

N° Réf :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila-

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement

Option : Biochimie et Microbiologie appliquée

Thème :

Etude Toxicologique d'un fongicide (Mancozèbe 80 WP) sur un modèle d'eau douce : *paramécium sp*

Présenté par :BOUSBAA Amira

Devant le jury composé de :

Président : TAYAA Hakima

M.C.A Centre Universitaire de Mila

Examineur :MLIKI Feriel

M.C.B Centre Universitaire de Mila

Promoteur : Mme.BOULASSEL Amina

M.C.B Centre Universitaire de Mila

Année Universitaire: 2016/2017

Remerciements

*A la fin de ce travail nous adressons
notre sincères remerciements à notre Dieu
le grand créateur qui nous guidé dans notre travaux pour aboutir à ces résultats.*

*Nous aimerions aussi adresserme plus sincères gratitudes au docteur BOULASSEL
Amina d'avoir accepté d'encadrer ce travail, de nos avoir accompagné jusqu'au bout
et pour nos avoir donné les
moyens de mener ce travail. Nous serons toujours reconnaissant pour la confiance
qu'elle nos a donnée toutecette période du travail.*

*Nous tenons à remercier madame TAYAA Hakima d'avoir accepté de présider le jury
d'examen. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance.*

*Nous tenons aussi particulièrement à exprimer nos vifs et sincères remerciements au
madame MLIKI Feriel pour sa disponibilité, sa grande patience, et toutes les
corrections qu'il a bien
apporter à ce travail et pour avoir accepter d'en être l'examineur.*

Merci du fond du coeur.

*Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué à
la réalisation de ce mémoire, les ingénieurs de laboratoire de centre universitaire du
Mila.*

*Merci à toutes les personnes qui ont contribué, de prés ou de loin, à la réalisation de
Ce travail.*



Dédicace

A mon père,

*A ma mère, ma plus grande supportrice, pour son amour, son réconfort
et ses prières.*

A mes frère et mes sœur

A mon époux Badis pour m'avoir aider à continuer et d'aller vers l'avant.

A ma belle famille.

*Un grand Merci à **Dieu** pour m'avoir donner tant de patience pour
pouvoir continuer malgré les obstacles et les embûches.*

Mille Merci.....



Sommaire

Sommaire

<i>Listes des Figures.....</i>	<i>IX</i>
---------------------------------------	------------------

<i>Listes des Tableaux.....</i>	<i>XI</i>
--	------------------

<i>Liste des Abréviations.....</i>	<i>XII</i>
---	-------------------

Introduction

**** Partie I: Etude bibliographique ****

Chapitre I : Lesfongicides

I. Généralité sur les pesticides.....	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Classification des pesticides selon leur mode d'action	3
I.3. Devenir des pesticides dans l'environnement.....	4
I.4. Toxicité des pesticides.....	4
I.4.1. La toxicité aigüe des pesticides.....	4
I.4.2. La Toxicité chronique des pesticides.....	5
I.5. Pesticides en Algérie.....	5
II. Les Fongicides.....	6

II.1.Définition.....	6
II.2.Classification Des Fongicides.....	6
II.2.1.Classification par mode d'action sur les parasites.....	6
II.2.2.Classification par mode d'action sur la plante.....	7
II.2.2.1.les fongicides non systémique.....	7
II.2.2.2.Les fongicides systémiques	7
III. Généralité sur le xénobiotique utilisé.....	8
III.1. Définition de Mancozèbe.....	8
III.2.Mode d'action de Mancozèbe.....	8
III.3. Identification de produit (Mancozèbe 80 WP).....	9
III.4. Propriétés physicochimiques de Mancozèbe 80 WP.....	10
III.5.Toxicité de Mancozèbe 80 WP	10
III.5.1.Latoxicité aigüe de Mancozèbe 80 WP.....	10
III.5.2.Toxicité chronique de Mancozèbe 80 WP.....	10
III.5.3.Toxicité sur l'Homme.....	11

Chapitre II : Généralité sur les paramécis

I. Rappel sur les protistes.....	12
I.1. Définition des protistes.....	12
I.2. Phylogénie des Protistes.....	12
II. Rappel sur les Paramécies	14

