'autres molécules existent comme les aldéhydes, les isoxazoles ou encore les herbicides de type phenoxy comme l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4D), très employé du fait de sa sélectivité, ainsi que les urées comme le diuron ou encore les carbamates qui sont des inhibiteurs de l'acetylcholinestérase et les pyréthrine, pesticides sélectifs, présentant une stabilité et une efficacité accrues par rapport aux carbamates et aux organophosphorés. Les molécules insecticides sont véhiculées dans des formulations contenant des agents favorisant la disponibilité de la molécule ou améliorant sa stabilité. Employés pour la protection des cultures et des récoltes en application agricole et domestique, leur usage est fonction des cultures, des conditions climatiques et du type de nuisance à traiter.

La chimie des composés organophosphorés (COP) est née vers 1820 des expériences de Lassaigne qui fit réagir des alcools avec de l'acide phosphorique (fig.01). De nombreuses molécules furent synthétisées mais leur véritable intérêt n'apparut qu'en 1937 lorsque Schraeder mit en évidence les propriétés insecticides et acaricides de ces composés (Cassagne, 1996).

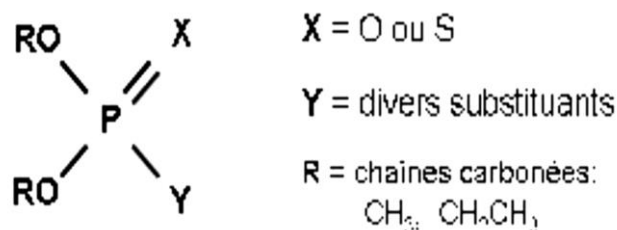


Figure 01. Structure générale des organophosphorés (Costa, 2006).

Les COP ont été utilisés entre 1945 et 1960 pour synthétiser des insecticides apportant un Énorme progrès pour l'agriculture et permettant d'assurer une production alimentaire suffisante pour une population sans cesse croissante. Leur utilisation a également contribué à l'amélioration de la santé publique en luttant contre certains insectes vecteurs de maladies (Qiao *et al.*, 2003). Cependant, avec leur utilisation massive, sont apparus des signes évidents de toxicité et d'effets néfastes pour l'environnement et pour l'homme (Bonde *et al.*, 2008), ce qui a conduit les chercheurs à s'orienter vers des pesticides beaucoup plus sélectifs.

Les propriétés physico-chimiques (volatilité, stabilité, solubilité ...), la toxicité et le devenir dans l'environnement des COP sont très variables et dépendent de la nature des substituant atome de soufre, oxygène, chaînes latérales ...) liés à l'atome de phosphore et du type de liaisons (covalente ou double liaison) liant le ou les substituants à l'atome de phosphore. L'utilisation la plus classique des COP est celle de pesticides à usage agricole (phytoprotection). Cependant ils sont aussi employés en médecine vétérinaire (traitements anti- parasitaires), en santé humaine à visée thérapeutique (EchotophiateTM, MétrifonateTM) ou virales traitements contre les vecteurs de maladies (paludisme...) et insectes nuisibles (moustiques, parasites ménagers) (fig.02) (Defrank, 1991).

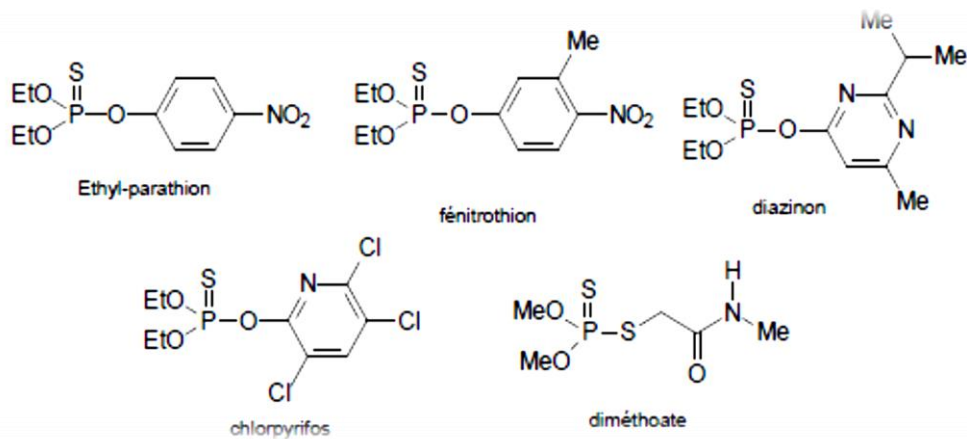


Figure 02. Structures chimiques de certains pesticides organophosphorés.

Parmi les COP les plus en vue actuellement, les amidophosphonates constituent une importante classe d'organophosphorés ayant une vaste activité biologique, fongicide (Venkateswara *et al.*, 2006), Herbicide (Maier, 1990), régulateurs de croissance (Maier et Spoerri, 1991), Anti-inflammatoires et également insecticide, (Guezane *et al.*, 2012). Les molécules possédant un groupement phosphonate, analogue au phosphate glycosidiques et phospholipides où de la liaison (P-O) est substituée par une liaison (P-C). Ils ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique et le nombre d'études concernant leur synthèse et leur activité biologique ne cesse de croître (Lejczak *et al.*, 1985). Cependant ces amidophosphonates peuvent également se révéler toxiques et afin d'élucider les mécanismes d'action et de toxicité de ces xénobiotiques, il est nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes considérés comme sentinelles car toute modification physiologique, biochimique et écologique qui les affecte est considérée comme un biomarqueur de la toxicité. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (Echaubard, 1995 ; Hellowell, 1986).

2. Mécanisme d'action des organophosphorés

Les organophosphorés (OP) sont des toxiques létaux, à action systémique prédominante, dont le mécanisme d'action principale est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition irréversible des cholinestérases (Dumas et *Durst*, 1986). Cliniquement, l'accumulation d'acétylcholine provoque une réponse exagérée des récepteurs cholinergiques, qui peut conduire à des convulsions ou des troubles respiratoires. Les OP, très lipophiles, franchissent aisément toutes les barrières biologiques et se fixent de façon covalente aux cholinestérases, que ce soit les acétylcholinestérases du système nerveux central, des muscles et des globules rouges ou les pseudocholinestérases du système nerveux et plasmatique. Même si une faible quantité franchit la barrière hémato-encéphalique, elle suffit pour inhiber en quelques secondes pratiquement toute l'activité cholinestérasique (Defrank, 1989). Les OP viennent alors occuper le site de l'enzyme, en s'opposant à l'hydrolyse physiologique de l'acétylcholine en choline et en acide acétique. L'enzyme, ne pouvant plus être hydrolysée, vieillit et devient non fonctionnelle et non réactivable : à ce moment-là, le processus est irréversible. Seule la synthèse de nouvelles cholinestérases permettra le retour à une activité fonctionnelle normale. Cette difficulté, voire impossibilité de réactivation des

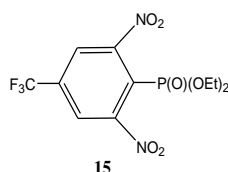
cholinestérases différencie les intoxications par OP de celles par les carbamates au cours desquelles les cholinestérases sont spontanément et rapidement réactivées.

3. Toxicocinétique des organophosphorés : le système ADME

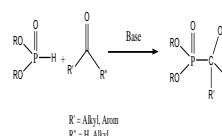
Les OP sont absorbés facilement par toutes les voies, notamment la voie cutanée en milieu professionnel, mais aussi digestive, respiratoire (aérosols, poussières) et oculaire. La transformation rapide ne permet pas vraiment de quantifier l'absorption, surtout avec la variabilité des molécules ; ainsi moins 85% d'une dose orale de dichlorvos, et 30% pour le parathion sont absorbés. Bien que peu étudiée, l'absorption par inhalation serait aussi rapide et importante (Bjorling-Poulsen *et al.*, 2008). Après absorption, les OP sont transportés par le sang vers les tissus. Les demi-vies plasmatiques des OP sont courtes (10 minutes pour le dichlorvos) et par conséquent ils s'accumulent peu dans les tissus. Toutefois, des concentrations importantes peuvent être retrouvées en particulier dans le cœur et la rate, mais aussi dans le sang, les urines, le cerveau, le foie et les reins (Colborn, 2006). Des OP ont aussi été retrouvés dans les tissus gras particulièrement le parathion, le diazinon et le fénitrothion, avec un passage transplacentaire rapporté chez le rat et le mouton. Une contamination du lait maternel a été également rapportée (Costa, 2008), avec un échantillon testé sur 10 contenant du chlorfininfos. Les OP doivent être activés par des oxydases, des hydrolases et des transférases au niveau hépatique avant d'être toxiques pour l'Homme (Barr et Angerer, 2006). Ces OP sont éliminés très largement dans les urines (à plus de 50%), de façon rapide, mais aussi dans les fécès et par l'air expiré pour les OP et leurs métabolites plus volatils. Ainsi, après ingestion, 30 à 40% du parathion est éliminé en 24h, après absorption cutanée, l'excrétion est plus lente (10% en 5 jours).

4. Les phosphonates

Les phosphonates sont des analogues des phosphates naturels (phosphates glycosidiques, phospholipides), ils ont des propriétés chimiques et biologiques différentes, ce qui leur confère des applications à la fois biologiques et médicales. Dans ces composés la liaison (P-O) est substituée par une liaison (P-C), cette substitution permet d'accéder à des composés plus stables ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases (fig.03) (Maryanoff et Reitz, 1989).



Phosphate



Phosphonate

Figure 03. Structure chimique d'un Phosphate et d'un phosphonate

Parmi les exemples des groupements phosphonates les plus pertinents, on retrouve les acides nucléiques, les phospholipides, des polysaccharides, certaines protéines. Le phosphore se trouve aussi dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) porteur, entre autres, de l'information génétique chez les êtres vivants, dans certaines protéines (Maryanoff et Reitz, 1989).

Ayant un profil pharmacologique particulièrement intéressant, les phosphonates ont plusieurs applications en médecine, à l'exemple les époxyphosphonates utilisés comme antibactériens, les analogues nucléosidiques phosphonates comme antiviraux, et les bisphosphonates pour le traitement des maladies osseuses multiples (Teresa et Faísca, 2010). Ils ont aussi connu des applications en tant **qu'anti-inflammatoires** (Abdou *et al.*, 2010) (1. Oxaphospholes, 2. L'oxaphosphinine, 3. vinyloxaphosphinine phosphonate) (fig.04), **antidépresseur et antibiotique** (El-Gokha et Maas, 2011) (4. 2-aminométhyl cyclopropyl-phosphonate, 5. d'acide 2-[(N-Hydroxy) carbamoylméthyl-cyclopropyl] phosphonique) (fig.05), **Bioisostères** (Ayhan *et al.*, 2007) (6. Le pyrrole phosphonate décrit en tant que modulateur de l'excitabilité du système nerveux central) (fig.06), aussi les **aminophosphonates** (Atherton *et al.*, 1986 ; De Lombaert *et al.*, 1995) utilisés dans plusieurs secteurs d'activités (7. Le Fyrol 6 © est utilisé comme ignifuge dans différents matériaux, 8. le glyphosate (Round up©) est le pesticide le plus utilisés au monde, 9. Le Buminafos, est utilisé comme régulateur de la croissance des plantes dans l'industrie agrochimique. (Fig.07)

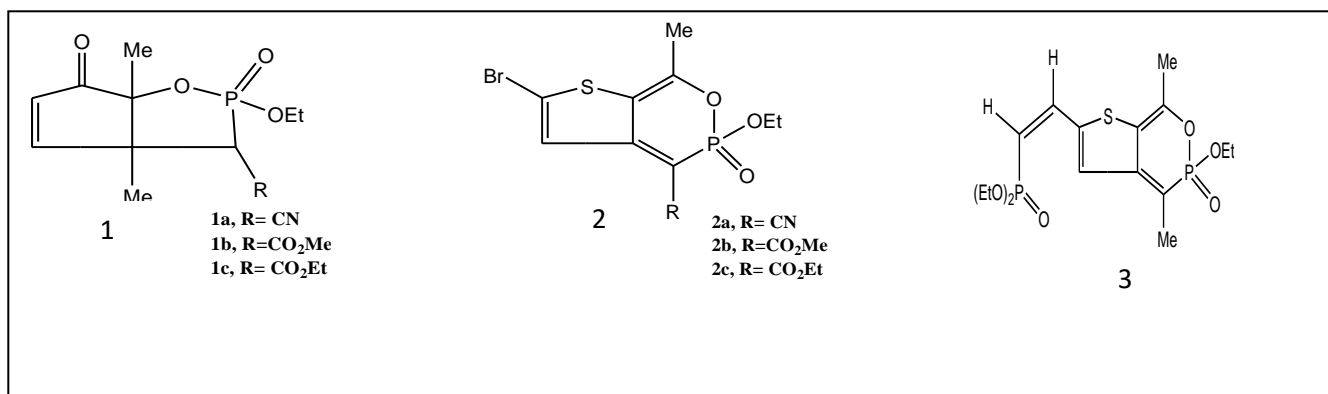


Figure 04. Structures chimiques des anti-inflammatoires contenant le motif phosphonate.

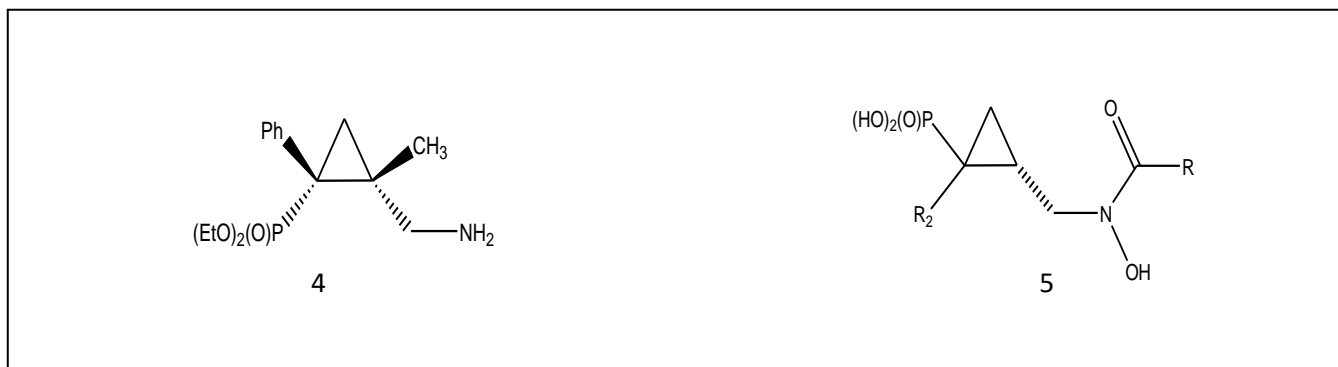


Figure 05. Structures chimiques des cyclopropyl-phosphonates

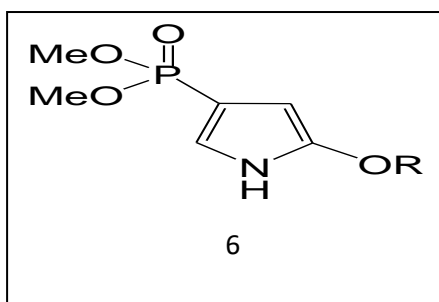


Figure 06. Structure chimique de pyrrole phosphonate

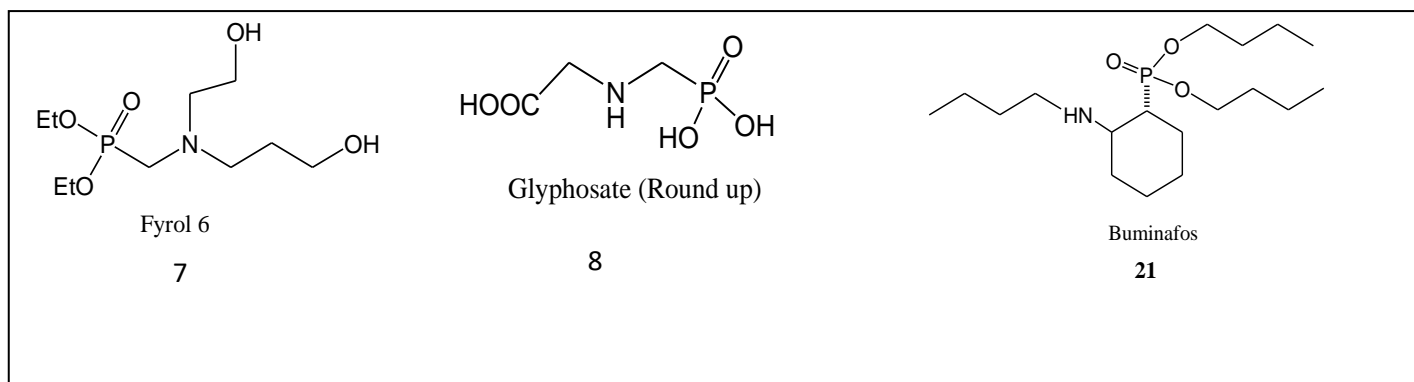


Figure 07. Structures chimique des aminophosphonates

5. Les amidophosphonates

Les amidophosphonates ou les phosphonoacétamides sont des phosphonates porteurs d'une fonction carboxamide en position α , β ou γ , ces composés sont des intermédiaires utiles en synthèse organique. Ils appartiennent à une classe importante de produits naturels ayant une grande activité biologique (Amagata *et al.*, 2006) Les molécules possédant un groupement amidophosphonate ont un champ d'activités biologiques très étendue ils ont une activité antibiotique ou antivirale, mais également insecticides ou herbicides (Fig. 08).

* Le composé (**10**), est un dipeptide dérivé de la proline et la glycine phosphonique est reconnue pour ses propriétés antibactériennes.

* Le dipeptide (**11**) est un dérivé d'alanine et d'alanine phosphonique, nommé alaphosphine, est un herbicide et fongicide puissant.

* Le dipeptide (**12**), est un peptide formé d'un dérivé de proline et d'une proline phosphonique, est reconnu comme étant un inhibiteur de haute affinité pour l'enzyme DPP IV. (diabète de type II)

* Le composé (**13**) est un hydroxy-amidophosphonate utilisé comme inhibiteur d'ATX (ATX est un facteur de la motilité autocrine qui favorise l'invasion des cellules cancéreuses, la migration cellulaire et l'angiogénèse) (Cui *et al.*, 2007).

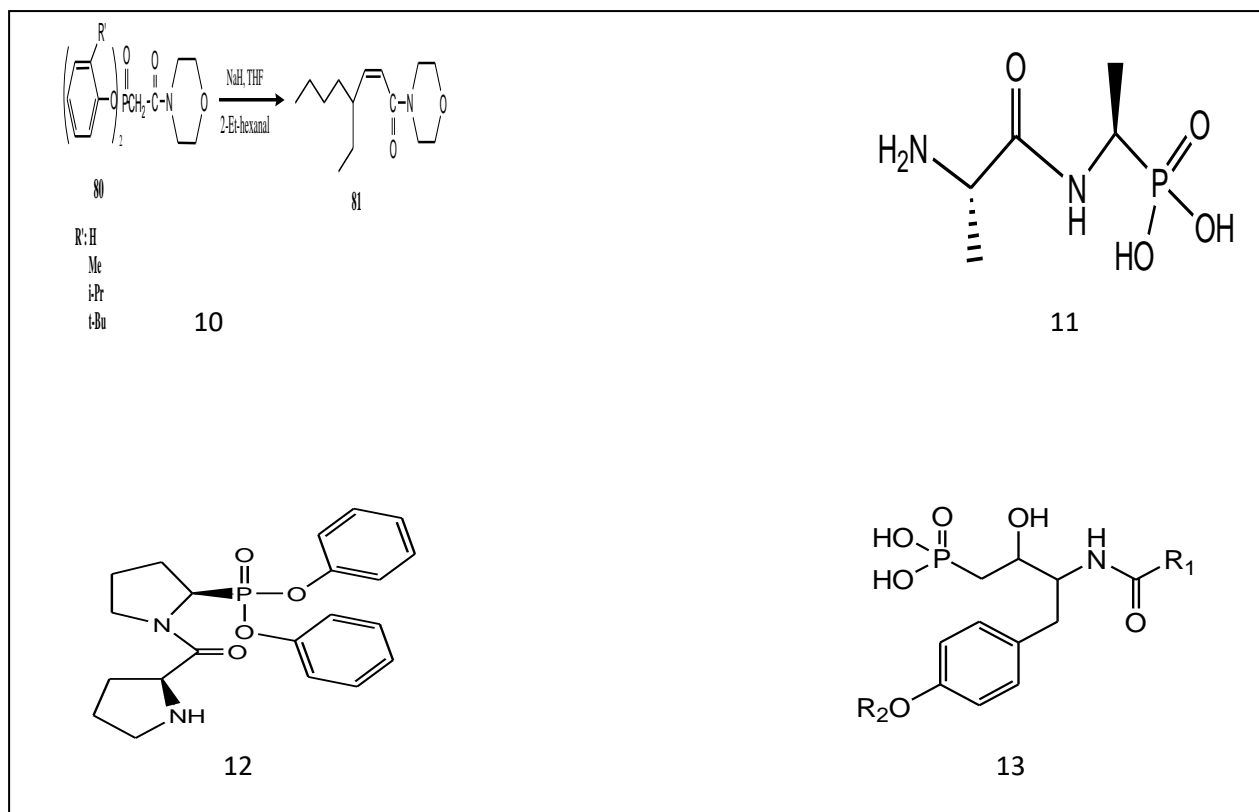


Figure 08. Structures chimiques de quelques amidophosphonates ayant une activité biologique.

Objectifs de l'étude

Ce travail de thèse s'insère dans le cadre général de la caractérisation des effets de trois amidophosphonates de synthèse (AP1, AP2, AP3) sur un modèle unicellulaire alternatif: *Paramecium tetraurelia*.

Dans un premier temps, un aperçu bibliographique concernant les composés organophosphorés et les amidophosphonates est dressé : c'est le premier chapitre.

Le second chapitre est consacré aux protocoles expérimentaux concernant la synthèse de trois amidophosphonates.

Le troisième et quatrième chapitre englobe à la fois les différents protocoles utilisés pour l'étude des effets des trois xénobiotiques testés sur les paramètres physiologiques et polarographiques ainsi que les mécanismes de défense cellulaires tels que le système antioxydants chez la paramécie.

Le cinquième chapitre est consacré à l'évaluation de l'activité antifongique des trois xénobiotiques avec une description détaillée des différents protocoles utilisés ainsi que les paramètres pris en compte tels que la mesure des diamètres des zones d'inhibition, le pourcentage d'inhibition et la CMI.

Les capacités antioxydantes des trois molécules testées sont abordées dans le sixième chapitre où nous nous sommes consacrés au suivi des capacités de piégeage des radicaux libres en présence et en absence du DPPH et ce *in vitro* et *in vivo*.

Le dernier aspect auquel nous nous sommes intéressés concerne l'étude des effets génotoxiques des amidophosphonates par le biais de la RAPD-PCR, une méthode qui mesure les variations du nombre de sites d'hybridation par unité génomique, d'une amorce oligonucléotidique aléatoire.

Tableau 01. Récapitulatif des paramètres étudiés selon les objectifs du programme de recherche.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4	Expérience 5
	Impact sur la physiologie et la polarographie	Détermination des mécanismes de défense et des biomarqueurs de susceptibilité	Etude fongitoxique sur deux souches	Evaluation de l'activité antioxydante	Approche génotoxique par RAPD-PCR
Matériel biologique	<i>Paramecium tetraurelia</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>	<i>Septoria tritici</i> , <i>Alternaria tenuis</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>	<i>Paramecium tetraurelia</i>
Matériel chimique	AP1, AP2, AP3, chlorpyriphos éthyl	AP1, AP2, AP3, chlorpyriphos éthyl	AP1, AP2, AP3,	AP1, AP2, AP3, DPPH	AP1, AP2, AP3, chlorpyriphos éthyl
Conditions d'exposition	AP1 : 30µM, AP2 : 25µM, AP3 : 15µM, chl-éthyl : 10µM	AP1 : 30µM, AP2 : 25µM, AP3 : 15µM, chl-éthyl : 10µM	AP1(10,25,40µM) AP2(15,20,25µM) AP3(10,15,20µM) Mancozèbe(6µM)	AP1(10,25,40µM) AP2(15,20,25µM) AP3(10,15,20µM) DPPH(2,4mg/100 ml de méthanol)	AP1 (3, 30µM) AP2 (2.5, 25µM) AP3 (1.5, 15µM) chl.éthyl(1,10µM)
Cinétique d'exposition	0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h, 48h, 72h.	0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h, 48h, 72h.	7j	30min	48h, 72h.
Paramètres biologiques	Cinétique de croissance, DL ₅₀ , % de réponse, respiration cellulaire	protéines totales, GSH, GST, CAT, MDA	Diamètre des zones d'inhibition, I'(%) d'inhibition, CMI	Etude <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	mesure des variations du nombre de cistes d'hybridation par unité génomique

**CHAPITRE 2- SYNTHÈSE DES
AMIDOPHOSPHONATES MODIFIÉS À PARTIR
D'ACIDES AMINES.**

1. Introduction

Vue l'importance des composés amidophosphonates sur le plan biologique et chimique, plusieurs travaux ont été consacrés à la synthèse de composés contenant le motif phosphonates et particulièrement l'amidophosphonate. Dans notre étude, nous avons choisi trois dérivés amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) nouvellement synthétisés ; ces molécules ont été préparées via la réaction d'Arbuzov (Arbuzov, 1906).

2. La réaction d'Arbuzov

La réaction de Michaelis–Arbuzov est probablement la plus utilisée pour la synthèse des phosphonates. Originellement découverte par Michaelis *et al* en 1898 (Michaelis, 1898) et reprise plus en détail par Arbuzov quelques années après (Arbuzov, 1906), cette réaction permet, entre autres, d'accéder aux phosphonates de manière relativement simple en faisant réagir à chaud un trialkylphosphite sur un halogénure d'alkyle en absence de solvant (Fig. 09).