II.1.Définition.....	14
II.2. Morphologie.....	14
II.3.Mouvement.....	16
II.4.Reproduction.....	16
II. 5.Alimentation.....	17
II. 6.Respiration.....	17
II.7.Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie	17

Chapitre III : Stress oxydatif

I. Définition et origine de Stress oxydatif.....	19
II.Radicaux libres et système biologique.....	19
II.1. Définition et mode de production.....	19
II.1.1.EOR d'origine mitochondriale.....	20
II.1.2.Autres sources d'EOR	21
II.2.Fonctions des radicaux libres.....	22
II.3. Substances oxygénées réactives et leurs mécanismes.....	
d'action.....	23
III. Le système antioxydant cellulaire	23
III.1. Les antioxydants endogènes	24
III.1.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques.....	24
III.1.2. Antioxydant endogène non enzymatique	25

III.2. Antioxydants exogènes ou nutritionnels.....	25
III.2.1. Vitamines.....	25
III.2.1.1. Vitamine E.....	25
III.2.1.2. Vitamine A.....	25
III.2.1.3. Vitamine C.....	26
IV. Biomarqueurs de stress oxydant retenus pour notre étude.....	26
IV.1. Le glutathion, un antioxydant non enzymatique.....	26
IV.2. L'activité catalase.....	27
V. Les dommages induits par les ROS.....	27

**** Partie II : Etude Expérimentale ****

Matériel et Méthodes

1. Matériels.....	28
1.1. Matériels biologique.....	28
1.2. Matériel chimique.....	29
2. Mode de traitement.....	29
3. Méthodes.....	29
3.1. Culture des paramécies.....	30
3.1.1. Une culture mixte.....	30
3.1.2. Une culture pure.....	30
3.2. Paramètres mesurés.....	30
3.2.1. Tests de cytotoxicité.....	30

3.2.1.1. Cinétique de croissance cellulaire.....	30
3.2.1.2. Calcul du pourcentage de réponse.....	31
3.2.2. Paramètres Biochimiques.....	32
3.2.2.1. Dosage des principaux métabolites.....	32
3.2.2.2. Dosage des biomarqueurs de stress oxydative.....	33
3.2.2.2.1. Dosage du glutathion (GSH).....	33
3.2.2.2.2. Dosage de l'activité catalase.....	34

**** Résultats et discussions ****

I. Résultats.....	36
I.1. Les tests de cytotoxicité.....	36
I.1.1.Courbe de croissance	36
I.1.2.Effet du Mancozèbe 80 WP sur la cinétique de croissance.....	36
I.1.3.Effet de du Mancozèbe 80 WP sur le pourcentage De réponse	37
I.2.Evolution des paramètres biochimiques.....	38
I.2.1. Effet du Mancozèbe 80 WP sur les principaux métabolites.....	38
I.2.1.1.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des protéines	38
I.2.1.2.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des lipides	39
I.2.1.3.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des glucides	40
I.2.2. Effets du Mancozèbe 80 WP sur l'évolution des Biomarqueurs.....	41

I.2.2.1. Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de GSH.....41

I.2.2.2.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de l'activité catalase.....42

II. Discussions43

Conclusion et Perspectives

Références Bibliographiques

Résumé



Liste des figures

Liste des figure

Figure	Titre	Page
01	Voies et mécanismes de dispersion dans l'environnement (Jean-Joël et Philippe, 2005).	05
02	Cible des fongicides affectant les processus respiratoires (Regnault R C <i>et al.</i> , 2005).	09
03	Position du genre <i>Paramecium</i> dans le système « Trois domaines » (Woese <i>et al.</i> , 2000).	13
04	Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).	16
05	La mitochondrie est la principale source d'EOR (Ré <i>et al.</i> , 2005).	22
06	Les différents niveaux de la défense antioxydant (Hayes et Mc Lellan, 1999).	24
07	Structure d'une paramécie	28
08	formule chimique de Mancozèbe 80 WP (Ineris ; 2014)	29
09	Protocole d'essai de cytotoxicité chez les paramécies	31
10	Protocole de dosage des macromolécules biochimiques (Shibko <i>et al.</i> , 1966)	32

11	Cinétique de la croissance des paramécies en fonction du temps.	36
12	Cinétique de la croissance des paramécies traitées au Mancozèbe 80 WP	37
13	Pourcentage de réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP	38
14	Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des protéines	39
15	Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des lipides	40
16	Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des glucides.	40
17	Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de GSH	41
18	Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de l'activité catalase	42



Liste des Tableaux

Liste des Tableaux

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<i>01</i>	Identification de fongicide Mancozèbe 80 WP (ECH ; 2006) (ECH ; 2009) (Ineris ; 2014)	<i>09</i>
<i>02</i>	Propriétés physicochimiques de Mancozèbe 80 WP (ECH ; 2006) (ECH;2009) (E.C ; 2009)	<i>10</i>



Liste des Abréviation

Liste des Abréviations

ADN : Acide **D**ésoxyribonucléique.

AGPI : Acide **G**ras **P**olyinsaturés.

AINS : **A**nti**i**nflammatoires.

AMPK : **P**rotéine**K**inase **A**ctivé par le système AMP(**A**dénosine **M**ono**P**hosphate).

APX : Ascorbate –**P**eroxydase.

ARNr : Acide ribonucléique

BSA : SerumAlbumin**B**ovine.

CAT : Catalase.

°C : Degré Celsius.

DL50 : Dose **L**étale.

DO : Densité**O**ptique.

DTNB : Acides 5 ,5'**D**ithiodis-2-**N**itrobenzoïque.

EAA : Espèces **a**zotées **a**ctives.

ECOSAR: **E**COlogicalStructure **A**ctivité **R**elationship.

EDTA : Acide **E**thylène**d**initrilotétraacétique.

EOA : Espèces **o**xygénées **a**ctives.

ERO : Espèce**R**eactive de l'**o**xygene.

g: gramme.

Glu -Cys-Gly: Acide **g**lutamique **c**ystéine**g**lycocolé.

GPx: Glutathion **P**eroxydase.

GR : Glutathion **R**éductase.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion disulfure.

h: heure.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

H₂O : Eau

L : Litre.

min: minute.

mg: milligramme.

ml: millilitre.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotidephosphate réduit

nm: nanomètre.

nmol:nanomole.

NO : Monoxyde d'azote/ Oxyde nitrique .

NO₂: Dioxyde d'azote.

NOEC :No Observed EffetConcentration.

1O₂: Oxygène singlet.

•O₂⁻ : Superoxyde anion.

O₃: Ozone.

•OH: Radical hydroxyl.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONOO : Peroxynitrite.

pH: potentiel hydrogène.

pK_a: Constante de dissociation d'une molécule.

PR : Pourcentage de réponse.

PTP : Pore de transition de perméabilité.

Q₁₀ : Quinone 10.

RL: Radical Libre.

RNS: Reactive NitrogèneSpecies

RONs: Reactive Oxygen and Nitrogen Species.

ROS: Reactive Oxygen Species.

RS•: Radical thiyl.

-SH: Groupmentthiol.

SOD :Superoxide dismutases.

STEP: Station d'épuration .

TCA: Acide Trichloracétique.

TRIS: Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-Propanediol)

UV : Ultra Violet.

Vit : Vitamine.

µg: Microgramme.

µM: Micromole.



Introduction

Introduction

L'écosystème aquatique se définit par l'ensemble constitué de l'eau et des espèces qui y vivent. L'état d'équilibre résulte de toutes les interactions entre les organismes vivants eux-mêmes d'une part, et entre les différentes espèces et leur milieu de vie d'autre part. Cet équilibre devient de plus en plus menacé par la pollution, due essentiellement à l'homme et ses activités (**Štirn, 1982 ; Conseil de l'Europe, 1992 ; OCDE, 2001 ; Suty, 2010**).

De tout temps, l'homme s'est trouvé dans l'obligation de défendre ses cultures contre les parasites, les ravageurs et les plantes concurrentes. La lutte physique a d'abord été utilisée à travers le désherbage ou le ramassage des insectes. Quelques produits étaient utilisés, mais c'est vraiment à partir de la seconde guerre mondiale qu'avec l'essor considérable de la chimie organique, la lutte chimique a pris l'importance qu'on lui connaît aujourd'hui par l'introduction des pesticides. (**Vigouroux-Villard, 2006 ; Charbonnel, 2003**). Ces derniers sont des produits phytosanitaires (ou phytopharmaceutiques lorsqu'ils sont accompagnés d'un adjuvant) destinés à protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles et les biocides qui sont, d'une manière large, destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles (**Camard, 2010**).