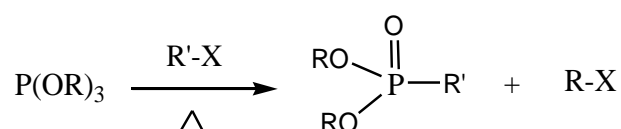


Figure 09. Réaction d'Arbuzov

Cette voie de synthèse comprend deux étapes principales (Bhattacharya *et al.*, 1981):

- 1- Une quaternisation initiale de trialkylphosphite par attaque nucléophile sur l'halogénure d'alkyle.
- 2- Une déalkylation du cation alkoxyphosphonium par l'anion libéré suivant le mécanisme ci-dessous (Fig. 10)

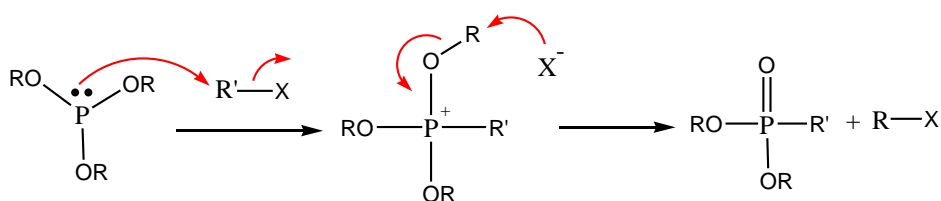


Figure 10. Mécanisme réactionnel de la réaction d'Arbuzov.

3. Les phosphites

On peut classer les phosphites en deux familles :

-Les trialkyles phosphites.

-Les phosphites d'ordres inférieures : dialkyles, monoalkyles ou sans alkyles. Les familles

3.1. Les trialkyles phosphites

Les trialkyles phosphites sont moins nucléophiles que les phosphines à cause des groupements alkoxy électroattracteurs, les réactions d'alkylation nécessitent la plupart du temps de longs chauffages. Une des applications les plus courantes de ces composés est la réaction d'Arbuzov: elle consiste en l'addition de trialkylphosphite sur un dérivé halogéné pour conduire au phosphonate correspondant (fig. 11) (Arbuzov, 1906).

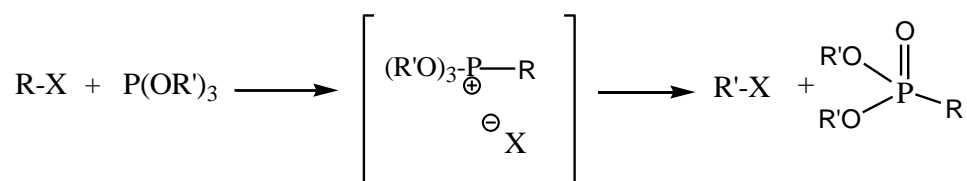


Figure 11. Addition de triéthylphosphite sur un dérivé halogéné.

3.2. Les dialkyles phosphites.

Les dialkyles phosphites sont connus pour leur équilibre entre deux formes tautomères: une forme phosphonate et une forme phosphite plus nucléophile (Fig. 12).

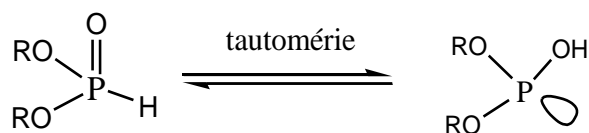


Figure 12. Equilibre phosphonate / phosphite.

Contrairement aux trialkylphosphites, une base permet d'augmenter fortement la nucléophilie du phosphite et de réaliser des alkylations à des températures beaucoup plus basses (fig. 13). Les dialkyles phosphites présentent de plus l'avantage d'être beaucoup moins odorants et moins toxiques que leurs équivalents trialkylés (Kosolapoff, 1946).

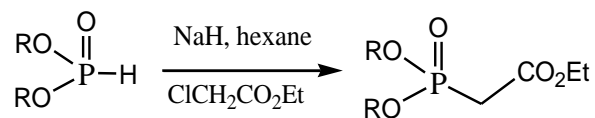


Figure 13. Addition de diéthylphosphite sur un dérivé halogéné.

4. Synthèse des amidophosphonates ou phosphonoacétamides par la réaction de Michaelis-Arbuzov.

La réaction d'Arbuzov est la voie la plus simple pour obtenir la liaison carbone-phosphore, par un chauffage de triéthylphosphite (5éq) à 60°C puis l'addition du chloroacétamide chiral (90) en absence du solvant, le milieu réactionnel porté à reflux à 120°C pendant 5 heures (fig. 14). La purification du milieu réactionnel est relativement aisée puisque le chloroéthane formé, produit secondaire, est distillé en continu au cours de la réaction.

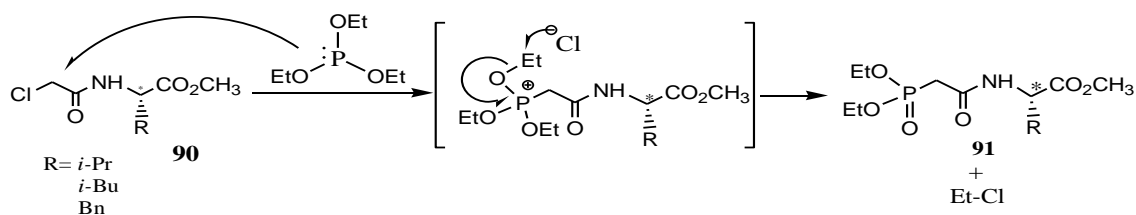


Figure 14. Mécanisme réactionnel de la réaction d'Arbuzov.

4.1. Caractéristiques physico-chimiques des amidophosphonates AP1, AP2, AP3

Tableau 02. Caractéristiques physico-chimiques des amidophosphonates nouvellement synthétisés AP1, AP2, AP3 (Guezane *et al.*, 2012).

<i>Réf</i>	<i>Formule brute</i>	<i>Masse</i>	<i>R_f</i> (CH ₂ Cl ₂)	<i>F°C</i>	<i>Rdt%</i>	<i>[α]_D</i> (c= 1, CH ₂ Cl ₂)
AP1	C ₁₃ H ₂₆ O ₆ NP	323	0.6	huile	75%	-32.5°
AP2	C ₁₂ H ₂₄ O ₆ NP	309	0.65	huile	75%	-8.5°
AP3	C ₁₆ H ₂₄ O ₆ NP	357	0.57	huile	80%	-27.5°

4.2. Caractérisation

Les structures de phosphonoacétamides ont été élucidées sur la base des données spectroscopiques usuelles; **IR**, **RMN ¹H** et **³¹P** et **¹³C** et **SM**.

L'introduction des groupements phosphonates se traduit en **RMN ¹H** par l'apparition d'un massif correspond aux protons du CH₃CH₂O vers 4.1 ppm d'un deux doublets, vers 2.90 ppm correspondant aux protons du méthylène (**CH₂P**), et d'un triplet vers 1.3 ppm correspondant aux protons de CH₃CH₂O.

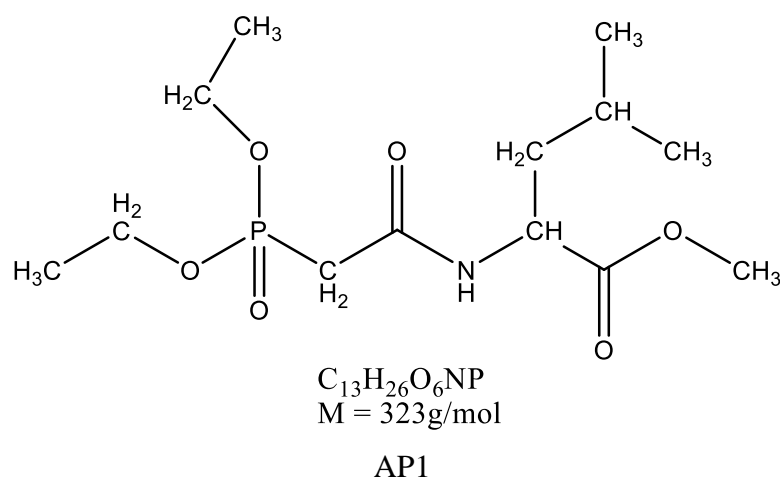
En **RMN ³¹P**, les phosphonoacétamides sont caractérisés par l'apparition d'un pic vers 16.33 ppm correspondant au groupement phosphonate.

En **IR**, ces structures sont confirmées par la bande d'absorption du (P=O) vers 1250.5 cm⁻¹ et une autre bande de (OEt) vers 1155.28 cm⁻¹.

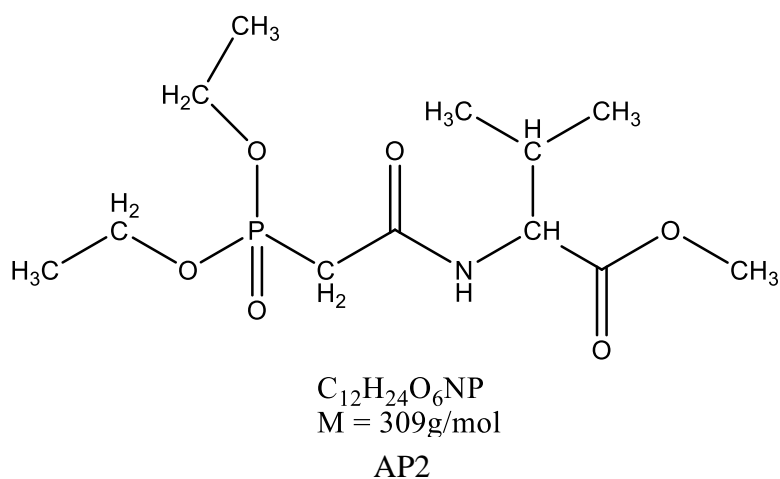
En **SM**, ces composés sont caractérisés par le pic moléculaire $[M+1]^+$. 5 (Guezane *et al.*, 2012).

La Purification des trois amidophosphonates (AP1, AP2 et AP3) est effectuée par chromatographie sur colonne (gel de silice: SiO_2), une méthode de séparation analytique utilisée pour purifier un produit de réaction. Après plusieurs essais sur CCM, l'éluant choisi pour purifier nos molécules est le CH_2Cl_2 .

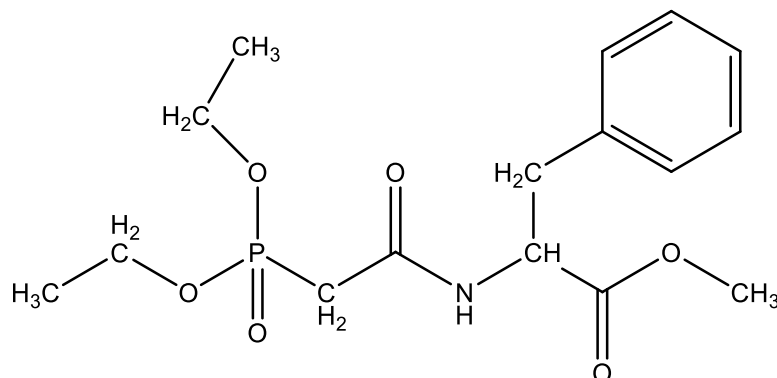
5. Structures chimiques des amidophosphonates obtenus (AP1, AP2 et AP3).



(S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-isobutylacetate)



(S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-isopropylacetate



$C_{16}H_{24}O_6NP$
 $M = 357\text{g/mol}$
AP3

(S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-benzylacetate)

Figure 15. Structures chimiques des trois amidophosphonate de synthèse

CHAPITRE 3- ETUDE PHYSIOLOGIQUE ET POLAROGRAPHIQUE

1. Introduction

Les amidophosphonates constituent une importante classe d'organophosphorés ayant une vaste activité biologique, et insecticide, (*Guezane et al.*, 2012), cependant, cette classe peut se révéler également toxique ou capable de produire des effets néfastes, de cette manière, production de nouveaux insecticides et études de toxicité se sont livrés à une course effrénée. Aussi, des essais de cytotoxicité s'avèrent nécessaires.

Au cours de ce travail, nous nous proposons de mettre en évidence les effets toxiques potentiels des trois amidophosphonates nouvellement synthétisés (AP1, AP2 et AP3). Pour cela, nous nous sommes intéressés particulièrement à certains paramètres physiologiques sur un modèle biologique alternatif : le protiste cilié d'eau douce : *Paramecium tetraurelia*, considéré comme un modèle biologique de choix en toxicologie. (*Epstein et al.*, 1963).

Le second paramètre auquel nous nous sommes intéressés concerne le métabolisme respiratoire qui peut rendre compte des modifications/perturbations pouvant survenir au niveau de la mitochondrie. En effet les mesures polarographiques concernent particulièrement la consommation d'oxygène par les paramécies. Le taux de mortalité cellulaire ainsi que la DL₅₀ ont également été pris en compte.

► Intérêt du modèle biologique: la paramécie

Les espèces utilisées lors de ces tests sont choisies afin de répondre au mieux à la théorie des 3 R et à certains critères qui obéissent à des exigences quant au choix d'un modèle alternatif.

- Le taxon est présent, abondant et facilement identifiable (Marchese et Brinkhurst., 1996).
- Sa distribution géographique est large (Bennett et Cabbage, 1992).
- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala et *al.*, 1999).
- Son élevage 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 Chapman, 2001).
- Il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit et éventuellement sa bioaccumulation (Chapman, 2001).

La paramécie est l'une parmi de nombreuses espèces qui soit susceptible de satisfaire au moins partiellement ces critères. En effet, cette espèce eucaryote unicellulaire est facile à cultiver, sa taille permet de suivre à faible grossissement le cycle cellulaire, la conjugaison, le comportement, la sécrétion, la morphogénèse, et les mutations touchant une gamme de fonctions cellulaires. Plusieurs particularités biologiques en font un modèle de choix et d'autre part, le processus d'autogamie, qui produit des clones 100% homozygotes, simplifie l'analyse toxicologique. L'ensemble de ces données expérimentales nous ont donc conduit à choisir la paramécie comme modèle d'étude.

2. Matériel et Méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) du département de biologie de l'université Badji Mokhtar –Annaba.

2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est une souche sauvage de *Paramecium tetraurelia* **8-2B**, aimablement fournie par le Dr AZZOUZ, Laboratoire de Toxicologie Cellulaire à l'Université d'Annaba (Algérie).

2.1.1. La paramécie

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé au microscope. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille (120 µm de longueur en moyenne et 48 µm de largeur environ), la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle d'étude privilégié pour les biologistes cellulaires. C'est une cellule allongée à la forme d'une pantoufle, dont l'extrémité antérieure est arrondie et l'extrémité postérieure effilée. L'espèce étudiée au laboratoire est *Paramecium tetraurelia*. Cette cellule de grande taille (à peu près 130µm) a une polarité dorso-ventrale, la face ventrale étant reconnaissable par la présence d'une grande invagination correspondant à l'appareil oral. Sur la face dorsale se trouvent deux vacuoles pulsatiles (fig. 16) (Gogendeau, 2005)

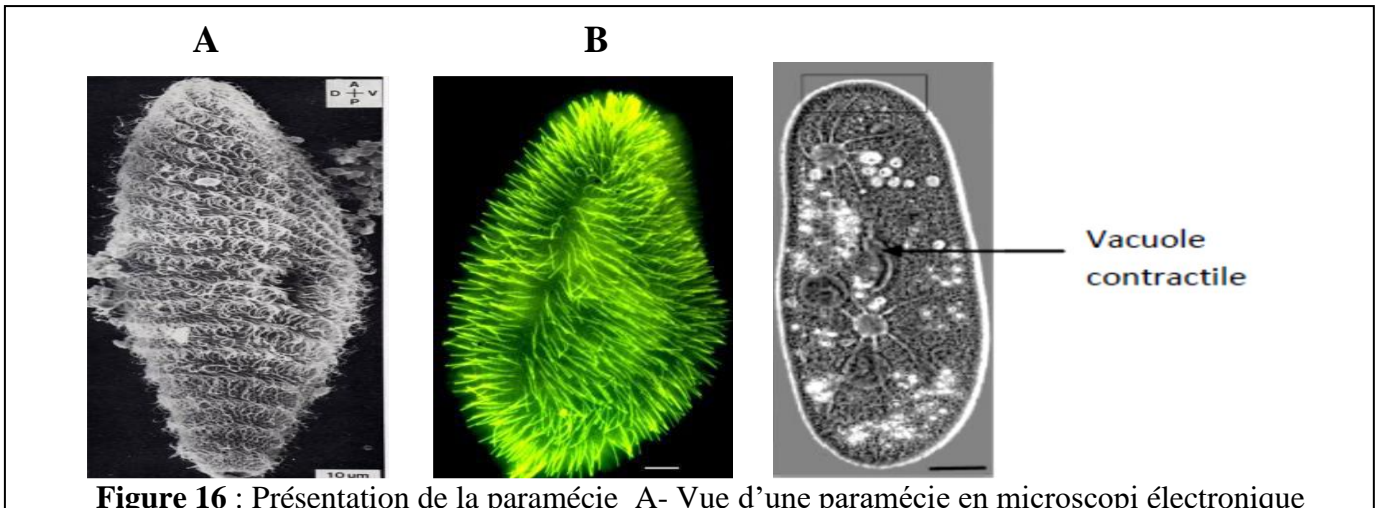


Figure 16 : Présentation de la paramécie A- Vue d'une paramécie en microscopi électronique à balayage, la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence (anticorps anti-tubuline).
B- Paramécie vue en contraste de phase (Gogendeau, 2005).

La paramécie, polarisée et asymétrique, présente de nombreux organites différenciés ayant des fonctions très spécialisées : le goulet de phagocytose permet l'ingestion des bactéries, le cytoprocte (ou anus cellulaire) est nécessaire à l'expulsion des déchets, et les vacuoles pulsatiles servent à réguler l'osmolarité. Une des plus grandes caractéristiques de la paramécie est la présence de milliers de cils vibratoires sur sa surface, permettant la locomotion et la nutrition (Fig. 17). La paramécie possède également une voie de sécrétion régulée, la voie d'exocytose, des trichocystes, moyen de défense contre ses prédateurs, ainsi qu'un cortex complexe (Sonneborn, 1974).

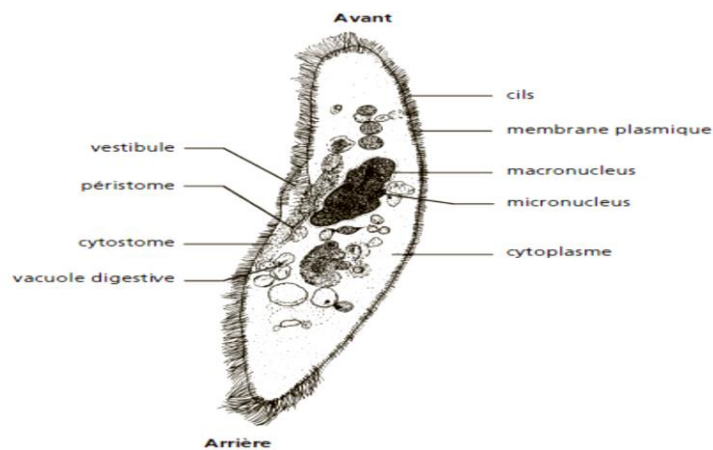


Figure 17. Structure d'une paramécie selon Bricheux et Brugerolle (1986)

2.1.3. Morphologie.

***cils et trichocystes**

Entre les cils sont disposées des vésicules, les trichocystes, interprétées comme des organes de défense ou extrusomes. Sous l'action de certains stimuli, ils sont expulsés à l'extérieur. Le corps du trichocyste se transforme alors en un long ruban (50 µm) terminé par une pointe. Des alvéoles, vésicules aplaties, sont en outre visibles sous la membrane plasmique. Elles signent l'appartenance de la *Paramecie* au groupe des Alvéolobiontes (fig.18) (Cohen *et al.*, 1988)

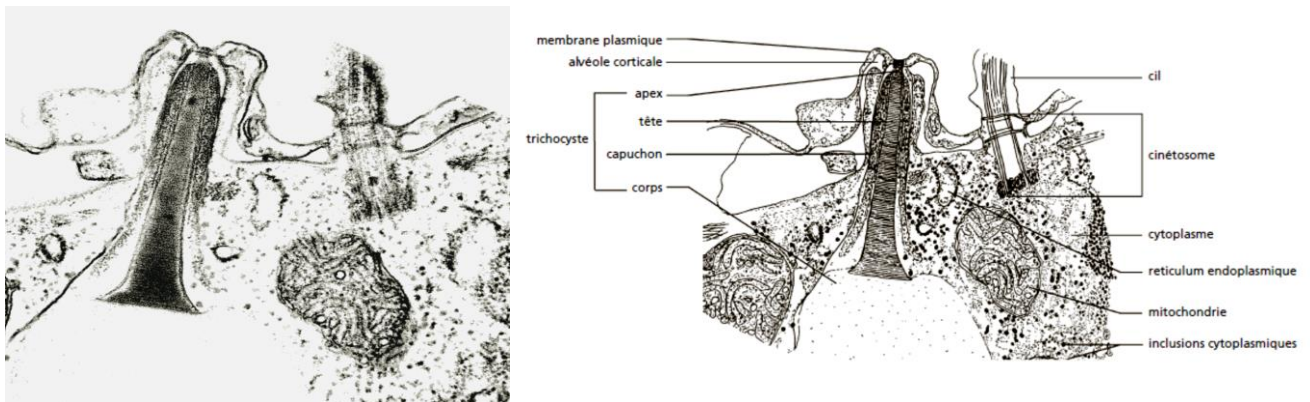


Figure 18. Structure détaillée d'un cil et d'un trichocyste observés sous microscope électronique à transmission), x 5 300. (Cohen *et al.*, 1988)

*** noyaux**

L'appareil nucléaire est composé de deux noyaux de tailles inégales et de fonctions complémentaires. Le macronucleus, de grande taille (35 µm x 12 µm), ovoïde, est impliqué dans la vie végétative. Le micronucleus, de petite taille (3 µm de diamètre), étroitement accolé au précédent, participe quant à lui à la vie reproductive. (Fig.19). (Cohen *et al.*, 1988)

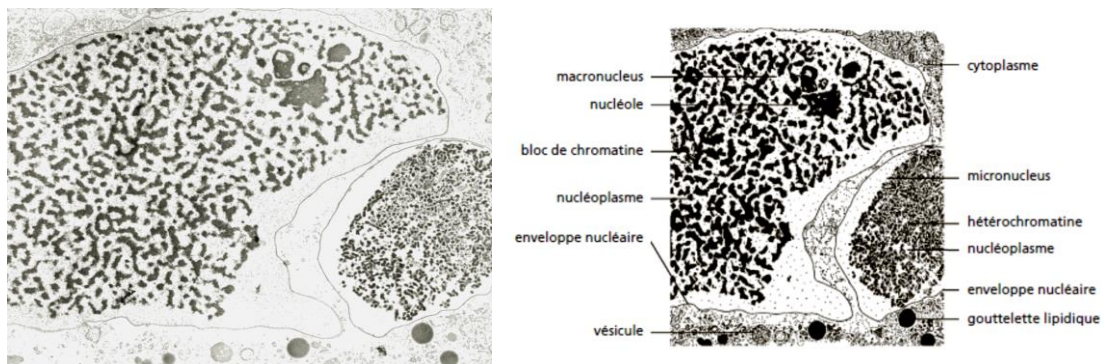


Figure 19. Structure détaillée du noyau de la paramécie observé sous microscope électronique à transmission, x 8 500. (Cohen *et al.*, 1988).

2.1.4. Biologie***Locomotion de la paramécie.**

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 (Cohen, 2007).

***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).

***Nutrition.**

La paramécie porte sur sa face ventrale une vaste dépression ciliée, qui s'élargit en un vestibule donnant accès au péristome (cavité buccale). Le cytostome s'ouvre au fond de celui-ci et débouche sur le cytopharynx. Les particules alimentaires y sont englobées au sein de vacuoles digestives qui migrent ensuite dans le cytoplasme. Durant ce transit, les aliments sont digérés. Les déchets non assimilables sont déversés dans le milieu extérieur au niveau du cytoprocte (Bricheux et Brugerolle, 1986).

2.2. Matériel chimique

Nous avons choisi trois molécules de la classe des organophosphorés, type : α -amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) dont la synthèse a été effectuée par le Professeur BERREDJEM M. du laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Département de Chimie, Université Badji Mokhtar de Annaba. Nous avons dissous ces molécules dans un mélange eau distillée/acétone à 2% (98:2 v/v) pour la préparation des solutions de 10 ml à partir de 0,042g de la molécule AP1((S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-isobutylacetate) d'une concentration finale de 13 mM, 0,232g de la molécule AP2((S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-isopropylacetate avec une concentration finale de 75 mM et 0,114g de la molécule AP3((S)-methyl 2-[2-diethoxyphosphoryl acetamide] 2-benzylacetate) avec une concentration finale de 31,9 Mm. Nous avons aussi utilisé le clorpyriphos éthyle (Dursban à 480g L⁻¹ avec une concentration de 1,37 M) composé commercialisé en Algérie) comme analogue pour la comparaison (témoin positif).

3. Méthodes

3.1. Culture pure de *Paramecium tetraurelia*

Pour suivre pendant plusieurs semaines 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. Wichterman (1953) recommande l'utilisation d'infusions de graminées ou de laitue pour obtenir des cultures pures de *Paramecium*. Dans notre cas nous avons utilisé la laitue pour la préparation du milieu de repiquage selon la méthode de Beaumont et Cassier (1998), à savoir: Dissoudre 1,5g de poudre de laitue déjà séchée, réduite en poudre, conservée hermétiquement dans 1L d'eau, faire bouillir 20 min. Filtrer l'infusion sur de la gaze puis procéder à une répartition du milieu dans des flacons de 250 ml, passer à l'autoclavage 20 min à 120°C. Les flacons sont stérilisés après chaque ouverture.

Le milieu est ensuite bactérié avec 5 colonies de *Klebsiella pneumoniae* (V4R1) aimablement fourni par le Dr. BENBOUZID (Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Université d'Annaba). Une fois que la culture de bactéries s'est bien développée (24h), nous introduisons les paramécies.

3.2. Traitement des paramécies

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 20 ml de culture pure de *Paramecium tetraurelia* (les tests sont répétés trois fois). Les cultures sont disposées dans des tubes à essais dans une étuve à une température de $27 \pm 3^\circ\text{C}$, la densité cellulaire est de $2 \cdot 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$ correspondant à la phase exponentielle de croissance des *Paramecium tetraurelia*. Après plusieurs essais, nous avons retenu des concentrations de: 30 μM pour la molécule AP1, 25 μM pour la molécule AP2, 15 μM pour la molécule AP3 et le clorpyrifos éthyle à 10 μM . Ces concentrations correspondent aux doses létales médianes (DL_{50}). Nous avons également utilisé deux témoins, un témoin acétone à 0.61 mM afin d'éliminer son impact sur les paramécies et un témoin neutre sans aucun traitement.