Tous ces pesticides générés par les activités humaines sont déversés dans l'environnement marin induisant une pollution aquatique.

Cette pollution constitue un problème majeur tant pour la population humaine que pour les organismes vivants. Le plus souvent, les effets néfastes sur les organismes aquatiques se traduisent par une surmortalité ou des modifications comportementales qui ont modifié leurs capacités physiologiques, ce qui revient, au final, à une diminution sensible des effectifs jusqu'à la disparition complète de certaines espèces sensibles (**Harrison, 2001 ; Sindermann, 2006**). Parmi les polluants aquatiques, les produits chimiques représentent un danger sérieux pour les organismes vivants (**Jamet, 1994**).

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (**Boveris et al., 1972**). De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (**Neuzil et al., 1993**).

On assiste alors à une désorganisation des structures membranaires, à l'oxydation des lipoprotéines circulantes qui ne peuvent plus être épurées, à l'oxydation de protéines qui perdent alors leur fonction, à l'attaque et à la fragmentation de l'ADN.

Le stress oxydatif touche donc l'ensemble des tissus et des métabolismes et de ce fait participe à un grand nombre de pathologies.

Ainsi le Mancozèbe 80 WP de la famille des dithiocarbamates pourrait être également à l'origine du déclenchement d'un stress oxydative. Dès lors, il nous a semblé judicieux de mesurer les différents biomarqueurs du stress oxydative englobe les divers cibles cellulaires. Et pour cela, nous avons opté pour l'utilisation de *paramécium sp* comme modèle biologique alternatif.

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

- Leur facilité à être cultivées en laboratoire, leur manipulation rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (**Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995**).
- Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales des mammifères (**Druez et al., 1989 ; Gräf et al., 1999**).

Enfin Le présent travail a donc pour objectif d'étudier les effets d'un fongicide (Mancozèbe 80 WP) sur la biologie et le comportement de la paramécie.

*Partie I : Etude
Bibliographique*



Chapitre I : *Les fongicides*

I. Généralité sur les pesticides

I.1. Définition

Le mot pesticide est composé de «Pest» qui signifie animal ou plante nuisibles à la culture et «cide» qui veut dire tuer. Les pesticides appelés également produits phytosanitaires, phytopharmaceutiques ou de traitement sont des poisons destinés à tuer les herbes (herbicides), les insectes (insecticides), à lutter contre les maladies cryptogamiques (fongicides), ou à se débarrasser de divers animaux jugés nuisibles (raticides, nématicides...) (Loper *et al.*, 2005).

I.2. Classification des pesticides selon leur mode d'action

Les pesticides en contact avec leur cible peuvent agir de diverses manières :

➤ **Les herbicides :**

Destinés à limiter l'installation d'espèces végétales adventices. Peuvent être sélectifs ou totaux. Les familles de substances les plus importantes sont les acides aminophosphoriques (glyphosate), les urées (diuron, isoproturon), les triazines (atrazine, simazine). (Calvet, 2005)

➤ **Les insecticides :**

Destinés à tuer les insectes ou à empêcher le déroulement normal de leur cycle de vie. Les familles les plus rencontrées sont les organophosphorés (malathion), les carbamates insecticides (carbaxyl), les pyréthrinoides (deltaméthrine) et les organochlorés (endosulfan). (Calvet, 2005)

➤ **Les fongicides :**

Destinés à éliminer les champignons. On distingue trois modes d'action différents. Les multisites qui s'attaquent aux spores des champignons. Ils sont donc préventifs. Les unisites qui perturbent la perméabilité membranaire des champignons. Les antimétabolites qui bloquent la division cellulaire. (Calvet, 2005)

➤ **Les molluscicides et autres pesticides :**

Les molluscicides sont destinés à éliminer les escargots et les limaces. Ils sont épandus essentiellement sous forme de granulés. Les rotenticides agissent contre les rongeurs. Les anticoagulants représentent 85% du marché. Quelques produits de gazage sont encore utilisés. Les nématicides agissent sur les nématodes. **(Calvet, 2005)**

I.3. Devenir des pesticides dans l'environnement

Les pesticides ont été depuis près d'une cinquantaine d'années mis en évidence dans tous les compartiments environnementaux qui n'ont subi aucun traitement. Ils ont été retrouvés dans les eaux de rivières, les nappes phréatiques, l'air, les eaux de pluie, mais aussi dans les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale **(Pimentel, 1995)**.