3.2.1. Cinétique de croissance cellulaire

La technique retenue dans ce travail est celle décrite par Beisson *et al.* (2010). C'est une méthode de comptage des cellules vivantes présentes dans chaque échantillon. Dès la mise en contact du xénobiotique avec le milieu cellulaire, une cinétique de croissance est suivie en fonction du temps: $T_0, T_{1h}, \dots, T_{6h}, \dots, T_{24h}, \dots, T_{72h}$. 10 μ l sont prélevés de chaque échantillon puis disposées sur la cellule de Malassez, 2 μ l de solution de Lugol est additionnée pour l'observation microscopique (microscope Leica DL 1000)) à l'aide d'un compteur manuel. Le nombre de cellules vivantes correspond à la moyenne obtenue de trois répétitions.

3.2.2. Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue le nombre de cellules non viables, il est basé sur l'équation suivante :

$$\% \text{ de réponse} = [(N_C - N_E) / N_C] \times 100$$

Où :

N_C : Nombre des cellules témoins

N_E : Nombre des cellules traitées.

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)

3.2.3 Détermination des doses létales (DL₅₀)

La détermination de la concentration qui, dans des conditions standards, inhibe 50% de l'accroissement d'une population de paramécies est dite DL₅₀ (Bonnet, 2003). Les taux d'inhibition sont corrigés par la formule d'Abbott (1925) qui permet de connaître la toxicité réelle du xénobiotique. Les pourcentages de réponse subissent une transformation angulaire d'après les tables établies par Bliss, pour caractériser la toxicité, on détermine la concentration inhibitrice 50% (DL₅₀). 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. Depuis la courbe, on détermine la DL₅₀ selon les procédés mathématiques de Finney (1971). La méthode de Swaroop (1966) permet le calcul de l'intervalle de confiance de la DL₅₀.

La formule d'Abbott est la suivante:

$$100[(X-Y) / X] \quad \text{Où : } X: \text{ Nombre de vivants des témoins; } Y: \text{ Nombre de vivant des traitées}$$

3.3. Etude Polarographique

L'électrode à oxygène (Hansatech) 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 mais perméable à l'oxygène dissous dans le milieu (Djebar et Djebar, 2000). Cette technique utilisée pour la mesure de l'activité respiratoire des mitochondries, a été adaptée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire pour le suivi du métabolisme respiratoire des microorganismes ainsi que des racines (Sbartai *et al.*, 2009 ; Rouabhi *et al.*, 2006 et Benbouzid *et al.*, 2012).

4. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique est effectuée par le *t*-test de Student à l'aide du logiciel MINITAB version 13.31 Fr. (Dagnelie, 1999).

5. Résultats

5.1. Effets des amidophosphonates sur la croissance des paramécies

La figure (20) illustre les effets des trois amidophosphonates sur l'évolution de la croissance des paramécies. Toutes les mesures ont été effectuées pendant la phase exponentielle de croissance. Parallèlement à la croissance normale des cellules témoins, nous constatons une croissance semblable des témoins acétones et des traitées par la molécule AP1 avec un nombre maximum de cellules de l'ordre de 900.10^4 /ml après 6 heures de traitement. Au-delà de cette heure, une légère diminution ($P \geq 0,05$) est observée. Ce pendant, les traitées par AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl atteignent leur maximum de croissance au bout de 6 heures de traitement mais avec un nombre de cellules inférieur à ce lui des témoins (environ 800.10^4 /ml pour AP2, 580.10^4 /ml pour AP3 et 500.10^4 /ml pour le chlorpyriphos éthyl). Cependant nous constatons une inhibition significative ($P \leq 0,05$) pour les traités par AP2 et hautement significative ($P \leq 0,01$) pour les traités par AP3 et le chlorpyriphos éthyl et ce après 24 h de traitement.

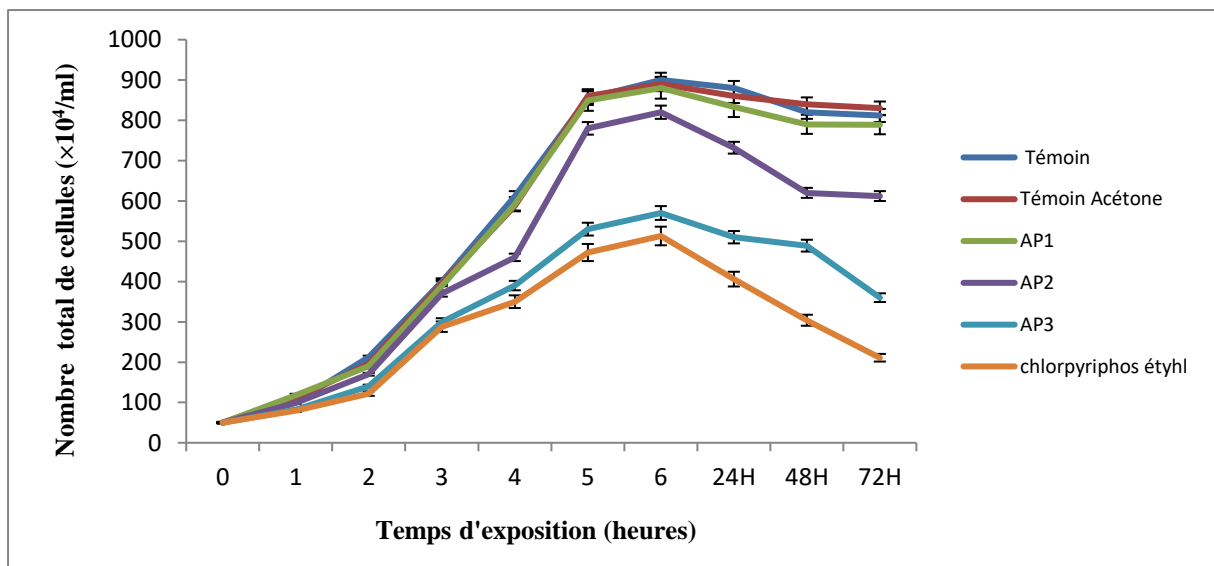


Figure 20. Effets des amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) et du chlorpyriphos éthyl sur la croissance des paramécies en fonction du temps.

5.2. Calcul du pourcentage de réponse

La figure (21) représente le pourcentage de réponse obtenu chez les paramécies traitées par les molécules AP1, AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl. Le calcul du pourcentage de réponse vient confirmer les résultats obtenus sur la croissance cellulaire. Ainsi, il est négatif de -96, -95 et -80 respectivement pour les témoins, témoins acétones et AP1 indiquant une stimulation de la croissance et positif pour AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl indiquant une inhibition de la croissance

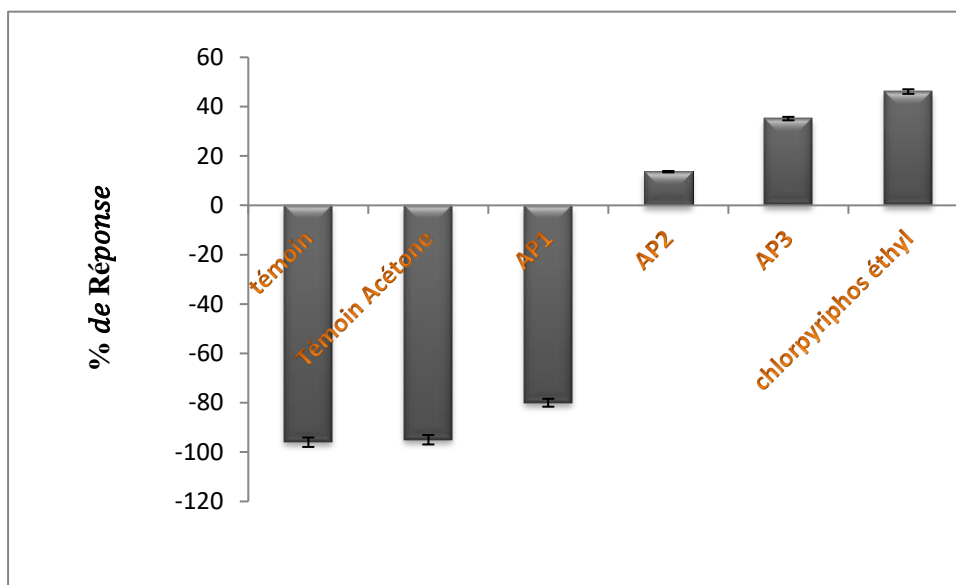


Figure 21. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des amidophosphonates (AP1, AP2, AP3).

5.3. Détermination des doses létales (DL₅₀)

Le tableau (03), illustre l'évolution des DL₅₀ chez les paramécies traitées. Nous constatons que les DL₅₀ de la molécule AP3 et du chlorpyriphos éthyl sont supérieures à celles de AP1 et AP2, Ainsi, de traitement, la DL₅₀ de AP1 après 72 h est égale à 30 uM alors que pour AP3, dès 24h, la DL₅₀ est de l'ordre 15uM.

Tableau 03. Valeurs des DL₅₀ et du Slope de AP1, AP2 et AP3 amidophosphonates et du chlorpyriphos éthyl

	Temps d'exposition	DL ₅₀ µM	Slope (pente de régression)
AP1	72h	30µM	0,0036
AP2	48h	25µM	0,1563
AP3	24h	15µM	0,420
Chlorpyriphos éthyl	24h	10µM	0,0298

5.4. Effets des amidophosphonates sur le métabolisme respiratoire des paramécies.

La figure (22) illustre l'évolution du métabolisme respiratoire chez les paramécies traitées avec les différents amidophosphonates et le chlorpyriphos éthyl. Nous remarquons une diminution progressive de la quantité d'oxygène consommée, traduisant une stimulation de la consommation d'oxygène particulièrement chez les cellules traitées par AP3 et le témoin positif. Ainsi chez les cellules témoins, le taux d'oxygène consommé varie entre 99,5 nmole/ml et 59,3 nmole/ml par contre chez les traités par AP3 le taux d'oxygène consommé varie de est de l'ordre de les cellules témoins respirent, en consommant de l'oxygène dont la quantité varie entre 99,5 nmole/ml à environ 48 nmole/ml

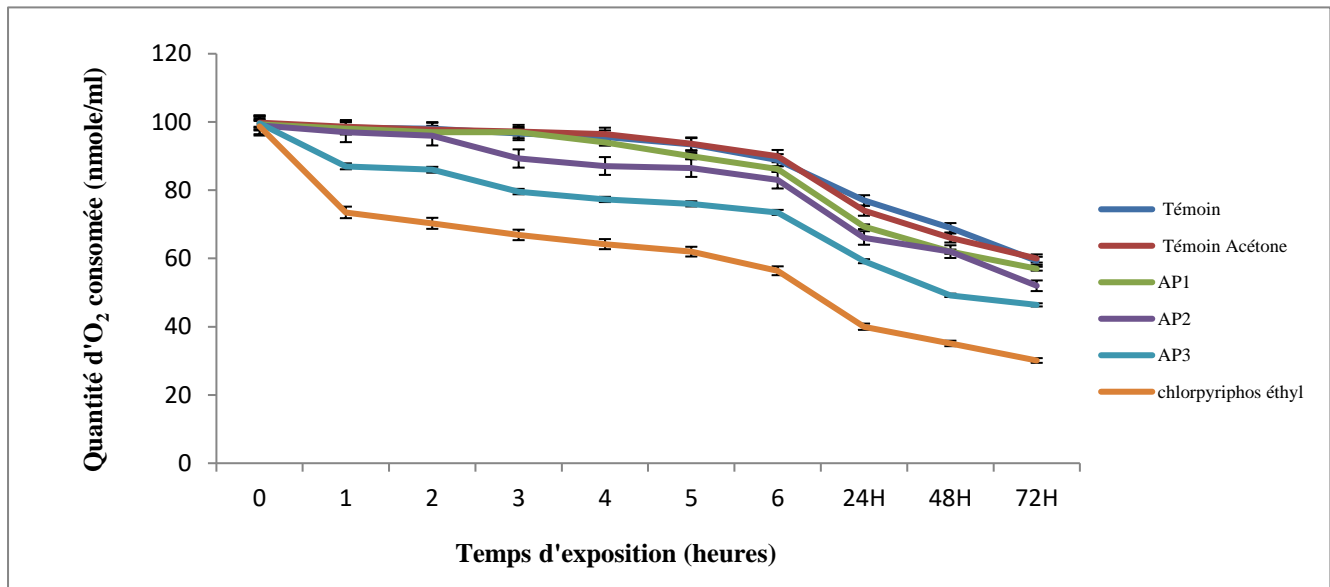


Figure 22. Effets des amidophosphonates AP1, AP2 et AP3 sur le métabolisme respiratoire.

6. Discussion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité/ toxicité de trois amidophosphonates et ce à travers le suivi de la cinétique de croissance, le pourcentage de réponse ainsi que le métabolisme respiratoire.

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, dont la croissance cellulaire qui est un paramètre qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule. En effet, suite à une cytotoxicité, des modifications du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peuvent conduire à une modification de la dynamique de l'espèce exposée, voire sa disparition (Caswell, 2001). Dans ce travail nous avons utilisé un témoin positif à savoir le chlorpyrifos éthyl pour mieux étayer nos résultats car plusieurs études se sont intéressées aux effets toxiques du chlorpyrifos éthyl, et ont abouti au fait que le chlorpyrifos a un effet inhibiteur de la neurogenèse chez les souris CD1 aux doses subtoxiques (Whitney *et al.*, 1995), l'altération de l'anxiété développementale et des éléments de la cascade de signalisation qui suit l'activation de toute une série de récepteurs synaptiques (Garcia *et al.*, 2001), une diminution du nombre de neurones et du nombre de projections axonales sérotoninergiques (Talbot, 2004).

Ainsi nos résultats montrent un effet cytotoxique sous l'effet des molécules AP1, AP2, plus marqué pour AP3, et ce dès 6h de traitement. Cette cytotoxicité s'exprime dans un premier temps par l'inhibition de la croissance avec une importante déplétion du nombre de cellules. En parallèle, l'observation microscopique des paramécies lors de cette étude a mis en évidence des mouvements désordonnés et une mobilité très lente (résultats non montrés), ceci nous amène à confirmer l'influx des xénobiotiques à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la membrane cellulaire qui pourrait constituer une barrière contre l'entrée massive des xénobiotiques mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998).

Le pourcentage de réponse (Wong *et al.*, 1999), est un paramètre qui confirme bien l'évolution des courbes de croissance des paramécies traitées par les DL₅₀ des différents xénobiotiques. En effet, ce paramètre est un indicateur de mortalité et nous a permis de conclure que la molécule AP3 est la plus toxique et son effet est quasi équivalent à celui du témoin positif le chlorpyrifos éthyl. Ces résultats sont en accord avec ceux de Benbouzid (2012) qui a étudié

l'effet de deux organophosphorés de synthèse de la famille des acaricides sur des protistes ciliés. Il en est de même concernant les travaux de Azzouz *et al.* (2011) avec Amistar Xtra insecticide composé de deux molécules actives, l'Azoxystrobin et le Cyproconazole. Rouabhi (2006) a également mis en évidence la toxicité de deux pesticides, le Diflubenzuron et le Flucycloxuron sur trois modèles cellulaires alternatifs : *Paramecium .sp*, *Tetrahymena pyriformis* et *Tetraselmis suecica* et ce pour les trois modèles utilisés.

Lorsque les micro-organismes sont soumis à des changements avec leur environnement, ils sont stressés. Ce stress peut provoquer leur mort, mais il peut aussi déclencher des systèmes de défense, à travers l'activation de mécanismes de détoxifications, pour leur survie/adaptation. (Lagadic *et al.*, 1997). Les mono-oxygénases à Cyt.P450 ; dans les réactions de la phase (I) de la métabolisation, utilisent des molécules d'O₂ pour leur activité, ce sont des systèmes enzymatiques les plus impliqués dans les mécanismes de détoxifications aussi bien chez les êtres unicellulaires que chez les mammifères (Pelmont, 1995). L'importance des mono-oxygénases à Cyt.P₄₅₀ dans le métabolisme des protistes, est maintenant bien établie. Elles sont responsables d'un grand nombre de réactions d'oxydations intervenant dans la phase de fonctionnalisation des xénobiotiques, provoquant soit une activation, soit une détoxification, conduisant ainsi à un phénomène de résistance. (Delorme, 1985).

La polarographie nous permet de mesurer la quantité d'oxygène consommée par les protistes, et ce en présence ou en absence des amidophosphonates. Avec ce test, nous nous sommes fixés deux objectifs : le premier est lié à la consommation d'oxygène à travers le métabolisme respiratoire, autrement dit, les trois amidophosphonates et le chlorpyriphos éthyl, perturbent-ils la capacité respiratoire des protistes ciliés ? , les mitochondries sont-elles atteintes ?, sachant qu'elles sont un élément essentiel dans le phénomène de l'apoptose. Le second objectif est indirect, et concerne l'oxygène consommé par l'activité des mono-oxygénases lors de la métabolisation des molécules étudiées.

Dans notre travail, la présence molécule AP1, AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl sont à l'origine d'une perturbation de l'activité respiratoire des protistes ; cette perturbation et/ou inhibition est plus marquée chez les traitées part le chlorpyriphos et AP3 qu'elle ne l'est pour AP1 et AP2. Elle pourrait s'expliquer soit par une atteinte directe de la mitochondrie, provoquant ainsi une désorganisation de la chaîne respiratoire, dont la conséquence serait une

inhibition de la consommation d'oxygène (Yoon *et al.*, 2003) ; soit une mobilisation d'enzymes spécifiques à la métabolisation de ce type de xénobiotiques et connues pour leur avidité vis-à-vis de l'oxygène et provoqueraient par conséquent une consommation accrue d'O₂ (Mauchamps 1985).

7. Conclusion

Au terme de cette partie, nous pouvons conclure que les amidophosphonates AP1, AP2, AP3 ainsi que le chlorpyriphos éthyl sont cytotoxiques. Cette toxicité s'est manifestée à travers un ralentissement de la croissance cellulaire et la perturbation du métabolisme respiratoire. De plus la molécule AP1 présente l'effet le moins marqué après respectivement AP2, AP3 et le Chlorpyriphos éthyl

**CHAPITRE 4- ETUDE BIOCHIMIQUE ET
ENZYMATIQUE**

1. Introduction

Le terme biomarqueur désigne un changement observable et/ou mesurable à l'échelle moléculaire, biochimique, cellulaire,.. qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à un xénobiotique. Les biomarqueurs sont classés en 3 catégories : les biomarqueurs d'exposition, d'effet et de susceptibilité. Cette classification est adoptée par de nombreux scientifiques (WHO, 1993; van der Oost *et al.*, 2003).

Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu pénètre dans l'organisme. Dans cette catégorie se trouvent entre autre, les analyses physico-chimiques (nourriture, air, eau,...) ou encore des mesures de fluides biologiques.

Les biomarqueurs d'effet indiquent, qu'après avoir pénétré, le polluant se répand dans les différents tissus, en exerçant des altérations biologiques ou non. Ils incluent les mesures biochimiques, physiologiques ou d'autres altérations dans les tissus ou les fluides corporels de l'organisme. Ce type de biomarqueurs regroupe les mesures des altérations aux niveaux des organes et des tissus.

Les biomarqueurs de susceptibilité sont définis comme des indicateurs de la santé d'un système qui est spécialement sensible à l'exposition à une substance exogène spécifique. Ces marqueurs correspondent par exemple à des mesures métaboliques, génétiques ou encore à l'analyse de mécanismes compensatoires (Theodorakis et Shugart, 1997).

L'induction de ces différents types de biomarqueurs fait généralement suite à une toxicité biotique ou abiotique. Cette toxicité se manifeste alors par l'induction des mécanismes de défense cellulaire. Lorsque la toxicité est due à un stress oxydatif, des espèces réactives à l'oxygène vont se répandre dans le cytosol et en fonction de l'espèce réactive considérée ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$) et de sa cible moléculaire (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques), des produits terminaux d'oxydation seront formés dont certains sont considérés comme biomarqueurs du stress oxydatif. C'est le cas du malondialdéhyde (MDA), la Catalase, le GSH ou encore la GST. L'accumulation des ROS dans la cellule conduit à l'activation de mécanismes de défense, par augmentation des activités enzymatiques antioxydantes parmi lesquelles nous pouvons distinguer :

- ▶ **La Catalase :** responsable de la transformation de H_2O_2 en H_2O et O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour H_2O_2 n'est élevée que lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates *et al*, 1999).

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

- ▶ **Les glutathion S-transférases :** Les glutathions S-transférases constituent un groupe comprenant un très grand nombre d'isoenzymes. Elles peuvent être très abondantes dans les cellules suivant les localisations tissulaires (Van Bladeren, 1988). Ces enzymes possèdent de nombreuses fonctions, la plupart étant en relation direct avec les mécanismes de protection cellulaire. Leur rôle majeur est la détoxification d'un très grand nombre de composés électrophiles lors du métabolisme de phase II du processus de détoxification cellulaire. Ainsi elles catalysent l'addition du groupement thiol du glutathion sur le groupement électrophile hydrophobe à éliminer. (Beckett et Hayes, 1993).

Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un stress oxydant potentiel induit par la les trois amidophosphonates de synthèse chez *Paramecium tetraurelia* et ce à travers le suivi de certains biomarqueurs du stress au niveau cellulaire : la teneur en GSH et en MDA comme indicateur de la peroxydation lipidique, ainsi que la mesure des activités catalase et GST.

2. Matériel et méthodes**2.1. Matériel biologique et chimique**

Le traitement des paramécies, leur méthode de culture ainsi que le choix des concentrations des xénobiotiques sont décrits dans le chapitre (2). Pour suivre l'évolution des biomarqueurs, après chaque temps de traitement, des aliquotes de paramécies sont centrifugés à (15000 rpm/10 min), puis les culots conservées dans les solutions tampon por les différents dosages.

2.2. Méthodes**2.2.1. Dosage des Protéines totales**

Les protéines sont dosées selon la méthode décrite par Bradford (1976). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm grâce à un spectrophotomètre visible (JENWAY 6300). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine de sérum bovin (BSA).

2.2.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux de glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker et Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5 mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc, où les 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée. Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante

:

$$X = \frac{\Delta Do \cdot Vd \cdot Vt}{13,1 \cdot Vh \cdot Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

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

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

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol ($-\text{SH}$).

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

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

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

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

2.2.3. Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

L'activité est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do \cdot Vt}{9,6 \cdot Vs} \text{ / mg de protéines}$$

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

ΔDo : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6: coefficient d'extinction molaire du CDNB.

Vt : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

2.2.4. Mesure de l'activité Catalase (CAT)

La mesure de l'activité Catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de Regoli et Principato (1995) dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à une longueur d'onde de 240nm. L'activité Catalase (CAT) est exprimée en μmol d' H₂O₂ par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do \cdot 10}{\epsilon \cdot L \cdot 0,05} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

X : μmoles de H₂O₂ consommées par minute et par mg de protéines

Δ Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat

ε : Le coefficient d'extinction est de 0,040 mM⁻¹.Cm⁻¹

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

2.2.5. Dosage des malondialdéhydes (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont quantifiés selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm.

Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

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

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (μM/mg de protéines).

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

156 : coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : volume total dans la cuve : 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDA].

Vs : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

3. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique est effectuée par le t-test de Student à l'aide du logiciel MINITAB version 13.31 Fr. (Dagnelie, 1999).

4. Résultats

4.1. Effets des amidophosphonates sur le taux des protéines totales.

La figure (23) met en évidence les variations du taux de protéines totales en fonction du temps et des différentes concentrations de AP1, AP2, AP3. Nous constatons que le taux de protéines augmente aussi bien pour les témoins que pour les traitées durant les 6 premières heures du traitement, avec une augmentation significative ($P \leq 0.05$) pour les traitées avec AP2 et hautement significative ($P \leq 0.01$) pour les traitées avec AP3 et le chlorpyriphos éthyl. Après 24h de traitement, une déplétion progressive, hautement significative ($P \leq 0.01$) du taux de protéines totales est observée chez les traitées par AP1 et très hautement significative ($P \leq 0.001$) pour celles traitées par AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl.

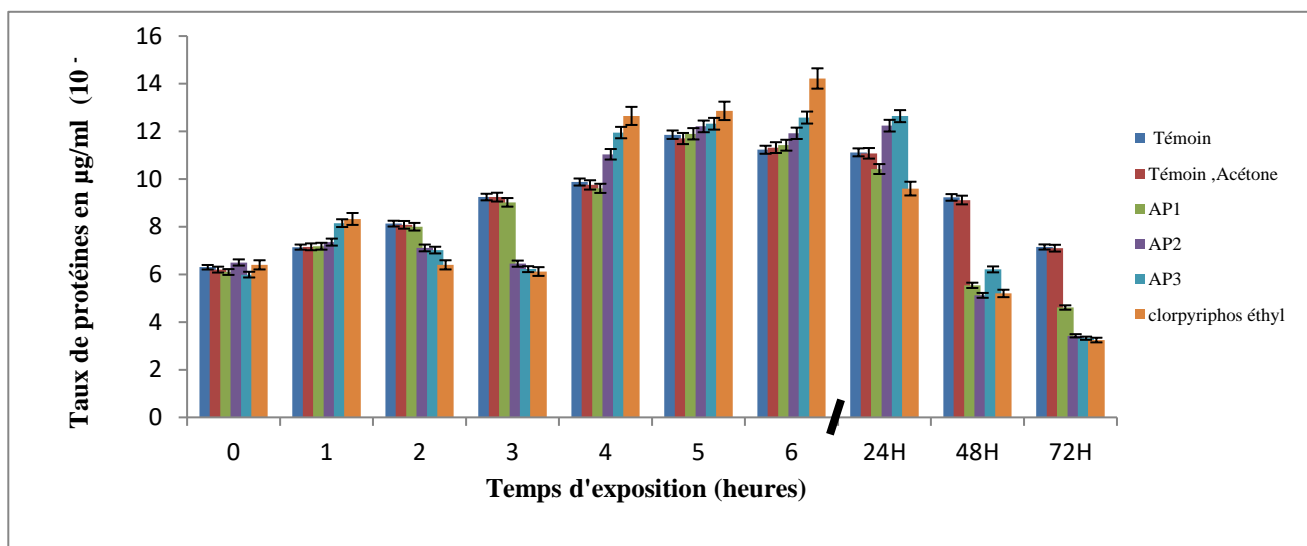


Figure 23. Effets des amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) sur les variations du taux de protéines totales en fonction du temps.

4.2. Effets des amidophosphonates sur les variations du taux de GSH

L'effet du traitement par les amidophosphonates AP1, AP2, AP3 sont regroupés dans la figure (24). Après 2 heures de traitement, une augmentation non significative ($P \geq 0.05$) du taux de GSH est observée chez les cellules témoins et témoins acétone pendant toute la durée du traitement. Cependant, à partir de la troisième heure, une diminution significative ($P \leq 0.05$) du taux de GSH est remarquée chez les cellules traitées avec AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyle par rapport aux témoins.

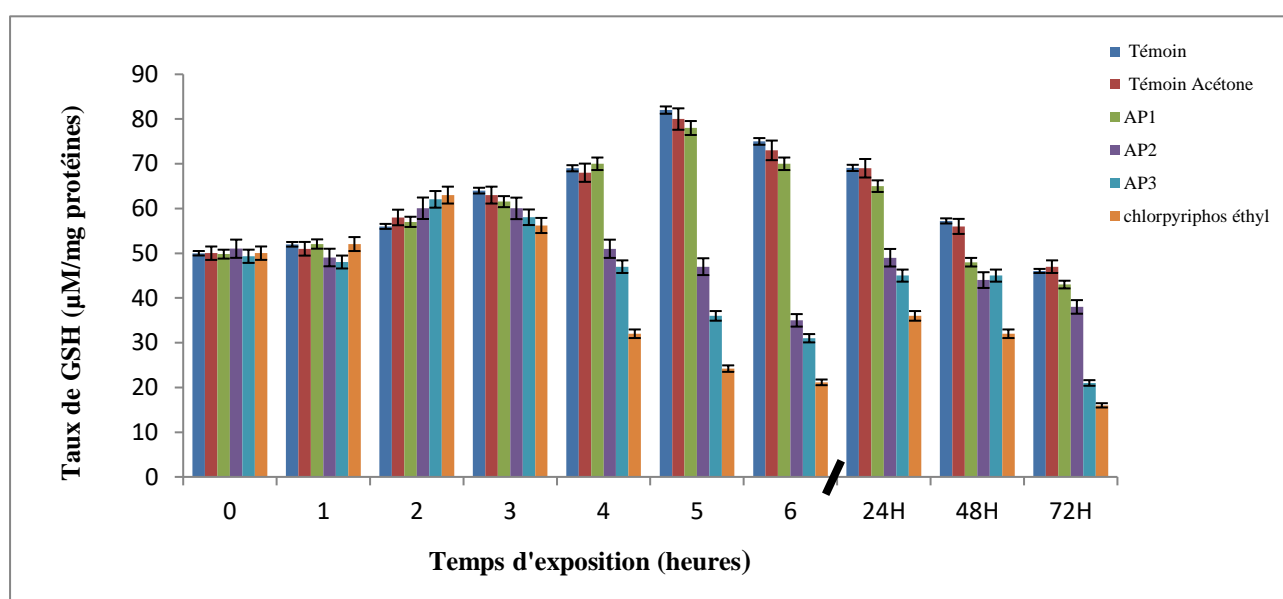


Figure 24. Effets des amidophosphonates sur le taux de GSH en fonction du temps.

4.3. Effets des amidophosphonates sur l'activité Glutathion S-transférase

L'activité GST augmente progressivement en fonction du temps chez les traités par les amidophosphonates et le chlorpyriphos éthyl (fig. 25). Après 6 heures d'exposition aux xénobiotiques, l'activité GST augmente d'une manière significative ($P \leq 0.05$) comparée aux témoins. Cette augmentation est respectivement de l'ordre de 13%, 14%, 16%, et 17% pour les molécules AP1, AP2, AP3 et le chlorpyriphos éthyl. Nous remarquons également qu'entre 6 et 72 heures de traitement, l'activité GST diminue de manière hautement significative ($P \leq 0.01$) chez les cellules témoins et passe de 9.1 à 2,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéines. Cependant, cette activité augmente ($P \leq 0.05$) de l'ordre de 26%, pour AP1 et AP2 et 27% et 54% respectivement pour AP3 et le chlorpyriphos éthyl ($P \leq 0.01$) par rapport aux témoins.

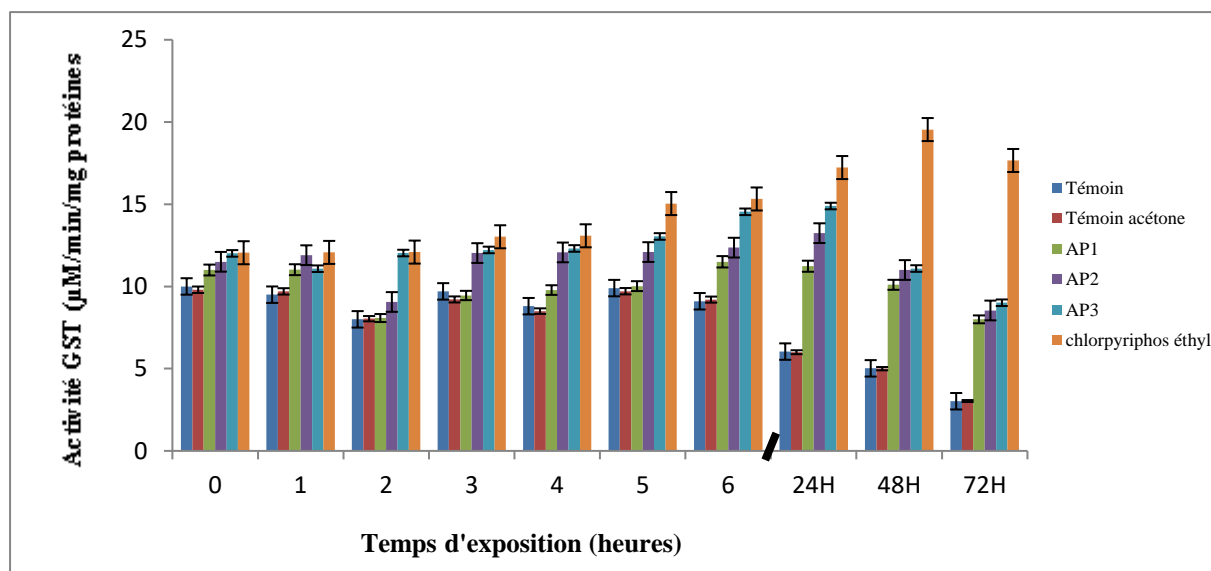


Figure 25. Effets des amidophosphonates sur les variations de l'activité GST.

4.4. Effets des amidophosphonates sur l'activité catalase

L'activité catalase augmente d'une manière significative après 2 heures d'exposition à AP2 et AP3 (fig.26). Cette augmentation est de l'ordre de 14, 25 et 32 % par rapport aux témoins ($P \leq 0.05$). Entre 2 et 5 heures de traitement, aucune variation significative de l'activité catalase n'est observée. Cependant, à partir de 5 heures de traitement, nous constatons une diminution progressive de l'activité catalase pour tous les traités. En effet, au temps 72 heures cette activité est de l'ordre de 63, 32, 24 et 13% plus importante respectivement pour AP1, AP2, AP3 par rapport aux témoins ($P \leq 0.01$).

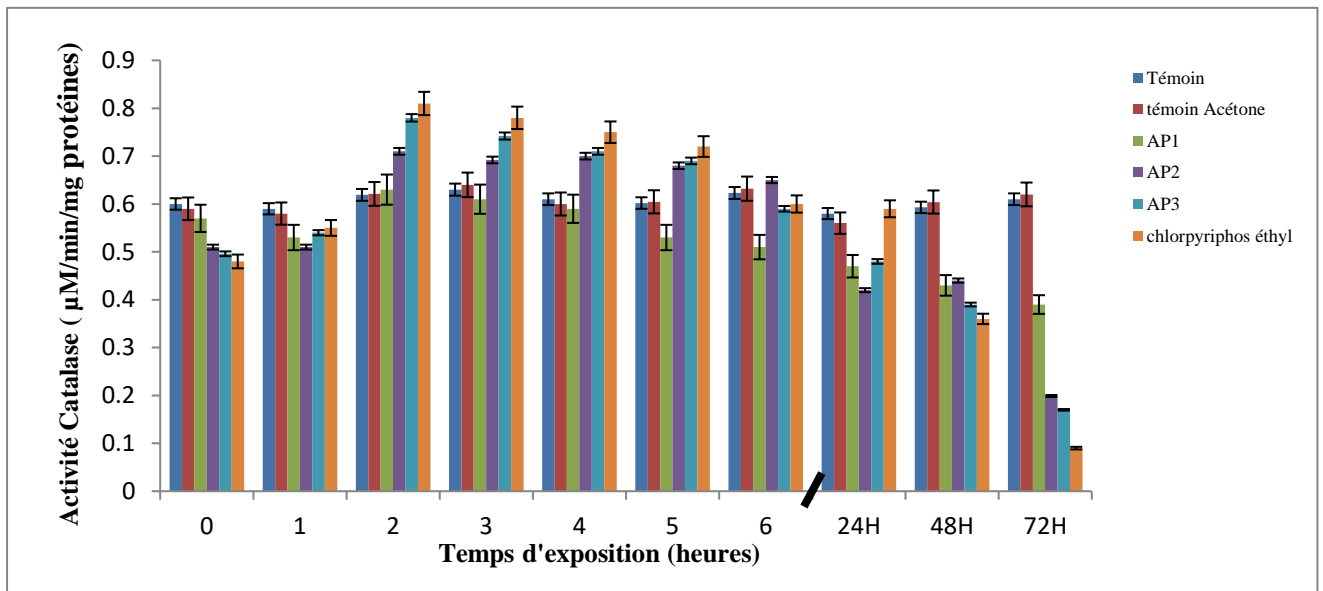


Figure 26. Variation de l'activité catalase en fonction du temps et des différents amidophosphonates chez les paramécies

4.5. Effets des amidophosphonates sur peroxydation lipidique

La mesure de la peroxydation lipidique déclenchée par l'exposition aux amidophosphonates a été évaluée par quantification de malondialdéhyde (MDA) (Fig. 27). Dès la 1ère heure du traitement, le niveau d'MDA augmente de manière significative pour tous les composés par rapport à celui des témoins acétone ($P \leq 0.05$). La production d'MDA est en augmentation continu jusqu'à 6 heures du traitement. Après 6 h de traitement, le niveau d'MDA chez les cellules exposées à AP1, AP2, AP3 et chlorpyriphos éthyle est 1.4-, 4-, 4.3- et 4,7 fois supérieure à celui chez les cellules traitées avec l'acétone. Toutes ces différences sont statistiquement significatives ($P \leq 0.05$ pour AP1, $P \leq 0.01$ pour AP2, AP3 et le chlorpyrifos éthyle par rapport aux témoins acétone). De 6 à 72 d'exposition, le niveau d'MDA accumulé chez les traitées par chlorpyriphos éthyle ne changent pas, ce qui suggère que l'état d'équilibre de ce composé a été atteint après 6 heures. Par contre, De 6 à 72 h d'exposition, le niveau d'MDA accumulé a diminué progressivement chez les traitées par AP1, AP2 et AP3. Cette diminution est significativement 1.5-, 2.1- et 3,5 fois supérieure à celle chez les témoins acétone ($P \leq 0.05$).

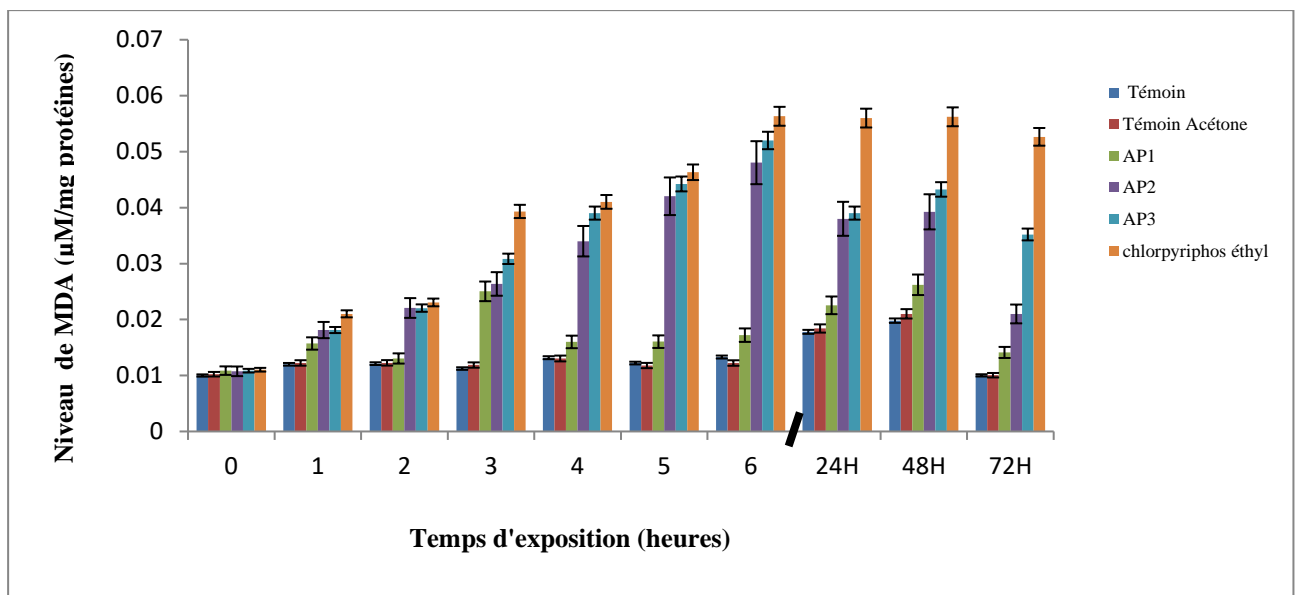


Figure 27. Effets des amidophosphonates sur la variation du taux de MDA

5. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre nous avons utilisé l'approche biochimique et enzymatique sur *Paramecium tetraurelia* pour définir le degré de toxicité induit par les amidophosphonates. Dans un premier temps nous avons mis en évidence une augmentation des protéines chez les paramécies traitées par les amidophosphonates. Cette induction du pool de protéines est décrite par Massaya et *al.*(2002) qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux des protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapin), ainsi que par Sbartai et *al.*(2009), qui ont montré que les manifestations toxiques du bifénazate (acaricide) sur la paramécie, sont accompagnées par une induction dose dépendante de la synthèse protéique, le même effet est constaté après le traitement des protistes ciliés avec quatre acaricides Chlorfenapyr, Fenazaquin, Fenbutatin oxyde et Tebufenpyrad (Benbouzid,2007).

Soumis à un stress exogène, les microorganismes ont la capacité de développer toute une batterie de réponses capables d'enclencher un processus de détoxification, vis-à-vis des Xénobiotiques, afin de lutter et/ou s'adapter au stress chimique (Lagadic et *al.*, 1997 ;Perez-Rama,2001). Ce processus est d'ordre biochimique et consiste entre autres en la synthèse des protéines. Cette augmentation protéique suggère une induction de la synthèse d'enzymes de détoxification et de métabolisation.

Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres dans l'organisme (Aurousseau, 2002) et lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement, une altération des composants cellulaires survient. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et les membranes dans leur ensemble (Radi et *al.*, 1991 ; Haliwell et Chirico,1993), glucides et ADN (Jaeschke 1995 ;Meneghini1997).Pour faire face à cela, les protistes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant et à ce propos, de nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (Piccini et *al.*, 1994 ; Massaya et *al.*,2002 ; Redouane-Salah, 2004).

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, pouvant aller jusqu'à la mort particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxification sont déplétées. Ce stress peut être moins intense, permettant alors à l'organisme de déployer une batterie de réponses, telles que 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). A cet effet, l'utilisation de biomarqueurs devient indispensable. Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des êtres vivants exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et *al.*, 1992). Il en est ainsi du système GSH/GST intervenant dans les réactions de conjugaison des électrophiles (Huggett et *al.*, 1992 ; Lagadic et *al.*, 1997 ; Kammenga et *al.*, 2000).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une implication de ce système de détoxification à travers une augmentation de l'activité GST et une diminution du taux de GSH chez les paramécies traitées avec les amidophosphonates. Nos résultats sont en accord avec ceux de Azzouz (2012), qui a étudié la toxicité d'un insecticide, à base d'azoxystrobin et de cyproconazole sur *paramecium tetraurelia*, où encore Benbouzid et *al.* (2012), qui ont testé des phosphoramidates sur *paramecium aurelia*. et ont tous mis en évidence l'induction de ce système à travers l'augmentation de l'activité GST. Ainsi, l'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH, sont dus au fait que Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur, 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 et les métaux lourds (Dickinson et Forman 2002 ; Viarengo et Nott, 1993; Viarengo, 1994). 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).

Les glutathion S-transférases (GSTs) sont des enzymes du métabolisme de détoxification de la phase II capables de conjuguer une molécule de glutathion réduit (GSH) au centre électrophile d'un xénobiotique afin de rendre celui-ci plus soluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains

xénobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (Vidal, 2001).

Le MDA est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation des acides gras poly insaturés membranaires, c'est également un sous produit de la biosynthèse de la prostaglandine (Coeurdassier, 2001), la peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Bebiano et *al.*, 2005) et des composants lipidiques (AlMutairi et *al.*, 2007) . Il s'ensuit une perte de la perméabilité et du potentiel de membrane, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Pampanin et *al.*, 2005). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort cellulaire. Ainsi, la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002). Djekoun (2012) et Sbartai (2013) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA respectivement chez *sacharomyces cerevisiae* et *paramecium sp.* sous l'effet d'un stress abiotique. L'étude de Mountassif et *al.* (2007) a également mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez *tetrahymena pyriformis* traitée avec un polluant métallique. Nos résultats abondent dans le même sens, puisque le traitement des paramécies par les amidophosphonates induit une augmentation de ces biomarqueur de stress particulièrement pour AP3.

Ainsi, au terme de cette partie nous avons pu mettre en évidence un effet inducteur du stress radicalaire chez les paramécies traitées par les amidophosphonates testés, ce stress radicalaire est suivi d'une forte activité enzymatique particulièrement la GST ainsi qu'une diminution du taux de GSH dont le rôle d'une part dans le piégeage des radicaux libres est établi et d'autre part dans la réaction de conjugaison de la phase II, en tant qu'agent de conjugaison hydrophile endogène. Cet état de stress est confirmé par l'induction de l'activité catalase qui fait partie du système antioxydant enzymatique et dont le rôle principal est la protection de la cellule contre le H₂O₂. D'un autre côté, l'installation du stress oxydant est confirmée par l'augmentation d'un des produits de la peroxydation lipidique à savoir les MDA.

**CHAPITRE 5- EVALUATION FONGITOXIQUE SUR DEUX
SOUCHES FONGIQUES *SEPTORIA TRITICI*
ET *AALTERNARIA TENUIS***

1. Introduction

Les molécules possédant un groupement phosphonate sont largement étudiées en tant qu'agents antiviraux (Snoeck *et al.*, 2002), antibiotiques (Johnstone et Rose, 1797), neuroatcifs (Ortalo-Magne *et al.*, 2005), herbicides (Matsuno-Yagi *et al.*, 1993., 2001), fongicides (Hussine *et al.*, 1999) ou encore anticancéreux (Guigan *et al.*, 2005).

La lutte chimique reste le moyen de lutte le plus efficace à court terme. Depuis les années 1930, l'évaluation de milliers de molécules nouvelles a permis le développement progressif de matières actives antiparasitaires de plus en plus performantes. (Serghat *et al.*, 2004).

En agriculture, les phosphonates se distinguent par leur excellente efficacité vis-à-vis des maladies provoquées par divers Phycomycètes comme exemple les Phytophthora, et par leurs propriétés biologiques (Guest *et al.*, 1988) : ce sont des agents chimiques « alternatifs », n'agissant pas sur le pathogène lui même, mais faisant intervenir les mécanismes de défense de la plante hôte. Si leur activité dans la lutte contre les champignons inférieurs (Oomycètes) est reconnue, ils pourraient aussi être utilisés contre d'autres classes de champignons (Barchietto, 1989., Bompeix, 1989).

L'évaluation de l'activité biologique potentielle, notamment pesticide des amidophosphonates est à l'origine de l'association phosphonyl-carboxamide (Lejczak *et al.*, 1985). Dans ce travail nous nous sommes intéressés à trois nouvelles molécules de synthèse que nous avons appelées (AP1, AP2 et AP3) contenant le motif amidophosphonate. Notre objectif étant de mettre en évidence une activité antifongique (Fongitoxicité) de ces trois molécules et d'étudier leur action sur la croissance de deux isolats de champignons imparfaits : *Septoria tritici* et *Aalternaria tenuis* qui sont à l'origine de certaines maladies foliaires du blé dur (*Triticum durum*). Le blé étant un modèle biologique de choix pour les essais toxicologiques en plus d'être une céréale qui occupe une place importante en Algérie et constitue l'épine dorsale de son système alimentaire (Khalil, 1977). De ce fait, son infestation par des moisissures peut causer des pertes importantes en réduisant sa qualité et/ou sa quantité (Terrain et Graallet, 2003).

2. Matériel et Méthodes

Notre travail a été effectué au niveau de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV), Ben Mhidi El KOUS - wilaya d'El Taref.

2.1. Matériel biologique

Les souches fongiques étudiées sont *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis*.

2.1.1. Isolement et identification des souches fongiques

Les souches fongiques étudiées sont isolées à partir des feuilles de blé d'un champ de culture entre le mois de novembre 2012 et le mois d'avril 2013 , identifiées et analysées au niveau du laboratoire de mycologie de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) (fig. 28). Cette identification repose sur des critères macroscopiques (Aspect général des colonies) microscopiques (Etude des filaments végétatifs, des organes de fructifications et des spores... etc.) (Chabasse, 2002)



Figure 28. Isolement et identification des souches fongiques: (A) *Septoria tritici* (G×40) , (B) *Alternaria tenuis* (G×60)

A. *Alternaria tenuis*

Alternaria tenuis est un saprophyte présent sur de nombreuses espèces de semences, ce champignon est rencontré sur les feuilles, les fruits ou les graines de nombreux végétaux. Il s'y installe sous forme de taches noirâtres, notamment à la suite d'attaques d'insectes, de parasites divers ou en fin de végétation. (Champion, 1997).

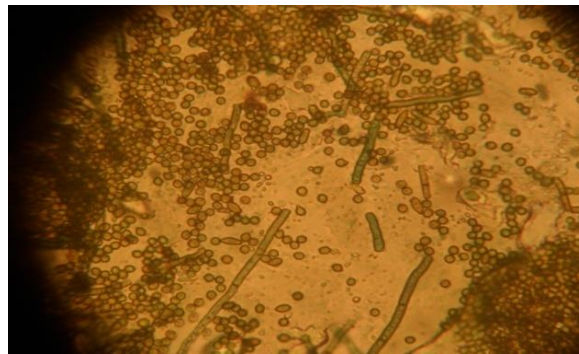


Figure 29. Conidiophores et spores d'*Alternaria tenuis* sous microscope photonique (G×60)

B. *Septoria tritici*

La septoriose est une maladie foliaire que l'on observe sur toutes les parties de la plante en végétation. En réalité, deux champignons sont à l'origine de cette maladie : *Septoria nodorum* Berkeley et *Septoria tritici* Rob. et Desm., mais seul *S. tritici* est transmise par la semence. (Champion, 1997).

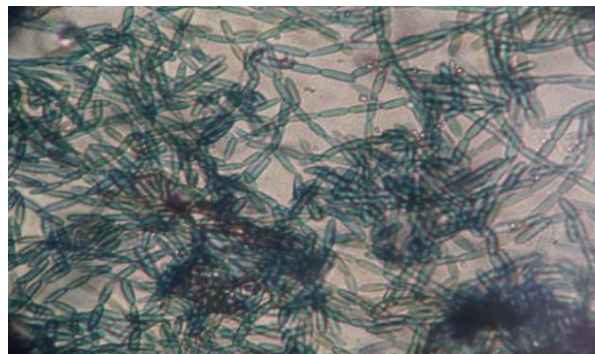


Figure 30. Spores de *Septoria tritici* sous microscope photonique (G×60)

2.2. Matériel chimique

Le matériel chimique utilisé dans notre étude est constitué de trois molécules de synthèse AP1, AP2, AP3 précédemment décrites (Chapitre 3 : matériel et méthodes). Après plusieurs tests au laboratoire, nous avons retenu des concentrations de: 10, 25 et 40 μ M pour la molécule AP1, 15, 20 et 25 μ M pour la molécule AP2 et 10, 15 et 20 μ M pour la molécule AP3.

2.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique

2.3.1. Choix du milieu de culture

La souche de *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis*, ont été revivifiées dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre sur milieu *Malt-agar* à raison 20 ml par boîte, incubé dans une enceinte climatique à une température comprise entre 20 et 22°C à l'obscurité pendant 7 jours. (Champion, 1997).

2.3.2. Evaluation de l'activité antifongique des molécules AP1, AP2 et AP3 :

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu solide (Méthode des disques) selon la méthode de Delahousse (2003) (fig. 31). La mesure du diamètre d'inhibition de la poussée des champignons, permet de calculer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et d'évaluer le pourcentage d'inhibition par rapport à l'activité d'un antifongique de référence (commercialisé en Algérie : le mancozèbe (6 μ M))

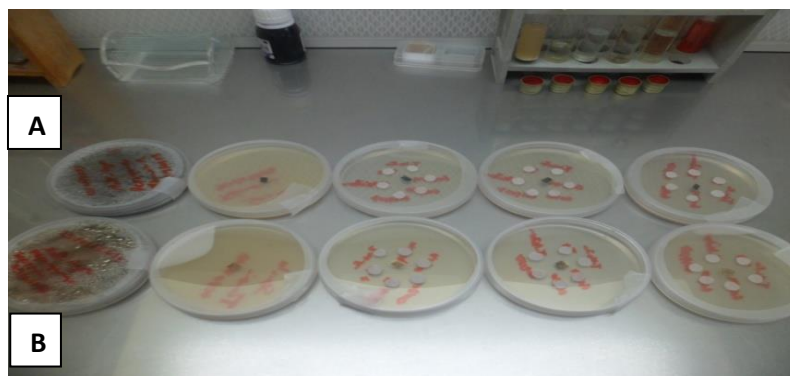


Figure 31. Traitement des souches étudiées : (A) *Alternaria tenuis*, (B) *septoria tritici*

2.3.2.1 Détermination des diamètres des zones d'inhibitions

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide comme rapportée par Rasooli *et al.*, (2008). Des disques de papier wattman №40 de 6 mm de diamètre préalablement préparés et imbibés par les différentes concentrations de : AP1 (10, 25, 40 µM), AP2 (15, 20, 25µM) et AP3 (10, 15, 20 µM) sont déposés sur la gélose que nous avonsensemencée par une suspension de *Septoria tritici* et *Alternaria tenui*, à partir d'une pré-culture de 2 jours. L'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle graduée (y compris le diamètre de disque de 6mm). Les résultats sont exprimés en mm .

Nous avons également utilisé le mancozèbe comme fongitoxique de référence pour le contrôle positif, l'eau distillée pour le contrôle négatif et un témoin acétone à 2% à 6µM. L'incubation est réalisée dans une enceinte climatique à une température de 20±2°C pendant 7 jours.

2.3.2.2. Détermination des pourcentages d'inhibitions

La croissance de filaments est relevée quotidiennement et une mesure des diamètres des deux colonies est réalisée à la fin du temps approprié d'incubation (7jours) pour calculer le taux d'inhibition I' (%) (Laib, 2012).

$$I'(\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

I' (%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage.

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes témoins.

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes testées.

2.3.2.3. Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

Nous avons utilisé des concentrations ayant eu des pourcentages d'inhibition supérieurs ou égal à 50%. Des aliquots de 100 µl de nos solutions sont ajoutés 900 µl du milieu de *malt-agar* liquide contenant la souche à tester. Les tubes ainsi préparés sont incubés à 20±2° C pendant 7 jours. Après l'incubation, on repère les tubes dans lesquels on ne note aucune croissance de moisissures (la CMI: concentration minimale pour laquelle on ne note aucune croissance des moisissures comparativement au témoin) elle renseigne sur l'efficacité des molécules étudiées. (Rotimi *et al.*, 1988).

3. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique est effectuée par le *t*-test de Student à l'aide du logiciel MINITAB version 13.31 Fr.

(Dagnelie, 1999).

4. Résultats

4.1. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP1

Le tableau (04) met en évidence l'évaluation de l'activité antifongique de la molécule AP1. Nous constatons que pour la concentration 10 μ M, le diamètre d'inhibition de la souche *Septoria tritici* est de 15mm pour la molécule AP1, alors que pour *Alternaria tenuis*, celui-ci est de 12,4mm. L'augmentation du diamètre d'inhibition est dose dépendante et atteint son maximum (22,33mm) à la concentration 40 μ M, valeur proche du témoin positif. Contrairement aux témoins et témoins acétone qui ne possèdent aucun effet inhibiteur (0mm).

Tableau 04. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm \pm l'écart type) de *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis* traitées avec la molécule AP1.

AP1	Témoin positif	Témoin négatif	Témoin Acétone	10 μ M	25 μ M	40 μ M
Zones d'inhibition (mm) <i>Septoria tritici</i>	22.2 \pm 0.65	0	0	15* \pm 0.32	16.07* \pm 0.24	17.57 \pm 0.24
Zones d'inhibition (mm) <i>Alternaria tenuis</i>	23 \pm 1.02	0	0	12.4* \pm 0.33	21.83 \pm 0.66	22.33 \pm 0.22

t-test * $P \leq 0.0$; n = 5.

4.2. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP2

Le tableau (05) met en évidence l'effet de la molécule (AP2) sur la croissance des souches de *Septoria tritici* et d'*Alternaria tenuis*, Nous constatons un effet inhibiteur de la molécule de référence (témoin positif) allant de 22,5mm pour *Septoria tritici* jusqu'à 23,3mm pour *Alternaria tenuis*. Par contre l'effet inhibiteur de AP2 semble plus marqué chez la souche *Alternaria tenuis* avec des diamètres d'inhibition variant entre 14 et 23,98 mm pour les différentes concentrations utilisées. Le témoin négatif et le témoin acétone ne présentent aucun effet inhibiteur.

Tableau 05. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm± l'écart type) de *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis* traitées avec la molécule AP2.

AP2	Témoin positif	Témoin négatif	Témoin Acétone	15µM	20µM	25µM
Zones d'inhibition (mm) <i>Septoria tritici</i>	22.5 ±0.58	0	0	17.2 ±0.66	21.73 ±1	22.08 ±0.78
Zones d'inhibition (mm) <i>Alternaria tenuis</i>	23.3mm ±0.2	0	0	14* ±0.32	22.55 ±0.28	23.98 ±0.28

t-test * $P \leq 0.05$ n = 5.

4.3. Diamètre des zones d'inhibitions sous l'effet de la molécule AP3.

Le tableau (06) illustre l'activité de la molécule AP3 sur la croissance des deux souches étudiées. Nous constatons que cette molécule semble avoir une activité inhibitrice dose dépendante, plus marquée chez la souche *Alternaria tenuis*. Les diamètres d'inhibition varient entre 18,9 mm et 22,3 pour *Septoria tritici* et de 15,82 jusqu'à 23 mm pour *Alternaria tenuis* pour les différentes concentrations utilisées. Parallèlement, le témoin positif a révélé une activité inhibitrice supérieure à celle de la molécule AP3. Cependant les témoins négatifs et acétone ne possèdent aucun effet inhibiteur (0mm).

Tableau 06. Moyenne des diamètres des zones d'inhibitions (mm ± l'écart type) de *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis* traités avec la molécule AP3.

AP3	Témoin positif	Témoin négatif	Témoin Acétone	10µM	15µM	20µM
Zones d'inhibition (mm) <i>Septoria tritici</i>	23 ±0.43	0	0	18.9 ±0.05	21,9 ±0,1	22.3 ±0.03
Zones d'inhibition (mm) <i>Alternaria tenuis</i>	23.06mm ±0.1	0	0	15.82* ±0.012	22.78 ±0.08	23 ±0.02

t-test * $P \leq 0.05$ n = 5.

4.4. Détermination des pourcentages d'inhibition

Le tableau (07), regroupe les valeurs des pourcentages d'inhibition obtenus à partir des diamètres d'inhibition. Ainsi nous constatons que les molécules AP1, AP2 et AP3 sont toutes actives mais cette activité est variable. Ainsi, concernant *Alternaria tenuis*, la molécule AP1 a donné des taux d'inhibition supérieurs à 50% pour les concentrations de 25 et 40µM, ces taux sont significatifs ($P \leq 0.05$). Cependant *Septoria tritici* s'est révélée moins sensible avec un taux d'inhibition significatif ($P \leq 0.05$) de 50,12% pour la plus forte concentration (40µM). *Alternaria tenuis* se révèle plus sensible vis-à-vis de la molécule AP2 (les concentrations utilisées sont plus faibles comparativement à celles de la molécule AP1), les pourcentages d'inhibition sont significatifs ($P \leq 0.05$) et supérieurs à 50% pour les trois concentrations utilisées.

Tableau 07. Pourcentage d'inhibition I' (%) d'AP1, AP2 et AP3 vis-à-vis des deux souches testées.

Concentrations		I' (%) AP1						I' (%) AP2						I' (%) AP3					
		Témoin négatif	Témoin acétone	Témoin positif	10µM	25µM	40µM	Témoin négatif	Témoin acétone	Témoin positif	15µM	20µM	25µM	Témoin négatif	Témoin acétone	Témoin positif	10µM	15µM	20µM
<i>Septoria tritici</i>	I' (%)	-	0	58,54 ±0,24	45,45 ±0,22*	47,4 ±0,24*	50,12 ±0,12	-	0	59,09 ±0,56	49,45 ±0,63	57,69 ±0,16	58,32 ±0,37	-	0	59,8 ±0,03	50,0± 0,07*	58 ±0,11	58,51 ±0,1
<i>Alternaria tenuis</i>	I' (%)	-	0	73,33 ±0,03	49,77* ±0,12	70,73 ±0,06	71,84 ±0,07	-	0	74 ±0,1	51,11 ±0,05*	54,55 ±0,03*	59,95 ±0,3	-	0	73,8 ±0,21	52,1± 0,19*	57,0± 0,01*	59,1± 0,62*

t-test * $P \leq 0.05$ n = 5; x ± SE.

Concernant la souche *Septoria tritici*, le pourcentage d'inhibition est significatif ($P \leq 0.05$) et supérieur à 50% uniquement pour les concentrations 20 et 25 µM.

Cependant, la molécule AP3 semble la plus active avec des pourcentages d'inhibitions supérieurs à 50% sur les deux souches fongiques et ce pour toutes les concentrations testées particulièrement chez *Alternaria tenuis*.

4.5. Détermination des CMI

Le tableau (08) regroupe les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des molécules AP1, AP2 et AP3 sur les deux souches fongiques étudiées. Nous nous sommes intéressés uniquement aux pourcentages d'inhibition dépassant 50%.

Tableau 08. CMI des molécules AP1, AP2 et AP3 en milieu liquide.

		AP1	AP2	AP3
CMI en μM	<i>Septoria tritici</i>	40 μM	25 μM	15 μM
	<i>Alternaria tenuis</i>	25 μM	15 μM	10 μM

Les CMI obtenues varient en fonction des molécules et des espèces fongiques. La molécule AP1 est active sur les deux souches fongiques (*Septoria tritici* et *Alternaria tenuis*) avec des CMI respectivement de 40 μM et 25 μM . La molécule AP2 possède une activité plus importante avec des CMI respectivement de 25 μM pour la souche *Septoria tritici* et 15 μM pour la souche *Alternaria tenui*. La molécule la plus active est AP3 avec des CMI de 15 μM pour la souche *Septoria tritici* et 10 μM pour la souche *Alternaria tenui*.

5. Discussion

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne (Nagendra *et al.*, 2010). La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (Chami, 2005) et d'autre part, aux molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Nagendra *et al.*, 2010; Prasad et Kapoor, 2004).

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de trois α -amidofosphonates modifiés, vis-à-vis de deux variétés de souches fongiques. Un des facteurs déterminant l'intensité de l'action antifongique est la dose appliquée, comme le suggèrent Do Amaral *et al.*, (1998); Evans et Martin, (2000) et Castillejos *et al.*, (2006) qui ont testé l'activité antifongique de certaines huiles essentielles. Nos résultats ont mis en évidence une diminution dose dépendante de la croissance mycélienne de *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis*, pour les trois molécules testées avec des zones d'inhibition plus marquées pour AP3. Cet effet des fongicides serait dû à l'inhibition du métabolisme respiratoire et énergétique des cellules fongiques, ou à la désorganisation cellulaire lors de la division cellulaire (Rocher, 2004). Selon McEwan, (1994), cette inhibition peut être aussi due au blocage de la germination des conidies : première étape essentielle dans la séquence d'opérations menant à l'établissement d'un tube germinatif et d'un hyphe, par la suite. Le processus commence par l'hydratation suivie de l'action des enzymes lytiques telles que la chitinase et α et β - glucanases. Ceci décompose la paroi cellulaire des conidies épaissie pour permettre l'apparition du tube digestif initial. Une fois que cet événement a lieu, il y a un équilibre entre les systèmes lytiques et synthétiques d'enzymes nécessaires pour la prolongation normale des hyphes. Un déséquilibre dans l'un ou l'autre système d'enzymes mène à l'inhibition et/ou au blocage de la croissance. D'un autre côté, les amidofosphonates (oranophosphorés), ont un pouvoir inhibiteur de la peroxydation lipidique identique à celui résultant de l'activité du tolclofos-méthyl fongicide utilisé contre le *Rhizoctone* de la pomme de terre (Rocher *et al* 2004). Les phosphonates sont des produits fortement systémiques : ils parcourent la plante entière par les deux courants de la sève (Leconte *et al.*, 1988). Ils stimulent indirectement le système de défense des plantes. En effet, chez les végétaux (*Arabidopsis*), Chuang *et al.*, (2000) ont montré que le fosétyl induit l'expression d'une PR-protéine, *PR-1* impliquée dans la résistance systémique acquise. Bomeix *et al* (1981); Saindrenan *et al* (1990) ont mis en

évidence que le phosphonate est le métabolite actif du phoséthyl-Al, fongicide systémique. Son mécanisme d'action est différent de celui des fongicides à action directe puisqu'il perturbe le métabolisme des agents pathogènes et conduit à une hyperproduction de métabolites secondaires éliciteurs des réactions de défense des plantes. Nos résultats ont mis en évidence un pouvoir antifongique des molécules AP1, AP2, et AP3 sur les deux souches testées ce qui confirme l'efficacité des COP sur les maladies foliaires du blé dur. Ce résultat est en accord avec ceux de Zahri *et al.*, (2008) qui ont mis en évidence un bon pouvoir antifongique contre la *Septoriose* du blé due à *Septoria tritici*, sous l'effet de fongicides notamment les triazolés, les carbendazimes, et les dérivés carbamate. De plus, nos résultats ont montré que la souche d'*Alternaria tenuis* semble être la plus sensible aux amidophosphonates testés, confirmant ainsi les travaux de Bouguerra (2012), qui indique que le genre *Alternaria* est plus sensible au traitement par des huiles essentielles extraites des graines de fenouil avec une inhibition totale à 4 mg/ml. Les travaux de Laib, (2012) ont également montré que le genre *Alternaria* isolé des pois chiches est sensible à un traitement aux huiles essentielles de fleurs sèches de *Lavandula Officinalis*. Le mancozèbe ou monoalkyldithiocarbamate, habituellement utilisé contre les helminthosporioses et les rouilles, est aussi efficace sur *Septoria tritici* et *Alternaria tenuis*. Ce fongicide de contact, possède une activité préventive, sa fongitoxicité est attribuée principalement à sa capacité de générer de l'isothianate, qui inactive le groupement thiol des enzymes et des métabolites dans les cellules fongiques (Ragsdal, 1992). Le taux d'inhibition et la détermination des CMI des amidophosphonates sur les souches fongiques par la méthode de dilution en milieu liquide confirment les résultats obtenus en milieu solide. La différence de sensibilité que nous avons obtenue peut être due à la sensibilité de l'espèce fongique vis à vis de la molécule testée, à savoir le type de microorganisme ciblé (Magan *et al.*, 2004) ou encore à la structure des trois molécules étudiées qui pourrait influencer leur activité.

6. Conclusion

Au cours de cette partie de notre travail, nous avons mis en évidence d'une part l'existence d'une fongitoxicité des trois molécules nouvellement synthétisées : α -amidophosphonates modifiés (AP1, AP2 et AP3) avec une sensibilité plus marquée pour la souche *Alternaria tenuis*, d'autre part la molécule AP3 semble être la plus active.

**CHAPITRE 6- EVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO*
DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES
AMIDOPHOSPHONATES**

1. Introduction

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobies, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR) (Meziti, 2009). A faibles concentrations, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent un rôle important dans divers mécanismes physiologiques. Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). L'espèce agressée devient à son tour radicalaire provoquant une perturbation de la cellule vivante. La surproduction des EOR au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement (McClements *et al.*, 2000). Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Pour cela, les antioxydants sont largement étudiés pour leur capacité à protéger les organismes et les cellules des dommages induits par le stress oxydatif au cours du métabolisme (Hussain *et al.*, 2003). C'est ainsi que l'on s'est intéressés aux aminophosphonates, composés biologiquement actifs et analogues structuraux des acides aminés naturels (Phillips *et al.*, 1990), et dont beaucoup de dérivés sont utilisés en tant qu'antibiotiques (Atherton *et al.*, 1986), herbicides (Maier, 1990), fongicides, régulateurs de croissance des plantes (Maier et Spoerri, 1991), agents anti-thrombotiques (Meyer et Barlett, 1998), peptidases et protéinases (Miller *et al.*, 1998), et inhibiteurs d'enzymes (Allen *et al.*, 1989), ils peuvent également supprimer la croissance de diverses tumeurs et virus (Oleksyszyn et Powers, 1991). En outre, certains amidophosphonates inhibent la résorption osseuse, retardent la progression des métastases osseuses et exercent des effets cytostatiques directs sur une variété de cellules tumorales humaines (Mizrahi *et al.*, 2001). La nature inerte de la liaison C-P en α -aminophosphonates qui possède une similarité aussi bien physique que structurelle avec celle de l'acide phosphonique, l'acide phosphinique et l'ester de phosphate confère à la molécule son activité biologique (Fields, 1999).

1.1. Sources cellulaires des EOR

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques oxydatives avec un transfert d'électrons. Au cours de leur métabolisme normale les cellules sont capables de générer des EOR en réponse à un stimuli spécifique. (Bonnefont *et al.*, 2003)

1.2. Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif est une perturbation de la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydants, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004). L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles et les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman 2004) (Fig. 32)

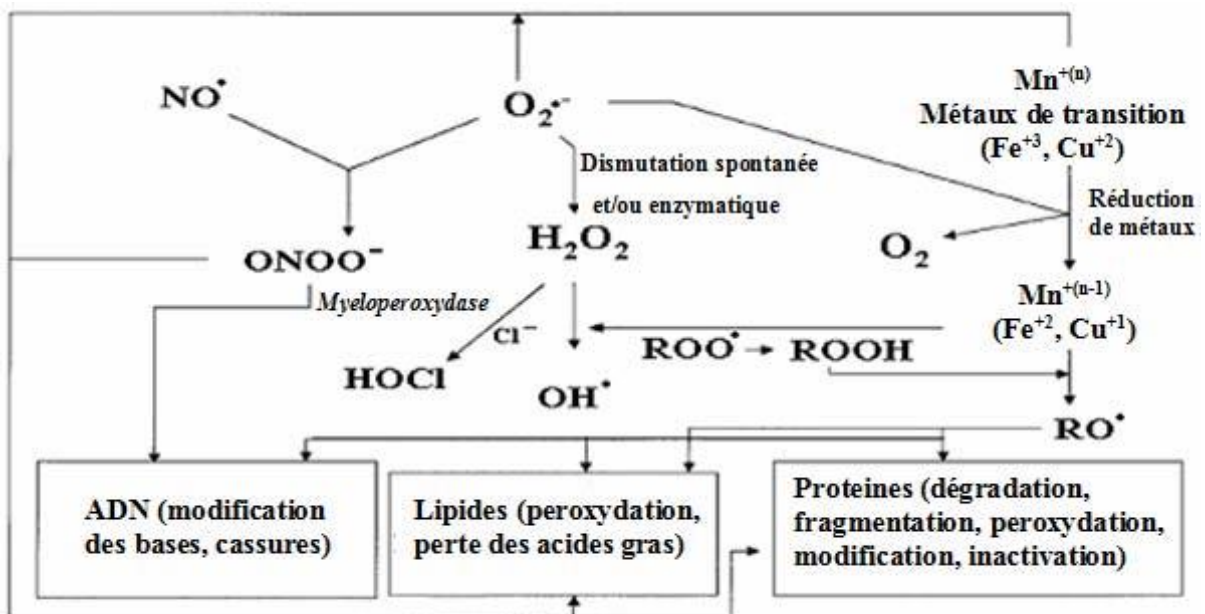


Figure 32. Cibles biologiques et dommages oxydatifs induits par les EOR (D'après Kohen et Nyska, 2002)

1.3. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants qui sont des substances capables, à des concentrations relativement faibles, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), le glutathion réduit (GST) (Fig. 33) et en systèmes non enzymatiques : le glutathion (GSH), l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, l'acide ascorbique, la vitamine E... (Goudable et Favier, 1997).

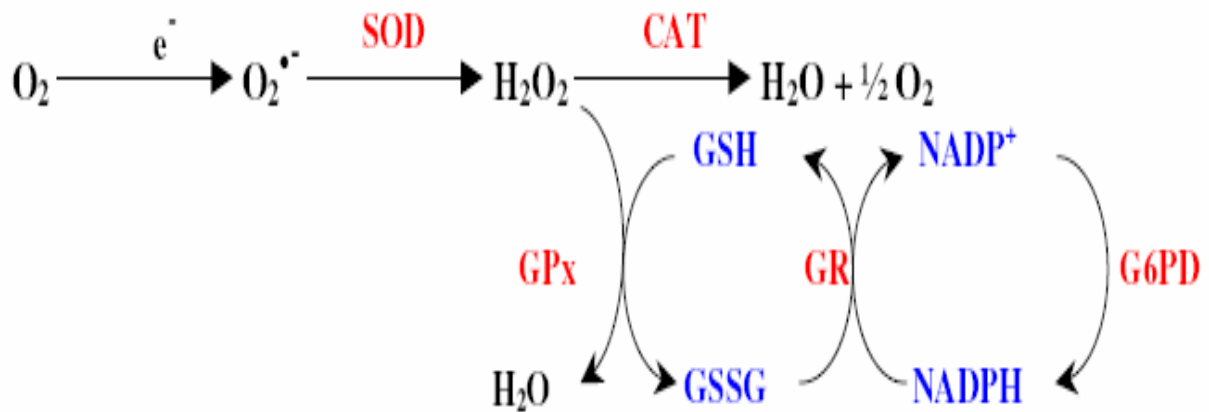


Figure 33. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses enzymatiques (D'après Pincemail *et al.*, 2002).

Objectif du travail

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* des amidophosphonates de synthèse afin d'évaluer leur capacité potentielle à neutraliser le radical libre du DPPH. En second lieu, nous entamerons des essais *in vivo* sur la paramécie dans le but de mettre en évidence le déclenchement d'un stress oxydant chez cette dernière et l'induction d'une activité antioxydante.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel biologique

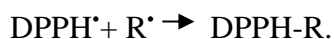
Le matériel biologique utilisé dans notre étude est le protiste cilié : *Paramecium tetraurelia* (décrit dans chapitre 3)

2.2. Matériel chimique

Notre matériel chimique correspond aux trois amidophosphonates précédemment décrit dans la partie matériel et méthodes du chapitre (3)

► DPPH (2,2diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH ((2,2diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violette intense. La méthode dite DPPH est utilisée pour la mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne). (Rolland, 2004). Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un hydrogène, le DPPH est réduit avec perte de la couleur violette (avec une couleur jaune pâle résiduelle du groupement picryl encore présent) (fig.34). L'absorbance du DPPH est mesurée entre 515 à 520 nm (Gazi *et al.* 2004). Le DPPH est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante sur une courte période de temps (Quancai *et al.*, 2013). Le DPPH peut accepter l'hydrogène pour devenir une molécule diamagnétique stable (Molyneux, 2004). la capacité de piégeage du radical DPPH est modulée par la capacité des antioxydants à donner de l'hydrogène (Bondet *et al.*, 1995; Brand-Williams *et al.*, 1995). La réduction du DPPH • comme indiqué ci-dessous est relative à la diminution de son absorbance au cours de la réaction. Dans sa forme radicalaire, le DPPH • est absorbé à 517 nm, mais lors de sa réduction par un antioxydant (AH), l'absorbance disparaît.





A: Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre) **B:** Diphenylpicrylhydrazine (non radicalair)

Figure 34. Structure du DPPH (Molyneux ,2004).

2.3. Méthodes

2.3.1. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*: effet piègeur du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents composés (AP1, AP2, AP3, chlorpyrifos éthyle), nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH et l'acide ascorbique comme contrôle positif (Antioxydant de référence) selon la méthode décrite par Blois (1958) modifiée par Mansouri *et al* (2005). Un volume de 50 μ L de chaque composé à tester est additionné à 950 μ l d'une solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml de méthanol). Les mélanges sont secoués vigoureusement et laissés dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de la solution DPPH est mesurée à 517nm et la diminution réelle de l'absorbance induite par les molécules testées est calculée selon la formule suivante: **pourcentage de piégeage du DPPH** = $[(A_{\text{cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{cont}}] \times 100$ où A_{cont} est l'absorbance de la réaction de contrôle et A_{test} est l'absorbance en présence du composé.

2.3.2. Etude de l'activité antioxydante *in vivo*

L'objectif de l'étude *in vivo* est d'évaluer les effets des amidophosphonates sur les défenses antioxydantes de la paramécie en l'absence et en présence du radical DPPH. 20ml de cultures de paramécie de densité 2.10^3 cell/mL sont traitées par les amidophosphonates aux concentrations préalablement définies. Les paramètres biochimiques auxquels nous nous sommes intéressés sont:

- La peroxydation lipidique (PL) : déterminée par la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) ; produit de la peroxydation des lipides membranaires. L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. (Fukuzawa *et al* 1993).
- L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de Regoli *et al*, (1995).
- La teneur en glutathion réduit (GSH) est évaluée comme décrit par Weckberker et Cory (1988).

Nous avons également évalué les effets relatifs aux capacités de piégeage du radical DPPH par les systèmes de défenses antioxydants de la paramécie en présence des trois xénobiotiques (AP1, AP2 et AP3). Cette évaluation est effectuée selon le même principe et la même méthode que celle du test DPPH dans l'étude *in vitro*. Une solution méthanolique du DPPH est ajoutée à chaque tube contenant des paramécies prétraitées avec les xénobiotiques et après 30 min d'incubation dans l'obscurité, suivie d'une centrifugation (15.000 rpm/min pendant 15 min), les mêmes paramètres biochimiques que ceux effectués précédemment sont mesurés. Un tube à essai avec uniquement des paramécies est utilisé comme témoin.

3. Analyse statistique

Toutes les expériences sont répétées trois fois et les résultats sont présentés en tant que valeur moyenne \pm déviation standard (SD). Les différences entre les groupes de contrôles et testés sont analysées en utilisant le *t*-test de Student (différence significative $P \leq 0,05$) (Dagnelie, 1999).

4. Résultats

4.1. Etude *in vitro*: Effet piègeur du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents composés étudiés est représentée sur la (Fig. 35). Les activités de piégeage du DPPH sont dans l'ordre suivant: AP1 (40%), AP2 (31%), ces effets sont significatifs ($P \leq 0,05$) en comparaison avec ceux de l'acide ascorbique (99, 78%). Parallèlement, l'activité antioxydante du chlorpyrifos éthyl est de l'ordre de 2% et celle de la molécule AP3 d'environ 19, 74% ($P \leq 0,01$).

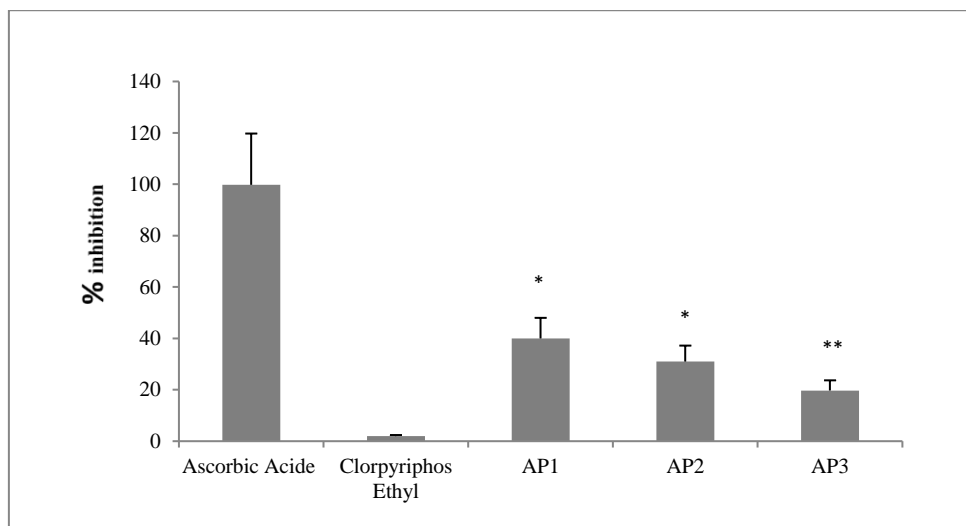


Figure 35. Evaluation *in vitro* de l'effet piègeur des amidophosphonates vis-à-vis du radical DPPH

6.1. Etude *in vivo*: Effets des différents amidophosphonates sur les défenses antioxydantes des paramécies

Les résultats concernant les effets des amidophosphonates sur les paramètres biochimiques des paramécies sont rassemblés dans le tableau (09).

Tableau 09. Effets des différents amidophosphonates sur les paramètres biochimiques des paramécies.

Paramètres	Témoin	Clorpyriphos éthyl	AP1	AP2	AP3
GSH	2.13 ± 0.16	1.60 ± 0,14*	2.04 ± 0.18	2.02 ± 0.18	1.41 ± 0.16*
PL	2.56 ± 0.22	3.18 ± 0.21*	2.59 ± 0.13	2.63 ± 0.19	3.11 ± 0,26*
CAT	3.36 ± 0.26	3.87 ± 0.17*	3.41 ± 0.21	3.48 ± 0.21	3.75 ± 0.19*

t-test * $P \leq 0.05$ n = 3; $\bar{x} \pm SE$. La teneur en GSH est exprimée en $\mu\text{molGSH} / \text{mg}$ de protéines. L'activité CAT est exprimée en $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de protéines / min. L'intensité de la PL est exprimée en μmol malondialdéhyde / mg de protéines.

Nous constatons qu'en présence du clorpyriphos éthyl et d'AP3, la teneur en GSH diminue de manière significative ($P \leq 0.05$), par rapport au témoin. Cette diminution est plus marquée pour le clorpyriphos éthyl avec ($1,60 \pm 0,14 \mu\text{mol GSH} / \text{mg}$). En revanche, en présence des composés AP1 ($2,04 \pm 0,18$) et AP2 ($2,02 \pm 0,18$) cette diminution n'est pas significative ($P \geq 0.05$). D'un autre côté, l'activité (CAT) et la peroxydation lipidique (PL) augmentent de manière significative ($P \leq 0.05$) sous l'effet du traitement par le clorpyriphos éthyl et AP3, cette augmentation n'est pas significative ($P \geq 0.05$) sous le traitement par AP1 et AP2 par rapport au témoin.

► **Cas de la combinaison avec le DPPH**

Les effets relatifs à la combinaison des différents composés testés avec le radical DPPH sont représentés dans le tableau (10).

Tableau 10. Effets combinés des différents amidophosphonates, le clorpyriphos éthyle avec le radical DPPH sur les paramètres biochimiques des paramécies.

Paramètres	Témoin+DPPH	Clorpyriphos éthyl + DPPH	AP1+ DPPH	AP2+ DPPH	AP3+ DPPH
GSH	1.94 ± 0.14	0.96 ± 0.23**	1.16 ± 0.11*	1.09 ± 0,16*	1.02 ± 0.21**
PL	2.85 ± 0.22	3.79 ± 0.21*	2.87 ± 0.18	2.86 ± 0,19	3.76 ± 0.11*
CAT	3.24 ± 0.26	3.88 ± 0.21*	3.66 ± 0.19	3.68 ± 0,23	3.74 ± 0.17*

t-test * $P \leq 0.05$, *t*-test ** $P \leq 0.01$, $n = 3$; $x \pm SE$. La teneur en GSH est exprimée en $\mu\text{molGSH} / \text{mg}$ de protéines. L'activité CAT est exprimée en $\mu\text{mol} / \text{mg}$ de protéines / min. L'intensité de la PL est exprimée en μmol malondialdéhyde / mg de protéines.

Nous remarquons qu'en présence des combinaisons (AP3 + DPPH) et (chlorpyriphos éthyl + DPPH), le taux en GSH, diminue de manière significative ($P \leq 0.01$). Cette diminution est également significative avec ($P \leq 0.05$) pour la combinaison (DPPH + AP1) et (AP2 + DPPH), par rapport au témoin ($1,94 \pm 0,14$ GSH $\mu\text{mol} / \text{mg}$).

Concernant le suivi de l'activité catalase, nous remarquons qu'en présence des combinaisons (clorpyriphos éthyl + DPPH) et (AP3 + DPPH), l'activité catalase augmente de manière significative ($P \leq 0.05$). Cependant, cette activité n'augmente que de manière non significative ($P \geq 0.05$) sous l'effet du traitement par le reste des composés combinés.

Une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de la peroxydation lipidique est enregistrée chez les traités par les combinaisons (Clorpyriphos éthylique + DPPH) et (AP3 + DPPH). Par

**CHAPITRE 6- **EVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES
AMIDOPHOSPHONATES****

contre, cette augmentation n'est pas significative ($P \geq 0.05$) pour le traitement avec (AP1 + DPPH) et (AP2 + DPPH) par rapport aux témoins ($2,85 \pm 0,22$).

7. Discussion

Notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'acide ascorbique comme témoin positif pour avoir une baisse maximale dans l'absorbance du DPPH, car la réaction entre les deux est très rapide. Le pouvoir antioxydant trouvé par Lamaison *et al.* (1988-1990) pour l'acide ascorbique est quatre fois supérieur à celui trouvé dans notre étude, et correspond à deux molécules de DPPH • réduites par une molécule d'antioxydant.

Concernant le profil antioxydant *in vitro* des trois amidophosphonates de synthèse, nous avons mis en évidence un faible pouvoir antiradicalaire des amidophosphonates testés probablement en raison de leur faible capacité à donner de l'hydrogène à l'instar du clorpyriphos éthyl qui semble avoir la plus faible capacité. Ces résultats sont en accord avec ceux de Quancai *et al.* (2013), qui ont étudié l'activité antioxydante *in vitro* de trois dérivés de l'acide polymannuronique (PM) chimiquement substitués par du phosphate. En effet, les phosphonates sont dotés d'une activité biologique large, comme le phosphate polysaccharide qui a une activité immunologique (Nagasawa *et al* 2010; Lyuksutova *et al* 2005; Otani *et al.*, 2007) et anti-tumorale (Chan *et al.*, 2011), les polysaccharides polyanioniques et les phosphate de fucoidan qui eux possèdent une activité antioxydante avec une forte capacité à piéger le radical hydroxyle (Wang *et al.*, 2009).

De plus, des tests effectués sur les biphosphonates, ont montré qu'ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Dunn *et al* 1993; Van Offel *et al*, 2001). Ils sont également utilisés dans le traitement d'une variété de troubles du métabolisme des os et du calcium comme l'ostéoporose, la maladie de Paget, l'hypercalcémie et les maladies osseuses métastatiques (Plotkin *et al.*, 1999). Devineni *et al.* (2013) ont démontré lors d'une étude réalisée sur des α -diamino-phosphonates de synthèse, dérivés du dapsonne, que ces composés ont une forte activité contre le radical DPPH. Il en est ce même concernant les travaux de Reddy *et al.* (2013) qui ont mis en évidence une activité antiradicalaire maximale des aminophosphonates synthétisés par le mode réactionnel amine-aldehyde-diethyl phosphite avec une CI_{50} de 49.35 g/mL.

La deuxième étape de cette étude est l'évaluation *in vivo* des effets des différents amidophosphonates sur la capacité antioxydante des paramécies. Dans cette étape, les effets *in vivo* sont évalués sur le système antioxydant à savoir l'activité CAT et la teneur en GSH et le cas échéant l'intensité de la peroxydation lipidique (PL). En second lieu nous avons effectué une combinaison avec le radical DPPH dans le but d'exacerber à la fois l'activité antiradicalaire des composés étudiés et la capacité antioxydante des paramécies. Nous savons qu'un antioxydant est défini comme étant une substance capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et de prévenir ou retarder leur l'oxydation (Berger, 2006). C'est le cas du glutathion qui est le principal antioxydant cellulaire capable de se lier spontanément aux métabolites toxiques par le pôle (SH). Cependant, une déplétion en glutathion conduit à une augmentation des entités toxiques disponibles avec pour conséquence potentielle une peroxydation lipidique et une oxydation des groupements thiols des protéines (Settaf *et al.*, 2000; Bridger *et al.* 1998). Ainsi, l'étude *in vivo* que nous avons menée, met en évidence une déplétion en GSH probablement dûe à l'augmentation de la production d'agents oxydants sous l'effet du traitement par les différents amidophosphonates testés. Parallèlement, l'augmentation de l'activité catalase confirme l'installation d'un stress oxydant. La catalase est une enzyme essentielle dans la détoxification et joue un rôle principal dans les mécanismes antioxydants cellulaires. Elle catalyse la conversion de H₂O₂ en H₂O et O₂ et toute variation de son activité rend compte des dommages cellulaires suite à un stress abiotique (Chun *et al.*, 2011). Ce déséquilibre de la balance oxydant/ antioxydant est ainsi confirmé dans notre travail par l'augmentation du taux de MDA due à la peroxydation lipidique.

Le malondialdéhyde (MDA) a une bonne corrélation avec la génération de ROS, il est considéré comme un indicateur important du niveau de stress oxydatif (Valavanidis *et al.*; 2006; Box *et al.*, 2007) et permet d'évaluer le niveau oxydant à travers la peroxydation des lipides membranaires. (Li *et al.*; 2008 Xue *et al.*, 2009). Le traitement combiné avec le DPPH a diminué la teneur en GSH avec une activité CAT stable il en est de même pour le taux de MDA, ce qui suggère un faible pouvoir antioxydant des amidophosphonates testés. Cette stabilité peut être due à la diminution de la disponibilité des agents pro-oxydants, tels que Fe²⁺ /Fe³⁺, conduisant à la diminution de la production de radicaux libres par le biais de la réaction de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + ·OH + OH⁻) probablement en raison de l'effet chélateur des amidophosphonates

**CHAPITRE 6- **EVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES
AMIDOPHOSPHONATES****

de petites quantités de fer présentes dans les cellules comme le suggèrent Dombrecht *et al.* (2004) qui montrent que les biphosphonates et le pyrophosphate ont une capacité à chélater le fer; ainsi que les travaux de Dombrecht *et al* (2006), qui ont étudié l'activité antioxydante des biphosphonates de la simvastatine sur la peroxydation lipidique des chondrocytes.

6. Conclusion

L'activité antioxydante des trois amidophosphonates de synthèse est évaluée *in vitro* et *in vivo*. Les résultats des tests *in vitro* montrent une faible activité antiradicalaire de ces trois xénobiotiques et l'étude *in vivo* a mis en évidence un faible pouvoir antioxydant chez les paramécies avec un taux de GSH faible, une activité catalase et un taux de MDA équivalents à ceux des traités avec ou sans combinaison avec le DPPH.

CHAPITRE 7



IMPACT DE LA TOXICITE DES AMIDOPHOSPHONATES : APPROCHE GENETIQUE

1. Introduction

Les composés génotoxiques peuvent altérer l'intégrité de la structure de l'ADN, causant des mutations (Shugart et Theodorakis, 1998). Un agent mutagène est une substance qui provoque des mutations au niveau du matériel génétique. Les mutations sont transmissibles à la descendance via la division cellulaire. Bickham et Smolen (1994) suggèrent que les mutations peuvent réduire la viabilité, affecter la survie et les capacités de reproduction des espèces pouvant mener éventuellement à l'extinction de certaines espèces. Cependant, le caractère défavorable des mutations héréditaires est discutable. En effet, l'évolution des êtres vivants n'est possible que par la sélection d'individus porteurs de mutations favorables leur permettant de s'adapter à des conditions d'environnements stressantes (Vasseur *et al.*, 2008).

La technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) fut décrite pour la première fois par Williams *et al.* (1990). La RAPD a le potentiel de détecter une large variété de dommages à l'ADN et de mutations sur le génome entier. Ce test est basé sur l'amplification aléatoire de fragment d'ADN, avec une seule amorce de séquence nucléotidique arbitraire de 10 paires de bases (*pb*). Ces auteurs indiquent que cette technique semi-quantitative peut être utilisée pour construire des cartes génétiques chez de nombreuses espèces. Ainsi la RAPD est réalisée au départ pour détecter le polymorphisme intra-populationnel.

Diverses études se sont penchées sur les altérations biologiques aux niveaux moléculaire et individuel induites par les xénobiotiques chez *paramecium tetraurelia*. Cependant, peu de données sont disponibles à propos de la génotoxicité induite par des amidophosphonates. En raison de la variété de composés génotoxiques présents dans l'environnement, les dommages induits au niveau de l'ADN sont multiples. Ainsi, on distingue par exemple des lésions primaires, correspondant à des modifications de bases ou à des cassures simples ou double brin de l'ADN (Fig. 36) (Cachot et Dégremont, 2009). Ces altérations correspondent au premier stade d'altération suite à l'action d'un agent génotoxique.

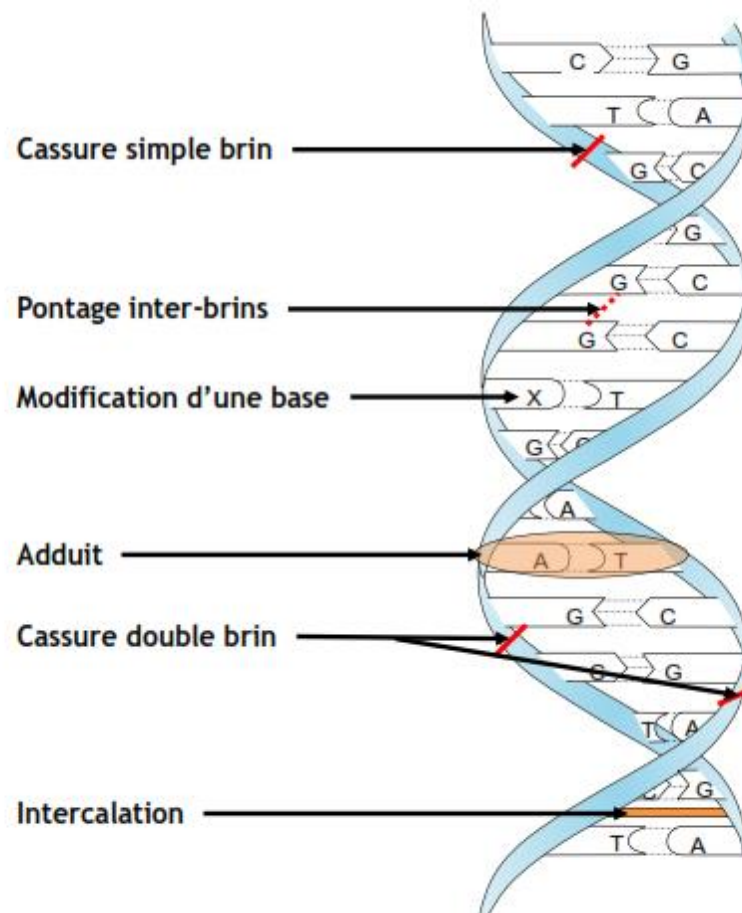


Figure 36. Les différents types de lésions primaires de l'ADN (Cachot et Dégremont, 2009)

Les adduits correspondent à la formation de liaisons covalentes entre un polluant ou ses métabolites et l'ADN (Fig.36), entraînent une modification de la structure spatiale de l'ADN à leur voisinage. La reconnaissance de la molécule d'ADN par l'ADN polymérase est perturbée au cours du processus de réplication. Ce type de lésions de l'ADN induit la mutagenèse et le développement tumoral (Cachot et Dégremont, 2009). Des études démontrent la rapidité de la formation des adduits (24 à 48h) (Vasseur *et al.*, 2008).

Les altérations de bases, par pertes, insertions ou modifications d'une ou plusieurs bases de l'ADN peuvent se produire en présence d'un polluant génotoxique. Ce type de dommage peut provoquer des mutations en générant des appariements incorrects de bases. Certaines

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

modifications de bases entraînent la formation de sites abasiques, c'est-à-dire la déstabilisation de la liaison N-glycosidique et l'élimination de la base (Adam *et al.*, 2006; Cachot et Dégremont, 2009). Ce type de modifications de la structure primaire de l'ADN peut faire l'objet d'une réparation qui peut parfois comporter des erreurs. Dans ce deuxième cas, il y a apparition de mutations (Orsière *et al.*, 2005).

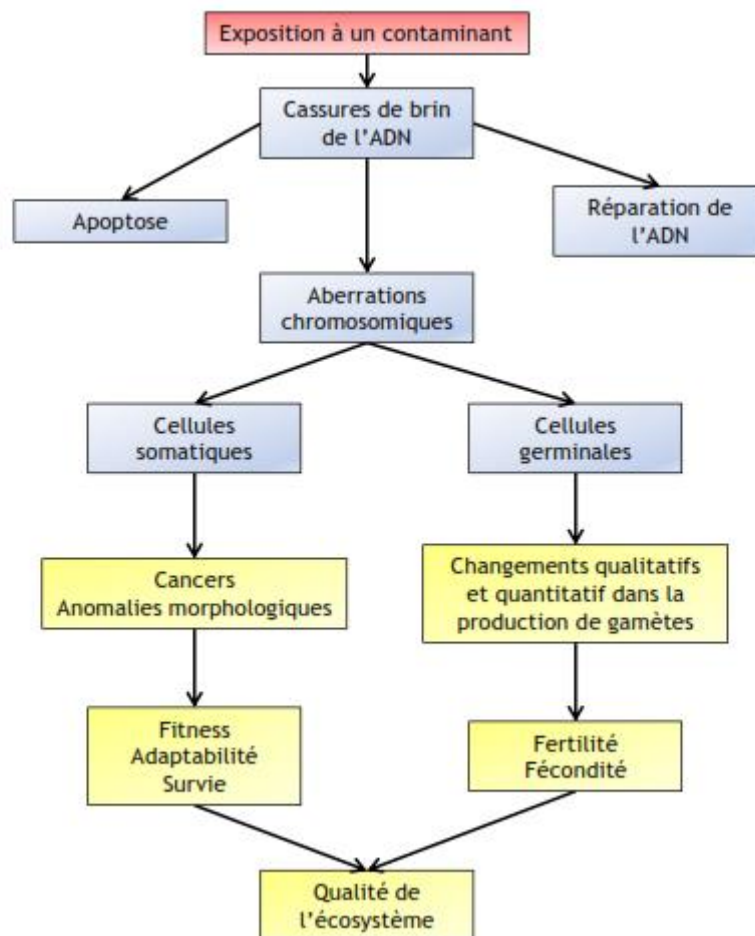


Figure 37. Conséquences des cassures de brin de l'ADN (Jha, 2008)

Les cassures de la chaîne d'ADN, résultent d'une rupture de liaisons phosphate-sucre et entraînent des cassures simples ou doubles brin. Les cassures doubles brin sont définies comme deux cassures ou plus, présentes sur des brins opposés. Ce type de cassure est considéré comme

étant difficilement réparable (Adam *et al.*, 2006). C'est pourquoi, ces altérations de l'ADN font partie des lésions les plus importantes au niveau moléculaire et sont à l'origine de dommages induisant des aberrations chromosomiques si elles sont mal ou non réparées (Fig.37) (Jha, 2008).

1.1. Les voies de réparation de l'ADN

Les organismes peuvent percevoir les composés génotoxiques et essayer d'éliminer les agents toxiques ou réparer les modifications de l'ADN (Shugart et Theodorakis, 1998). L'apparition de lésions à l'ADN est suivie de l'activation des systèmes de réparation capables de restaurer rapidement un ADN intact. Il est indispensable que ce mécanisme de réparation ait lieu avant que la réplication ne fixe les mutations (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). En effet, lorsque les lésions primaires ne sont pas ou mal réparées, elles sont fixées définitivement sous forme de mutations dans le génome de la cellule et seront ensuite transmises aux cellules filles lors de la division cellulaire (Cachot et Dégremont, 2009).

En raison de l'existence de mécanismes de réparation, la majorité des lésions citées dans le paragraphe précédent peuvent être réparées. Deux types de réparations peuvent être mis en jeu : les mécanismes conservatifs (processus excision-resynthèse garantissant une réparation fidèle) et les systèmes fautifs (interviennent quand le premier mécanisme est dépassé par un trop grand nombre de lésions de l'ADN) (Cachot et Dégremont, 2009). Il faut une certaine quantité de dommages avant que ces voies s'activent ; pour des niveaux de dommages plus faibles mais néanmoins au-delà du bruit de fond moyen, ces voies ne s'activent pas et les dommages apparaissent. Lors d'une étude sur les effets d'effluents métallurgiques chez *Daphnia magna*, il a été démontré que les individus présents dans les stations les moins contaminées présentaient un ADN fortement altéré contrairement aux organismes des stations les plus polluées. Les auteurs suggèrent l'intensité des altérations n'était pas suffisamment élevée dans ces stations pour que des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place (De Coen *et al.*, 2006).

1.2. Le génome de la paramécie

Des généticiens du CNRS et du Génomoscope – Centre National de Séquençage, ont réalisé le décryptage du génome somatique de la paramécie et ont découvert que cet organisme possède 40 000 gènes (Aury, 2006) nettement plus que l'homme qui en a tout au plus 25 000 ! Le séquençage des génomes de plantes et d'animaux a déjà montré une absence de corrélation entre la complexité des organismes pluricellulaires et le nombre de gènes qu'ils possèdent. Ce paradoxe s'étend donc désormais à l'ensemble des eucaryotes, y compris unicellulaires. Ils ont ensuite démontré que ce patrimoine est le résultat d'au moins trois duplications successives de tout le génome. La duplication du génome chez la paramécie, est à l'origine des gènes paralogues formant des familles multigéniques (Aury, 2006).

Objectif du travail : Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes tracés pour objectif l'évaluation du pouvoir génotoxique éventuel des trois amidophosphonates de synthèse. Pour cela, nous avons effectué l'analyse de l'intégrité de l'ADN génomique des paramécies contaminés par rapport aux témoins. Ces analyses sont menées grâce à la technique RAPD après exposition des paramécies à des doses létales et des $DL_{50}/10$ pendant 48 et 72h, en présence de 3 oligonucléotides.

2. Matériel et Méthodes

L'utilisation et la préparation du matériel chimique ainsi que les conditions de culture des paramécies et leurs densité sont décrites dans le chapitre (3) (partie matériel et méthodes).

2.1. Conditions d'expositions

Pour quantifier les dommages de l'ADN, nous avons utilisé les concentrations suivantes : 0.3 et 30 μM pour AP1, 2.5 et 25 μM pour AP2, 1.5 et 15 μM pour AP3, 1 et 10 μM pour le chlorpyrifos ethyl pendant 48 et 72 heures d'exposition. Les tests contrôles consistent en l'utilisation des cellules témoins et témoins acétone à 0.61 mM. A la fin de chaque traitement, les paramécies sont centrifugées à 13.000 rpm min^{-1} pendant 20 min à 5°C.

2.2. Préparation de l'ADN génomique de *Paramecium tetraurelia*

L'ADN des Paramécies est extrait en utilisant une méthode de relargage (Miller *et al.*, 1988). Cinq réplicats par échantillons sont préparés pour chaque condition après 48 et 72 h d'exposition. Les cellules sont centrifugées à 13.000 rpm pendant 20 min à 5 ° C. Les culots sont homogénéisés dans 300 uL de tampon de lyse (10 mM Tris-HCL, 400 mM de NaCl, 2 mM Na₂EDTA, pH 8,2, 10% de SDS, 225 mg / mL de pronase K - Agilent) et incubées à 60 ° C pendant 1 h. 100 uL de NaCl saturé (6 M ajoutée. La phase aqueuse contenant l'ADN est recueillie après centrifugation (15 min, 14 000 rpm, 20 ° C). L'ADN est précipité par deux volumes d'éthanol absolu, puis centrifugé (15 min, 14 000 rpm, 5 ° C). L'ADN précipité est dissous dans 100 uL de tampon TE (pH 7,8) et stocké à -20 ° C pour effectuer l'analyse RAPD.

2.3. Sélection des amorces

Une analyse RAPD préliminaire est réalisée sur 2 échantillons d'ADN génomique extraits des paramécies. Cette analyse a pour objectif de tester 2 dilutions (10 et 20) et de sélectionner 2 oligonucléotides de 10 paires de base parmi 10 testés : OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPB1 (5'-GTTT-CGCTCC-3'), OPB5 (5'-TGCGCCCTTC-3'), OPB6 (5'-TGTCTGCCC-3'), OPB7 (5'-GGTGACGCAG-3'), OPB8 (5'-GTCCACACGG-3'), OPB10 (5'-CTGCTGGGAC-3'), OPB11 (5'-GTAGACCCGT-3'), OPB12 (5'-CCTTGACGCA-3'), et OPB14 (5'-TCCGCTCTGG-3'). Ces amorces sont obtenues auprès de Sigma-Proligo (www.proligo.com).

2.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD)

Les RAPD-PCR en temps réel sont réalisées avec un Lightcycler (Roche, France) à l'aide du kit de réactifs « Lightcycler FastStart DNA Master SYBR Green I » (Roche référence 12239264). Cette méthode consiste à amplifier une partie de l'ADN grâce à une amorce aléatoire. Les échantillons sont préparés dans des capillaires en verre contenant **20** µL du mix constitué de :

- **16** µL d'un mélange réactionnel : 1 µL de solution contenant de la Taq polymérase, du dNTPs et le colorant fluorescent SYBR Green, 3,2 µL de MgCl₂ à 25 mM et 11,8 µL d'eau ultrapure)
- **2** µL d'amorce (600 nM)
- **2** µL d'ADN (16 ng)

La Taq polymérase, extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*, a la propriété de résister aux très hautes températures utilisées lors de la PCR et de rester active pendant la réaction. Cette enzyme a besoin de MgCl₂ pour fonctionner et réaliser la réaction de polymérisation en chaîne.

Les capillaires (Roche, référence 11909339) sont placés sur un carrousel afin de mélanger les réactifs, puis dans le thermocycleur pour l'amplification de l'ADN dont les différents cycles thermiques sont :

- une dénaturation à 95°C pendant 10 minutes permettant la séparation et l'obtention de deux simple brins d'ADN.
- l'amplification impliquant 50 cycles de 40 secondes composés chacun de 3 phases différentes : la dénaturation (5 secondes à 95°C), l'hybridation des amorces (5 secondes à 50°C) et l'élongation (30 secondes à 72°C) pendant laquelle le brin d'ADN complémentaire est synthétisé par la Taq polymérase (Fig.38).
- l'obtention des courbes de dissociations, en suivant la baisse de fluorescence du colorant SYBER Green sur un gradient de température de 65 à 95°C (sur 600 secondes).
- une phase de refroidissement amenant la température à 40°C.

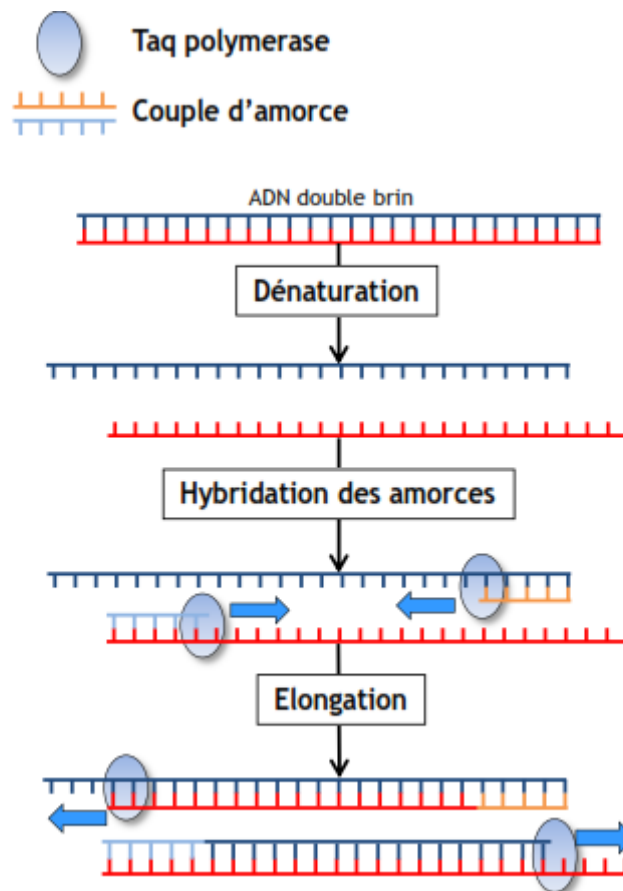


Figure 38. Amplification de l'ADN par la méthode de polymérisation de réaction en chaîne (PCR)

2.5. Analyse des produits PCR

La quantité et la composition des produits de PCR dépend à la fois du nombre de sites d'hybridation et de leur position sur l'ADN amplifié. Les dommages à l'ADN (résultant soit de pertes ou de créations de sites d'hybridation) sont quantifiés à l'aide des courbes de dissociations et des variations du nombre de sites d'hybridation.

Les courbes de dissociations de l'ADN (Fig.39) permettent d'obtenir une distribution des températures de fusion (T_m) dont chacune caractérise un produit de PCR, c'est-à-dire un fragment particulier d'ADN amplifié (ou amplicon).

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

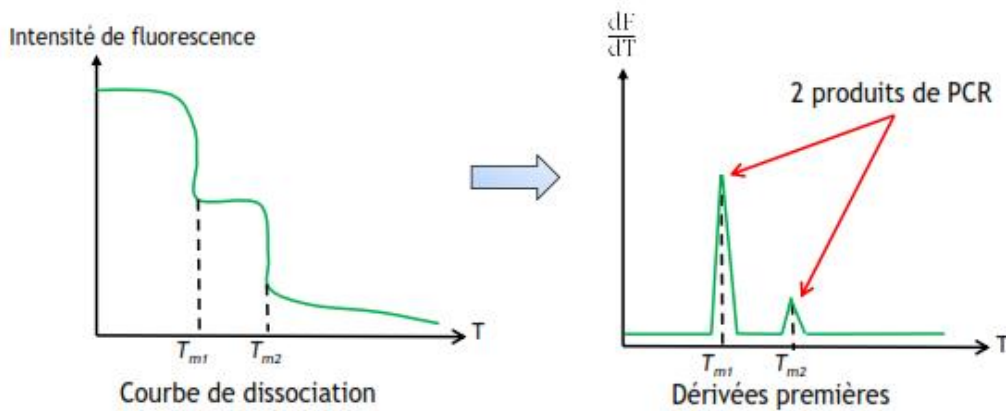


Figure 39. Courbe de dissociation théorique de l'ADN

Les courbes de température de fusion sont analysées par le logiciel LightCycler Software 3.5 (Roche). La distribution des T_m , obtenue pour chaque échantillon d'ADN et amorce RAPD testée à l'aide des dérivées premières des courbes de dénaturation, est classée par intervalle de température (12 intervalles allant de 71 à 92°C). Les fréquences d'apparition de pics de température pour chaque intervalle sont calculées et comparées entre individus témoins et exposés pour chaque point d'échantillonnage. Une différence significative indique une modification de la composition nucléotidique de l'ADN, impliquant la perte ou la création d'un site d'hybridation pour une amorce donnée.

Le cycle seuil (C_t) est défini comme le nombre moyen de cycles thermiques nécessaires pour entrer en phase exponentielle d'amplification de l'ADN au cours de chaque analyse et sa valeur diminue avec l'augmentation du nombre de sites d'hybridation. La valeur de C_t est calculée à l'aide de la courbe d'amplification de l'ADN, obtenue en suivant l'augmentation de la fluorescence du SYBR Green, proportionnelle à la quantité d'ADN présent, mesurée au terme de chaque phase d'élongation (Fig.40).

CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR

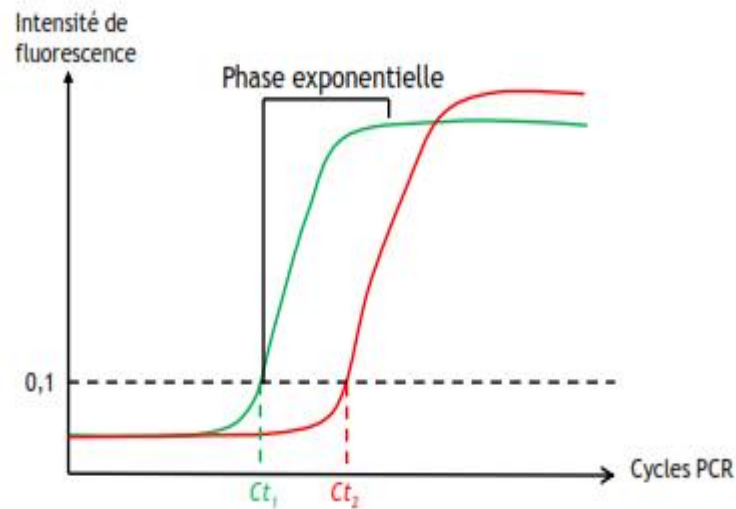


Figure 40. Courbe de dissociation théorique de l'ADN

Dans notre étude, Nous avons rejeté les amorces présentant une hybridation fréquente sur le génome de *P.tetraurelia*, car il est presque impossible de voir des modifications de bases (résultant de la perte ou la création de sites d'hybridation). Avec une telle règle générale, nous avons finalement choisi deux amorces pour la RAPD qui sont les décimères oligonucléotidiques non spécifiques OPA9 et OPB10.

Pour quantifier le nombre de sites d'hybridation par unité de génome avec une amorce par RAPD, des PCR de référence sont également effectuées pour chaque ADN génomique en utilisant 300 nM de chacune de 2 amorces oligonucléotidiques complémentaires de 246 pb dans le gène de l'*actine-1* de *P. tetraurelia* (*act1-1*), correspondant aux nucléotides 1018 et 1263 de la séquence codante (numéro d'accès GenBank: AJ537442). Se sont: L'amorce amont 5'-AAGTCGCAGGTATCCACG-3' et l'amorce aval 5'-CCACCGATCCAGACTGAG-3'.

Les courbes de dissociation sont obtenues en suivant le niveau de la fluorescence du SybrGreen pendant le chauffage progressive des produits PCR de 60 à 95 ° C. Nous avons vérifié qu'un seul produit de PCR est amplifié dans la réaction contenant les amorces spécifiques *act1-1* ($T_m = 88.1^\circ\text{C}$). Ceci permet une normalisation de la quantité d'ADN présente dans chaque réaction de PCR, pour un cycle seuil obtenu avec les amorces *act1-1*. Les Ct (*act1-1*), indiquent juste 4 événements d'hybridation par unité génomique (deux amorces sur chacun des

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

deux locus du gène *act1-1*). En effet, lorsque $\Delta = Ct(act1-1) - Ct(OPA9 \text{ ou } OPB10) = 0$, l'amorce RAPD permet la même quantité amplifiés des pb de PCR, et donc le même nombre de sites d'hybridation (SH) par unité génomique que les amorces *act1-1*, faisant 4 SH ou 2^{0+2} ; quand $\Delta = 1$, l'amorce RAPD présente par unité génomique deux fois plus de SH que les amorces *act1-1*, faisant 8 SH ou $2^3 = 2^{1+2}$; quand $\Delta = 3$, l'amorce RAPD présente par unité génomique 8 fois plus de SH que les amorces *act1-1*, faisant 16 SH ou $2^4 = 2^{3+1} = 2^{\Delta+2}$, quand $\Delta = n$, l'amorce RAPD présente par unité génomique n fois plus de SH que les amorces *act1-1*, faisant 2^{n+2} .

Par conséquent, le nombre de sites d'hybridation par unité génomique d'une amorce RAPD, est égal à $2^{(Ct(act1-1) - Ct(OPA9) + 2)}$, ou $2^{\Delta+2}$ là où les $Ct(OPA9)$ est la valeur du cycle seuil d'un seule RAPD-PCR réalisée avec l'amorce OPA9. Nous avons fait la même chose pour calculer le nombre de sites d'hybridation pour OPB10, en changeant les $Ct(OPA9)$ par les $Ct(OPB10)$ dans la formule.

3. Analyse statistique

L'analyse statistique relative aux nombres de sites d'hybridations, est réalisée en utilisant le test non paramétrique *U* Mann-Whitney ($P < 0.05$; Sigma stat 3.5). La comparaison statistique des proportions est effectuée en utilisant un test binomial ($n = 5$).

4. Résultats

Effets des amidophosphonates sur la stabilité génomique de *Paramecium tetraurelia*

Après 48 h d'exposition, AP1 et AP3 provoquent une diminution significative du nombre de sites d'hybridation (SH) de l'amorce OPB10 ($P < 0.05$) (tableau 11). Le nombre de SH est 50- et 25 fois plus faible que celui des cellules témoin-acétone après une exposition à des concentrations relatives à la DL₅₀ et DL₅₀ /10 pour AP1. Après traitement par AP3 le nombre de SH est de 28- et 50 fois plus faible que celui des cellules témoin-acétone, pour des concentrations relatives à la DL₅₀ et DL₅₀ / 10.

Tableau11. Nombre de sites d'hybridation par unité de génome, après RAPD-PCR réalisée sur l' DNA génomique de *Paramecium tetraurelia* témoin et traitées avec les amidophosphonates

Traitement	48 h de traitement		72 h de traitement	
	OPA9	OPB10	OPA9	OPB10
Témoin	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	$0,23 \pm 0,05$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	$(1,4 \pm 0,25) \times 10^{-2}$
Témoin acétone	$(1,8 \pm 0,8) \times 10^{-2}$	$0,5 \pm 0,2$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	$(1,7 \pm 0,24) \times 10^{-2}$
AP1 DL50	$(2,3 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$0,01 \pm 0,003^*$	$(0,06 \pm 0,002) \times 10^{-2*}$	$(0,066 \pm 0,04) \times 10^{-2*}$
AP1 DL50/10	$(2,2 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$0,02 \pm 0,005^*$	$(0,05 \pm 0,015) \times 10^{-2*}$	$(0,09 \pm 0,02) \times 10^{-2*}$
AP2 DL50	$(2,2 \pm 1,0) \times 10^{-2}$	$0,31 \pm 0,10^2$	$(0,9 \pm 0,08) \times 10^{-2}$	$(1,16 \pm 0,4) \times 10^{-2}$
AP2 DL50/10	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^{-2}$	$0,21 \pm 0,09$	$(0,3 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$(0,5 \pm 0,08) \times 10^{-2}$
AP3 DL50	$(2,6 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	$0,018 \pm 0,003^*$	$(0,3 \pm 0,06) \times 10^{-2*}$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-2}$
AP3 DL50/10	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	$0,01 \pm 0,004^*$	$(0,04 \pm 0,009)^* \times 10^{-2}$	$(0,08 \pm 0,02) \times 10^{-2*}$
Chlorpyriphos éthyl DL50	$(32 \pm 9) \times 10^{-2}^*$	$0,48 \pm 0,13$	$(34 \pm 11) \times 10^{-2}^*$	$(31 \pm 6,1) \times 10^{-2}^*$
Chlorpyriphos éthyl DL50/10	$(3,3 \pm 1,4) \times 10^{-2}$	$0,56 \pm 0,2$	$(31 \pm 19) \times 10^{-2}^*$	$(2 \pm 0,5) \times 10^{-2}$

Moyenne \pm SEM ($n = 5$)

Les valeurs obtenus ont été comparées à celles des témoins à l'aide du test U de Mann-Whitney. $P < 0.05$.

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

Le nombre de sites d'hybridations augmente 17 fois, lors de l'utilisation de l'amorce OPA9 après 48 heures de traitement par la DL₅₀ du chlorpyrifos éthyle ($P < 0.05$). Après 72 h d'exposition, tous les composés testés provoquent une modification de l'ADN. Comme nous le remarquons, après 48 h de traitement, les amidophosphonates entraînent une diminution du nombre de SH pour les deux amorces, tandis que le chlorpyrifos éthyle provoque l'augmentation de ce nombre pour les deux amorces. En comparaison avec les cellules témoin-acétone, la diminution est significative ($P < 0.05$) et 26- et 32 fois pour OPA9, et de 24- et 18 fois pour OPB10, après une exposition respective à la DL₅₀ et DL₅₀/10 de AP1. AP2 provoque une diminution ($P < 0.05$) de 3.4 fois le nombre de SH de l'amorce OPB10 sous l'effet de la DL₅₀/10, alors que AP3 induit une diminution ($P < 0.05$) de 5.3- et 40 fois le nombre de SH de l'amorce OPA9 sous l'effet de la DL₅₀ et DL₅₀/10. Contrairement au chlorpyrifos éthyle qui provoque une augmentation ($P < 0.05$) de 21- et 19 fois le nombre de SH de l'amorce OPA9 sous l'effet de la DL₅₀ et DL₅₀/10.

5. Discussion et conclusion

L'objectif majeur de cette étude est de tester la présence de dommages à l'ADN sous induits par les amidophosphonates et le nombre de réparations éventuelles.

Les analyses RAPD ont mis en évidence la création et l'inhibition des sites d'hybridations traduisant ainsi l'endommagement de l'ADN chez les paramécies traitées par les trois xénobiotiques testés.

L'utilisation de la technique RAPD a permis de détecter, par exemple, le polymorphisme génétique au sein de différentes variétés de Lotus et également entre des souches de *Renibacterium salmoninarum* provenant de diverses localisations géographiques (Campos *et al.*, 1994, Grayson *et al.*, 1999). Cette technique a également permis de différencier les souches de *R. salmoninarum* provenant de différents hôtes alors que des techniques plus conventionnelles ont échoué. L'utilisation de la RAPD s'est également montrée efficace et conforme aux données décrites dans la littérature dans la discrimination de différents groupes phylogénétiques de la bactérie *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme (Welsh *et al.*, 1992). Cette technique a également été utilisée dans le domaine de la carcinogénèse. Les tumeurs des os, des poumons et du cerveau ont été analysés par RAPD, et dans ces trois cas des dommages à l'ADN furent décelés dans les profils d'amplification obtenus (Singh *et al.*, 2001).

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

Cette capacité de déceler des modifications au niveau de l'ADN génomique de tumeurs en comparaison avec des tissus sains font de cette technique un outil adéquat pour l'étude d'impacts génotoxiques (adduits à l'ADN, cassures de l'ADN et mutations) de xénobiotiques sur divers organismes (Savva *et al.*, 1996). Diverses études ont été menées dans la détection d'effets génotoxiques par l'utilisation de la RAPD. Ces études ont balayé un très large éventail de polluants incluant des polluants organiques tels que le benzo(a)pyrène (Atienzar *et al.*, 2004), la mitomycine C (Becerril *et al.*, 1999), le 4-n-nonylphénol et le b-œstradiol (Atienzar *et al.*, 2002), des polluants métalliques (plomb, manganèse, cadmium, cuivre) (Liu *et al.*, 2005) et enfin des stress physiques comme les UV, les rayons X et des radionucléides (Atienzar *et al.*, 2006). A la suite de ces diverses analyses, des effets génotoxiques ont été détectés indiquant des effets directs ou indirects de ces composés sur l'ADN génomique. Cette technique s'avère donc efficace dans la détection d'effets génotoxiques des xénobiotiques sur des organismes de tous types en allant de la paramécie jusqu'à l'orge en passant par des larves de balanes.

L'étude des profils RAPD est un outil puissant pour tester qualitativement la présence d'altérations de l'ADN chez des organismes témoins et exposés. Nos résultats soulignent le fait que la méthode requiert la combinaison de l'analyse des cycles seuils (C_t) et des courbes de températures (T_m). En effet, dans certains cas, l'absence d'effet sur le nombre de sites d'hybridations ne signifie pas qu'il n'y a pas d'effet du polluant sur l'ADN. Ce type d'observation suggère une compensation par création et perte de sites d'hybridation. Dans notre étude, lors de l'exposition à AP2 aux deux concentrations utilisées, il y a eu une absence des C_t pour les deux amorces pendant 48 et 72 heures du traitement, ce qui est contredit par l'observation de changements de la composition des produits de PCR suggérés par les courbes de température de fusion. Cette compensation est également observée dans d'autres études. Lors d'une exposition de poissons zèbre à plusieurs métaux, les altérations de l'ADN au jour 7 de la contamination sont masquées alors qu'elles apparaissent aux jours 3 et 14. L'étude des températures de fusion indique une différence significative de la fréquence d'apparition des produits PCR entre les poissons exposés et témoins au jour 7. Les auteurs soulignent ainsi l'importance d'étudier les courbes de fusion en complément de la quantification des sites d'hybridations (Orieux *et al.* 2011). Cependant, les travaux de Theodorakis *et al.* (1997) mettent en évidence une relation entre les dommages à l'ADN (cassures) et les paramètres de reproductions (fécondité et anomalies embryogéniques) chez *Gambusia affinis*, naturellement exposés à des radionucléides (^{137}Cs , ^{90}Sr ,...) et à des contaminants chimiques. L'exposition

**CHAPITRE 7- APPROCHE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA
CONTAMINATION AMIDOPHOSPHONATES PAR LA TECHNIQUE RAPD-PCR**

des daphnies aux stades néonates (<24h) et adultes (7 jours) à un mélange de deux polluants, le dichromate de sodium et le benzo(a)pyrene, a mis en évidence une plus forte capacité des adultes à induire des gènes de transcription permettant la réparation de l'ADN par rapport aux néonates (David *et al.*, 2011).

Au terme de cette partie, au niveau moléculaire, les amidophosphonates (AP1, AP2, AP3) induisent des modifications significatives sur l'ADN même aux plus faibles concentrations. L'apparition progressive des dommages s'explique par une combinaison de l'exposition directe et de la transmission des altérations de l'ADN. Quand au mécanisme de réparation, il est confirmé par l'observation de changements de la composition des produits de PCR suggérés par les courbes de température de fusion

Conclusion Generale

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 trois amidophosphonates testés sont issus d'une synthèse par la méthode d'Arbuzov (1906), une méthode utilisée pour la synthèse des phosphonates, faisant réagir à chaud un trialkylphosphite et un halogénure d'alkyle en absence de solvant. Vu l'importance des composés sur le plan biologique et chimique, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'évaluation de certaines de leurs activités, et c'est sur la base du constat d'un manque de connaissance concernant l'interaction phosphonates/ protiste cilié que notre travail cette recherche a été initiée, et divers tests ont été conduits avec un nouveau bilan pouvant être proposé aujourd'hui.

Dans un premier temps nous avons étudié la toxicité des trois xénobiotiques à travers la physiologie, la polarographie et les biomarqueurs du stress oxydant chez des paramécies : *Paramecium tetraurelia*. Nous avons ainsi mis en évidence une activité antioxydante (*in vivo* et *in vitro*) et antifongique sur deux souches (*Alternaria tenuis* et *Septoria tritici*), mais aussi un impact sur la stabilité de l'ADN génomique par la méthode RAPD-PCR, calculant le nombre de sites d'hybridation par unité génomique et ce en comparaison avec un analogue de structure commercialisé en Algérie : le chlorpyrifos éthyl.

Nos résultats révèlent une cytotoxicité chez les protistes ; se traduisant par une inhibition de la croissance suivie d'une perturbation de la consommation d'O₂ confirmant ainsi l'effet de ces molécules sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Une perturbation du taux de protéines totales et une augmentation du taux de GSH et de MDA ainsi qu'une diminution de l'activité CAT et GST. Toutes ces perturbations sont plus marquées sous l'effet d'AP3.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons aussi mis en évidence une activité antifongique plus marquée par la molécule AP3, et la souche *alternaria tenuis* est la plus sensible à cette activité, alors que l'activité antioxydante révèle un modeste effet protecteur, témoignant ainsi une faible capacité à réduire la disponibilité des agents pro-oxydants et l'inhibition de la réaction de Fenton par chélation du fer a été suggérée.

Quand aux essais génotoxiques, évalués par la méthode RAPD-PCR, ils ont mis en évidence un effet génotoxique des trois molécules. Après 48 heures de traitement les trois amidophosphonates entraînent une diminution des sites d'hybridation pour les deux amorces (OPB10, OPA9), alors que le chlorpyrifos éthyle provoque l'augmentation de ce nombre. Après 72 heures, tous les composés testés provoquent une modification de l'ADN.

Perspectives

A partir de tous ces résultats, il serait intéressant de ressortir les perspectives suivantes :

- Chercher les effets antiviraux et antibactériens potentiels de ces amidophosphonates de synthèse.
- Elargir cette étude sur d'autres espèces biologiques.
- Exploiter d'autres tests de génotoxicité (ames, micronoyau).
- Etudier leurs effets neurotoxiques sur des organismes bioindicateurs.
- Effectuer des essais avec d'autres gènes spécifiques et non spécifiques, tels le RNR, 18S ribosomal RNA, 16S ribosomal RNA.....

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Références bibliographiques.

- Abbott, W.S.; 1925:** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ Entomol.* 18: 256-267.
- Abdou, W. M.; Kamel, A. A.; Shaddy, A. A.** *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2010, 45, 5217-5224.
- Adam C., Larno V., Giraud M., Barillet S., Gania Y., Bony S. et Devaux A. (2006)** Effets génotoxiques des radionucléides chez les organismes aquatiques. *ARET Actualités*
- Allen MC, Fuhrer W, Tuck B et al (1989) Renin inhibitors:** synthesis of transition-state analog inhibitors containing phosphorus acid derivatives at the scissile bond. *J Med Chem* 32: 1652–1661.
- Al-Mutairi, D.A., Craik, I. Batinic-Haberle, L.T. Benov., 2007.** Induction of oxidative cell damage by photo- treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research*, 41: p.89-96.
- Amagata, T.; Minoura, K.; Numata, A.** *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1384–1388.
- Amiard J.-C. et Amiard-Triquet C. (2008)** Les biomarqueurs de dommages. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 95-109.
- Arbuzov A (1906).** *J Russ Phys Chem Soc* 38: 687.
- Atherton FR, Hassal CH, Lambert RW (1986)** Synthesis and structure–activity relationship of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl)phosphonic acid and (aminomethyl) phosphonic acid. *J Med Chem* 29: 29–41.
- Atherton, F. R.; Hassall, C. H.; Lambert, R. W. J. Med. Chem.** 1986, 29, 29
- Atienzar FA, Billingham Z, Depledge MH (2002).** 4-n-Nonylphenol and 17-beta estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environ Pollut* 120:735-8.
- Atienzar FA, Jha AN (2006).** The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review; 613:76-102.

Références bibliographiques.

- Atienzar FA, Jha AN. (2004).** The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B(a)P exposed *Daphniamagna*. *MutatRes*552:125-40.
- Aurousseau, B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod.Anim*,15(1),p.6782.
- Aury J.M. (2006).** Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature*; 444: page 171.
- Ayhan, S. Demir, Servet, Tural. Tetrahedron, 2007, 63, 4156-4161.**
- Bandoniene, D.; Murkovic, M.; Pfannhauser, W.; Venskutonis, P.R. & Gruzdiene, D. 2002.** DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 143 –147.
- Barchietto T., 1989.** *Mode d'action d'un anti Oomycètes, l'acide phosphonique, métabolite actif du tris-O-éthylphosphonate d'aluminium.* Thèse Doct. Univ. Paris-Sud, Orsay, France.
- Barillet, S., 2007.** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zébre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France. 476p.
- Barr, D. B., and Angerer, J. (2006).** Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environ Health Perspect* 114, 1763-1769.
- Beaumont et Cassier., 1998.** Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3^{ème} édition DUNOD
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005.** Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathy-modiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol*, 75, p.354–373.

Références bibliographiques.

- Becerril C, Ferrero M, Sanz F, Castano A. (1999)** Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis*;14:449-56.
- Beckett, G.J., Hayes, J.D., 1993.** Glutathione S-transferases: biomedical applications. *Advances in Clinical Chemistry*, 30, p.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*, pdb.emo140.
- Benbouzid, H., 2007 :** Stress chimique et comportement microbien : Cas de *Paramecium sp.* mémoire de Magister de l’ université d’ Annaba .p 71.
- Benbouzib, H., 2012 :** Evaluation et etude de la toxicité d’ une famille d’ acaricide sur des protistes ciliées. these de doctorat de l’ université d’ Annaba. p 87.
- Benbouzid H, Brrebbah H, Berredjem M, Djebbar MR (2012)** Toxic effects of phosphoramidate on paramecium sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry* 1-9, iFirst.
- Bennett, J., and Cabbage, J.; 1992:** Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. of Ecology, Olympia, WA. 29p.
- Berger MM (2006).** Nutritional manipulation of oxidative stress: state of knowledge. *Clinical Nutrition and Metabolism* 20: 48-53.
- Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20: 48-53.
- Bhattacharya, A. K., Thyagarajan, G. Chem. Rev. 1981,** 81,415.
- Bickham J. W. et Smolen M. J. (1994)** Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102 (SUPPL. 12) 25-28.
- Bjorling-Poulsen, M., Andersen, H. R., and Grandjean, P. (2008).** Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health* 7, 50

Références bibliographiques.

- Blois MS (1958)** Antioxydant determination by the use of a stable free radical. *Nature London* 181: 1199—1200.
- Bompeix G., 1989.** - Fongicides et relation plantes-parasites : cas des phosphonates. - *C. R. Acad. Agric. Fr*, 75 : 183-189.
- Bompeix G., Fettouche F., Saindrenan P., 1981.** Mode d'action du phoséthyl-Al. *Phytiatr. Phytopharm.* 30: 257-272
- Bonde, J. P., Toft, G., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Giwercman, A., Spano, M., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Ludwicki, J. K., Zvyezday, V., Bonfeld-Jorgensen, E., Bonnet J.C., Vrillon, J.L., 2003.** L'escargot *Helix aspersa* biologie- élevage- Edition INRA, 14-15.
- Bonde, J. P., Toft, G., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Giwercman, A., Spano, M., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Ludwicki, J. K., Zvyezday, V., Bonfeld-Jorgensen, E., C., Pedersen, H. S., Jonsson, B. A., and Thulstrup, A. M. (2008).** Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* 116, 269-277.
- Bondet V. Brand-Williams W, Berset C (1995)** Kinetics and Mechanisms of Antioxydant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *LWT - Food Sci. Technol* 30: 609–615
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003)** Radicaux libres et anti-oxydants. IN :Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Delattre, J ., Durand, G ., Jardillier, J.C.Eds: Médecine-sciences. Flammarion (Paris), Pp: 59-81
- Bonnet J.C., Vrillon, J.L., 2003.** L'escargot *Helix aspersa* biologie- élevage- Edition INRA, 14-15.
- Bouguerra A., 2012.** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Magister en Sciences Alimentaires Option : biotechnologies alimentaire. Université Mentouri Constantine., pp 61.

Références bibliographiques.

- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S (2007)** Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol* 146: 531–539
- Bradford, M.M.A., 1976.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *AnalyticaBiochemistry*, 72,p.248-254.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol* 28: 25–30.
- Bricheux G., Brugerolle G. (1986).** The membrane cytoskeleton complex of euglenids biochemical and immunological characterization of the epiplasmic proteins of *euglena acus*. *European journal of cell biology*; **40(2)**: 150-159.
- Bridger S, Henderson K, Glucksman E, Ellis AJ, Henry JA. Williams R (1998)** Lesson of the week: Deaths from low dose paracetamol poisoning. *British Medical Journal* 316: 1724 – 1725.
- C. Ayela, F. Vandeveld, D. Lagrange, K. Haupt, L. Nicu, Angewandte Chemie International Edition Engl. 2007, 46, 9271.**
- C., Pedersen, H. S., Jonsson, B. A., and Thulstrup, A. M. (2008).** Fertility and markers contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* 116,269-277. neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health* 7, 50. of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large
- Cachot J. et Dégreumont C. (2009)** La génotoxicité: Quel risque pour les espèces aquatiques. Fascicule Seine-Aval, 2 (2) 36.
- Campos LP, Raelson JV, Grant WF (1994).** Genome relationships among lotus species based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet*;88:417-422.
- Cassagne T., 1996,** Décontamination chimique des composés organophosphorés toxiques par nucléophiles oxydants à effet alpha, Thèse de Doctorat de l'U niversité Montpellier 1, N° 96 Mon2079, 193 pages.

Références bibliographiques.

- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A., 2006.** Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in vitro systems. *Journal of Dairy Science* .89,p : 2649-2658.
- Caswell,H.,2001.**Matrix population Models:contruction,analysis,and interpretation,second edition,Sinauer Associates(Eds.),Sunderland,Massachussets,USA,722p.
- Chabasse D., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- Chami F., 2005.** Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composes majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modeles de rat et de souris immunodeprimes. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.
- Champion R., 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. Editeur : Inra Collection : Techniques et pratiques, Editions Quae Amazone France, pp. 92-93, pp 326-331.
- Chan JY, Chan E, Chan SW, Sze SY, Chan MF, Tsui SH, Leung KY, Chan RY, Chung IY (2011)** Enhancement of in vitro and in vivo anticancer activities of polysaccharide peptide from *Grifola frondosa* by chemical modifications. *Pharm Biol* 49: 1114–1120.
- Chapman,P.M., 2001.** Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* ,463, p.149–169.
- Chuang HW., Hsieh TF., Duval M., Thomas T., 2000.** Genomics analysis of plant responses to the fungicide fosetyl by combining SSH and DNA microarrays. In Plant & Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA.
- Chun C, Qixing Z, Shuo L, Zongming X (2011).** Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere* 83:1147–1154
- Coourdassier, M., M. Saint-Denis, A. Gomot-de Vaufleury, D. Ribera, P.M. Badot, 2001.** The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of

Références bibliographiques.

dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20,p.1951-1957.

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., Beisson J. (1988). The cytoskeleton *Paramecium* (HDGortz ed); 363-392.

Colborn, T. (2006). A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ Health Perspect* **114**, 10-17.

Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* **366**, 1-13.

Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., and Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci* **13**, 1240-1249.

Cui, P.; Tomsig, J. L.; McCalmont, W. F.; Lee, S.; Becker, C. J.; Lynch, K. R.(2007); Macdonalda, T. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 17, 1634–1640.

D. J. Finney (1953), in Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge, England, 2nd edn,

Dagnelie P., 1999. Statistiques théoriques et appliquées.Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles.Univ De boeck et Larcier, 659p.

De Coen W. M. et Janssen C. R. (2003) The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (7) 1632-1641.

De Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P. et Chan H. (2000) Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*, **50** (1) 51-71.

De Lombaert, S.; Blanchard, L.; Tan, T. Bioorg. Med. Chem. Lett, 1995, 5, 145

Références bibliographiques.

- Defrank 1.1., 1989**, Enzymatic hydrolysis of toxic organofluorophosphate compounds, Biotechnology and biodegradation, Gulf Publishing Company: 183-201.
- Defrank J.J. 1991.** Organophosphorus cholinesterase inhibitors, detoxification by microbiological enzymes, In Application of Enzyme Biotechnology, Ed. Kelly 1.W. and Balwin T.O, Plenun Press New York, 165-180.
- Delahousse G., 2003.** Les plantes à propriétés antifongiques. Diplôme d'état de Docteur en pharmacie : Université de Nantes, Faculté de Pharmacie, pp 46.
- Delorme R., 1985.** Les phénomènes de resistances. Mécanisme biochimique et physiologique. Colloque international d'action et utilisation des insecticides. ANGERS. 18-19 Mai. France.
- Depledge M. et Fossi M. (1994)** The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, **3** (3) 161-172.
- Devineni SR, Doddaga S, Donka R, Chamarthi NR (2013)** CeCl₃·7H₂O-SiO₂: Catalyst promoted microwave assisted neat synthesis, antifungal and antioxidant activities of a-diaminophosphonates. *Chinese Chemical Letters* 24: 759–763
- Dickinson, D. A., and Forman, H. J.,2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology* , 64, p.1019-26.
- Djebar, H and Djebar,M.R., 2000.** Bioénergétique, Les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologie ; Synthèse2000. Publication de l'Université de Annaba. Edition Végérol : 103.
- DoAmaral AL., DalSoglio FK., DeCarli ML., Neto JFB.,1998.** Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria leaf spot of maize in Brazil. *Plant Dis.* 89,p: 44–49.
- Dombrecht EJ, Cos P, Vanden Berghe D, Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS (2004)** Selective in vitro antioxidant properties of bisphosphonates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314: 675–680.

Références bibliographiques.

- Dombrecht EJ, De Tollenaere CB, Aerts K, Cos P, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Van Offel JF, Ebo DG, Stevens WJ, De Clerck LS (2006).** Antioxidant effect of bisphosphonates and simvastatin on chondrocyte lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348: 459–464
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol*, 186, p.241-431.
- Dumas D.P., RD. Durst, W.G. Landis, F.M. Rauchel and I.R. Wild, 1990,** Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 277 : 155-159.
- Dunn CJ, Galinet LA, Wu ., Nugent RA, Schlachter ST, Staite ND, Aspar DG, Elliott GA, Essani NA, Rohloff NA (1993)** Demonstration of novel anti-arthritic and anti-inflammatory effects of diphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1691–1698
- Echaubard, M., 1995.** Les animaux comme indicateurs biologique de pollution .ANPP.Colloquinternational marqueurs biologique de pollution/biological Markers of pollution .PSImprimerie, Cretiel, France, p.335 -338.
- Echaubard, M., 1995.** Les animaux comme indicateurs biologique de pollution .ANPP.Colloquinternational marqueurs biologique de pollution/biological Markers of pollution .PSImprimerie, Cretiel, France, p.335 -338.
- El-Gokha, A.; Maas, G. Tetrahedron. 2011, 67, 2849-2857.**
- Eriksson, P., Nilsson-Hakansson, L., Nordberg, A., Aspberg, A., and Fredriksson, A. (1990).** Neonatal exposure to DDT and its fatty acid conjugate: effects on cholinergic and behavioural variables in the adult mouse. *Neurotoxicology* **11**, 345-354.
- Evans DJ., Martin SA., 2000.** Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. *Curr Microbiol.* 41(5):336-40.
- Evans DJ., Martin SA., 2000.** Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. *Curr Microbiol.* 41(5):336-40.
- Fields SC (1999)** Synthesis of natural products containing a C–P bond. *Tetrahedron* 55: 12237–12273.

Références bibliographiques.

- Fukuzawa K, Seko T, Minami K, Terao J (1993)** Dynamics of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles. *Lipids* 28: 497-503.
- Garcia, S. J., Seidler, F. J., Crumpton, T. L., and Slotkin, T. A. (2001).** Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. *Brain Res* **891**, 54-68.
- Gazi, M.R.; Kanda, K.; Yasuda, M. & Kato, F. 2004.** Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7: 1365 – 1370.
- Gazi, M.R.; Kanda, K.; Yasuda, M. & Kato, F. 2004.** Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7: 1365 – 1370.
- Gogendeau D., Keller A-M, Yanagi A., Cohen J., Koll F. (2005).** Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. *Eukaryotic Cell*; **4(12)**: 2129-2139.
- Goudable, J., Favier, A. (1997)** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 11: 115-20.
- Grayson TH, Cooper LF, Atienzar FA, Knowles MR, Gilpin ML 1999.** Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* isolates from worldwide locations. *Appl Environ Microb*;65:961-968.
- Guest DI., Saindrenan P., Barchietto T., Bompeix G., 1988.** – The phosphonate anti-Oomycete chemicals with a complex mode of action. - *Proc. 5th Int. Congr. Plant Pathol., Kyoto, Japan.*
- Guigan CM., Thiery JC., Daverio F., Jiang WG., Daviesb G., Masonb M., 2005.** Anti-cancer ProTides: tuning the activity of BVDU phosphoramidates related to thymectacin. *Bioorg. Med. Chem.* 2;13(9):3219-27.

Références bibliographiques.

- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), p.7130-7139.
- Haghdoost S, Sjolander L, Czene S, Hanns-Ringdahl M (2006)** The nucleotide pool is a
- Halliwell, B., and Chirico, S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57, p.715-724.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. 142: 31-2.
- Hellawell, J .M., 1986.** Biological indicators of freshwater pollution and environmental management .Elsevier Applied publishers, London and New –York, 530p.
- Henderson R., Hobbie J., Landrigan P., Mattisoti D., Perera F., Pfttaer E., Silbergeld E. n et Wogan G. (1987)** Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 7 3-9.
- 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, p. 347.
- Hussain HH, Babic G, Durst T, Wright JS, Flueraru M, Chichirau A, Chepelev LL (2003)** Development of novel antioxidants: design, synthesis, and reactivity. *J Org Chem* 68: 7023-7032.
- Hussine M., Ali-Azza A., Mostafa F., Maher EZ., 1999.** *Heteroat. Chem.* 6, 10.
- J. R. Venkateswara, K. Srikanth, S. K. Arepalli and V. G. Gunda, Pestic. Biochem. Physiol., 2006,** 86, 131–137.
- Jaeschke, H., 1995:** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 209, p.104-111.
- Jha A. N. (2008)** Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23 (3) 207-221.

Références bibliographiques.

- Ji LL, Fu R and Mitchell EW (1992)** Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* 73, 1854-1859.
- Johnstone W. et Rose ME., 1997.** A rapid, simple, and mild procedure for alkylation of phenols, alcohols amides and acids. *Tetrahedron*. 35, 2169-3.
- K. Das, J. Penelle, V.M. Rotello, Langmuir 2003,** 19, 3921.
- 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 assessment. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol 164. G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/New York/NY 10010, Springer-Verlag. P.93-147.
- Kamisaka, K., Habig, W.H., Ketley, J.N., Arias, M., Jakoby, W.B., 1975.** Multiple forms of human glutathione S-transferase and their affinity for bilirubin. *European Journal of Biochemistry*, 60(1), p.153-161.
- Khalil MA., 1977.** Influence de la chaleur utilisée comme moyen de lutte contre le bruché du haricot *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleopterae : Bruchidae) sur les différents états et stades de développement. Mémoire d'ingénieur en Agronomie, INA EL Harrach, pp. 77.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002)** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- Kosolapoff, G. M. J. Amer. Chem. Soc. 1946, 66, 1103
- L. Maier and H. Spoerri, Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem., 1991,** 61,69–75.
- L. Maier, Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem., 1990,** 53, 43–67.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard JC. et Ramade F., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux. Edition Masson. P. 33-53-97.
- Laib I., 2012.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaires, INATAA,

Références bibliographiques.

- Université de Constantine Mentouri, Algérie. Revue « Nature & Technologie ». n° 07/Juin 2012. Pages 44 à 52.
- Lamaison JL, petitjean-Freytet C, Carnat AP, Carnat A (1988)** In vitro radical scavenging Activities of essential Oils. *Medicinal Plants and Phytotherapy* 22: 231- 234.
- Lamaison JL, petitjean-Freytet C, Carnat AP, Carnat A (1990)** Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Borraginaceae and Lamiceae medicinals. *Annales Pharmaceutiques Franfaises* 48: 103-108.
- Leconte F., Bonnemain JL., de Cormis L., Barchietto T., 1988.** Devenir métabolique, distribution et formes de transport (système xylémienne et système phloémienne) du phoséthyl- Al chez *Lycopersicon esculentum* Mill. *C.R. Acad. Sci. III* 307: 221-227.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001)** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: 1076-1081.
- Lejczak B., Kafarski P., Mastalerz P., 1985.** Synthesis of pyrpyrrolidines chirales non-racémiques . *Beitrag zur Wirkstoffforschung*. 25.
- Lejczak, B.; Kafarski, P.; Mastalerz, P. Beitrag zur Wirkstoffforschung. 1985, 25.**
- Li Y, Zhou Q, Li F, Liu X, Luo Y (2008)** Effects of tetrabromobisphenol A as an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels. *Chemosphere* 74: 119–124.
- Liu W, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Zheng L, Sun TH, Yang YS.** DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* 2005;61:158-67.
- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ (2005)** B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* 137(1): 328-40
- Lyuksutova OI, Murphey ED, Toliver-Kinsky TE, Lin CY, Cui W, Williams DL, Sherwood ER (2005)** Glucan phosphate treatment attenuates burn-induced inflammation and improves resistance to *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. *Shock* 23: 224–232.

Références bibliographiques.

- Magan NM., Olsen., 2004.** Mycotoxines in food: Detection and control, Woodhead Publishing in Food Science and Technology, 190-203.
- Maier L (1990).** Synthesis and properties of 1-amino-2-arylethylphosphonic acid and phosphinic acids as well as phosphine oxides, Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem 53: 43–67.
- Maier L, Spoerri H (1991)** Organic phosphorus compounds 96.1 resolution of 1-amino-2-(4-fluorophenyl)ethylphosphonic acid as well as some di- and tripeptides, Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem 61: 69–75.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P (2005)** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). Food Chemistry 89: 411-420.
- Marchese, M.R.and Brinkhurst, R.O., 1996:** A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, 334p.163-168.
- Marnett, L.J., 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, p.181-222.
- Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B, Chem. Rev. 1989,** 89, 863.
- Massaya, 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.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I (1999)** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603.
- Matsuno-Yagi A., Hatefi Y., 1993.** Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. Different effects of F0 inhibitors on unisite and multisite ATP hydrolysis by bovine submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* 25;268(3):1539-45.

Références bibliographiques.

- Mauchamp B., 1985.** Endocrinologie du développement, les régulateurs de la croissance, les analogues d'hormones et les antihormones. Colloque *int.* Mode d'action et utilisation des insecticides. *ANGERS*. 18-19 Mai. France.
- McClements DJ, Decker ED (2000)** Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. *J Food Sci* 65: 1270—1282.
- McEwan M.,1994.** The antifungal effects of plant essential oils and their production by transformed shoot culture. Dr thesis, Strathclyde Institute of Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.
- McPherson,CA, Chapman, PM., 2000.** Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40,p.656-665.
- Meneghini,R., 1997.** Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.*, 23, p.783-792.
- Meyer JH, Barlett PA (1998)** Macrocyclic inhibitors of penicillopepsin. 1: design, synthesis, and evaluation of an inhibitor bridged between P1 and P3. *J Am Chem Soc* 120: 4600—4609.
- Meziti A (2009).** Antioxidant activity of extracts of *Nigella sativa* seeds, study in vitro and in vivo. Memory for graduation magister in applied biochemistry, University el-Haj Lakhdar Batna.
- Michaelis, A.; Kaehne, R. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1898, 31, 1048**
- Miller DJ, Hammond SM , Anderluzzi D et al (1998)** Aminoalkylphosphinate inhibitors of d-Ala-d-Ala adding enzyme. *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 131–142.
- Miller S.A., Dykes D.D., and Polesky H.F. (1988).** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215.
- Mizrahi DM, Waner T, Segall Y (2001)** a-Amino acid derived bisphosphonates. Synthesis and anti-resorptive activity, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem* 173: 1–25.

Références bibliographiques.

- Molyneux P (2004)** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211–219.
- Mountassif, D., Kabine, M., Manar, R., Bourhim, N., Zaroual, Z., Latruffe, N., El Kebbaj, M. S., 2007.** Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on D-B-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, 7, p.882-894.
- Nagasawa C, Nishimura-Uemura J, Tohno M, Shimosato T, Kawai Y, Ikegami S, Oda M, Saito T, Kitazawa H (2010)** Oral Administration of Phosphorylated Dextran Regulates Immune Response in Ovalbumin-Immunized Mice. *Asian-Aust. J Anim Sci* 23: 106–115.
- Nagendra PMN., Shankara BS., Sreenivasa MY., 2010.** Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology*, Vol.6 (1).
- Oleksyszyn J, Powers JC (1991)** Irreversible inhibition of serine proteases by peptide derivatives of (α-aminoalkyl)phosphonate diphenyl esters. *Biochemistry* 30: 485–493.
- Orsière T., Sari-Minodier I., Decome L., Botta C., Iarmarcovai G. et Botta A. (2005)** De la génotoxicité à la biosurveillance: 28^{ème} journées nationales de santé au travail dans le BTP. *Cancérogènes et BTP*, 25-28.
- Ortalo-Magne A., Culioli G., Valls R., Pucci B., 2005.** Polar acyclic diterpenoids from *Bifurcaria bifurcata* (Fucales, Phaeophyta). *Phytochemistry*. 66(19):2316-23.
- Otani H, Sakakibara I, Aoki T (2007)** Immunomodulatory effects of phosphorylated dextrin in mouse spleen cell cultures. *Nutr J Sci Vitaminol* 53: 349–353.
- Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997)** Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.
- Pelmont J., 1995.** Bactéries et environnement : Adaptation physiologique. *ED. O.P.U. Vol. II.* P. 736-739.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005.**

Références bibliographiques.

- Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* , 50, 1548–1557.
- 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),p.2061-2066.
- Phillips MA, Fletterick R, Rutter W (1990)** Arginine 127 stabilizes the transition state in carboxypeptidase. *J Biol Chem* 265: 20692–20698.
- 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,p.853859.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002)** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16: 233-239.
- Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T (1999)** Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin, *J Clin Invest* 104: 1363–1374.
- Prasad R., Kapoor K., 2004.** Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242:215-48.
- Qiao, D., Seidler, F. J., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2003).** Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect* **111**, 536-544.
- Quancai L, Chunxia L, Cheng Y, Chenchang L, Guangli Y, Huashi G (2013)** Preparation, characterization and antioxidant activities of polymannuronic acid phosphate, H-phosphonate and sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 281–286.

Références bibliographiques.

Radi, F., Beckman, J.S., Busch, K.N and Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulhydryls .the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J.Biol.Chem.*, 266, p.4244-4250.

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

Reddy GS, Maheswara Rao KU , Sundar CS, Sudha SS, Haritha B, Swapna S, Reddy CS (2013) Neat synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Arabian Journal of Chemistry* xxx, xxx–xxx.

Ragsdal NN., 1992. - Fungicides - *Encyclopedia of Agricultural Sciences*, 1992, 2, 445-453.

Rasooli I., Fakoor MH., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry* ; pp.135-140.

Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti ., Machella N, Bocchetti R, Principato G (1995). Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31:143-164.

Rocher., F., 2004. Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes: Evaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. École Doctorale: Ingénierie Chimique, Biologique et Géologie., Secteur de Recherche: Chimie Organique, Minérale, Industrielle. Université de Poitiers Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées., pp 9, 13.

Rolland, Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux. *OCL* 11, 419–424

Roméo M. et Giambérini L. (2008) Historique. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 17-54.

Références bibliographiques.

- Rotimi VO., Laughon BE., Barlet JS., Mosadomi HA.,1988.** Activities of Nigerian Chewing sticks extracts against *Bacterioides gingivalis* and *Bacterioides melaninogenicus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 32(4):598-600.
- Rouabhi,R.,Djebar-Berrebah,H.,and Djebar, M.R.,2006.** Evaluation of toxicity of two pesticides: Flucycloxuron and Diflubenzuron on a cellular model, *Paramecium sp.* *Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 71/2a,p.83-90.*
- S. Guezane Lakoud, M. Berredjem and N. E. Aouf,** Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem., 2012, 187(6), 762–768.
- Saindrenan P., 1990.** Modulation par les phosphonates de l'interaction plante-P hytophthora spp. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.
- Savva D. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology.** *Toxicol Ecotoxicol News Rev* 1996;3:110-114.
- Sbartai, I., Berrebah, H., Rouabhi, R., Sbartai, H., Smaghe, G. and Djebar, M.R., 2009.** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifentazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. *American-Eurasian J. Toxicol. Sci,* 1,p.13-18.
- Serghat S., Mouria A., Ouazzani touhami A., Badoc A., Douira A., 2004.** Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *pyricularia grisea* et *helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 143, 7-18
- Settaf M, Zahidy A, Elimadi R, Sapena I, Abd A, Tillement J-P et al (2000)** S-15176 reduces the hepatic injury in rats subjected to experimental ischemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology* 406: 281–292.
- Shugart L. et Theodorakis C. (1998)** New trends in biological monitoring: application of biomarkers to genetic ecotoxicology. *Biotherapy,* 11 (2) 119-127.
- significant target for oxidative stress.** *Free Radical Biology and Medicine* 41: 620-626
- Singh KP, Roy D.** Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene* 2001;269:33-43.

Références bibliographiques.

- Snoeck R., Holy A., Dewolf PC., Van Den Oord J., De Clercq E., Andrei G., 2002.** Antivaccinia activities of acyclic nucleoside phosphonate derivatives in epithelial cells and organotypic cultures . *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(11):3356-61.
- Sonneborn T.M. (1974).** [Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis]. *Tsitologia*; **16(9)**: 1063-1088.
- Sorg O (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* 327: 649-662.
- Swaroop, S.; 1966:** Statistical methods in malaria eradication, Geneva, World Health Organization (Monograph Series, No. 51.
- Talbot, P. S. (2004).** The molecular neuroimaging of anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 6, 274-279.
- 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,p.371–76.
- Teresa, B. M.; Faísca, P. A. M. Tetrahedron Asymmetry. 2010, 21, 2746–2752.**
- Terrain C. et Graallet H., 2003.** Séchage des grains en organisme stockeur: guide pratique. Ed : ARVALIS, Institut du végétal et FFCA, pp. 1-5.
- Theodorakis C. W. et Shugart L. R. (1997)** Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology*, 6 (6) 335-354.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006).** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 178–189.
- Van Bladeren, P.J., 1988.** Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 9, p.295-299.

Références bibliographiques.

- van der Oost R., Beyer J. et Vermeulen N. P. E. (2003)** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13** (2) 571-49.
- Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Bracke PG, Stevens WJ, De Clerck LS (2001)** Influence of cyclic intravenous pamidronate on proinflammatory monocytic cytokine profiles and bone density in rheumatoid arthritis treated with low dose prednisolone and methotrexate. *Clin Exp Rheumatol* 19: 13–20.
- Vasseur P., Cossu-Leguille C., Atienzar F., Rodius F. et Lemièrre S. (2008)** Marqueurs de génotoxicité et effets in situ, individuels et populationnels. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.
- Viarengo, A., Nott, J., 1993.** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. Toxicol*, 104, p.355–372.
- Viarengo, A., 1994.** Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca²⁺ homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol*, 20, p.85–110.
- Vidal ML., 2001.** Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalve D'eau douce *Corbicula fluminea* (Muller) - Purification et caractérisation des Glutathion S-Transférases. Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux. 267 p. 15, 17.
- Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Zhang J, Li P (2009)** Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro. *Int J Biol Macromol* 44: 170–174
- Weckberker G, Cory G (1988)** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters* 40: 257-264.
- Weckberker, G., Cory, G., 1988.** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, p.257-264.

Références bibliographiques.

- Wehner et Gehring., 1995.** Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive. Deboeck Université.Thieme Verlag, p.286-287.
- Welsh J, McClelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-7218.
- Whitney, K. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1995).** Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**, 53-62.
- WHO (1993).** Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental HealthCriteria*, **155** World Health Organization, Geneva.
- Wichterman N.R.; 1953:**The Biology of *Paramecium*. *Blakiseon* (Pa), 527 p.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. et Tingey S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22) 6531-6535.
- Wong C.K., Cheung and Ming-Ho Yo. ; 1999:** Toxicological esseement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tetiolecta*. *Environnemental pollution*, 105: 175-183
- Xue Y, Gu X, Wang X, Sun C, Xu X, Sun J, Zhang B (2009)** The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology* 18: 693–699.
- Yoon CS., Jinj H., Parkj H., yoon HJ., Cheong SW., 2003.** The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *xenop* embryon and animal. *Cap. Explants. Environ. Toxicol.* P. 327-337.
- Zahri S., Farih A., Badoc A., Douira A., 2008.** Efficacité De Plusieurs Fongicides Contre La Septoriose Du Blé. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2008, 147, 39-48.

Références bibliographiques.