I.4. Toxicité des pesticides

La toxicité d'une substance est l'ensemble des propriétés physiologiques ou biologiques qui font que cette substance puisse endommager ou altérer un organisme vivant par des moyens autres que mécaniques **(FAO, 2003)**.

I.4.1. La toxicité aigüe des pesticides

Il s'agit d'une toxicité induite par une exposition ponctuelle à une dose importante de pesticides susceptibles d'entraîner des effets immédiats ou rapprochés (manipulation de produits non dilués...) **(ORSB, 2001)**.

I.4.2. La Toxicité chronique des pesticides

Selon **Multigner(2005)**, il s'agit d'un risque à long terme difficile à estimer car lié à la consommation répétée de doses très faibles. L'exposition chronique serait la cause de l'augmentation de certains cancers (leucémie, lymphomes non hodgkinien, sarcome et tumeurs cérébrales), de troubles de la reproduction (avortement, stérilité, infertilité masculine, malformation congénitale de l'appareil génital masculin), de troubles du système nerveux et du comportement et d'effets endocriniens (Perturbation du système hormonal).

I.5. Pesticides en Algérie

L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent les plus grandes quantités de pesticides. Récemment dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. Ainsi environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (**Bordjiba et Kétif, 2009**).

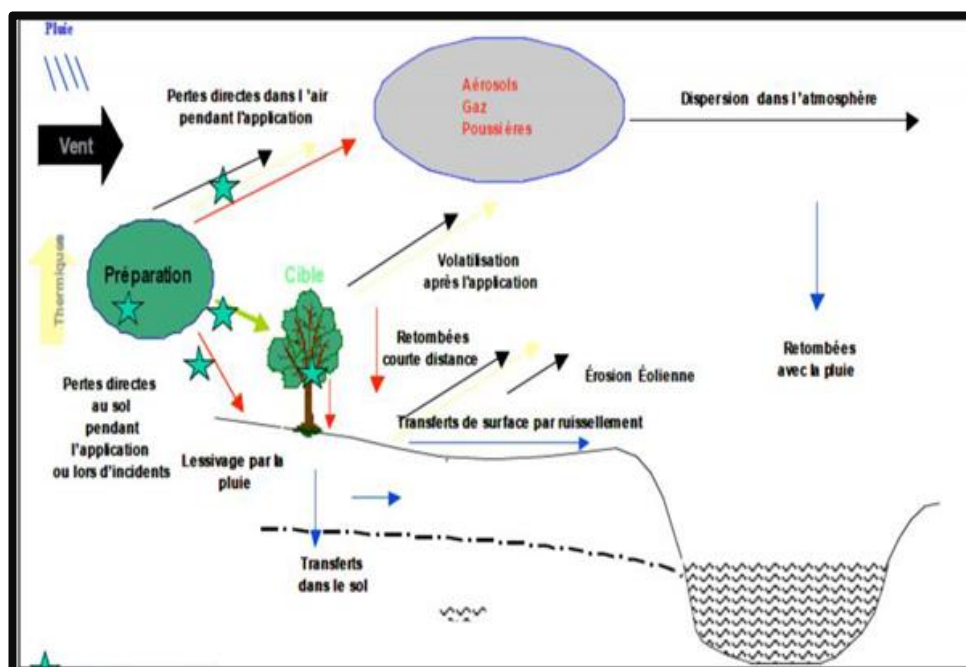


Figure 01 : Voies et mécanismes de dispersion dans l'environnement
(Jean-Joël et Philippe, 2005).

II. Les Fongicides

II.1.Définition

Un fongicide est un produit phytosanitaire conçu spécifiquement pour tuer ou contenir la croissance des champignons parasites sur les végétaux ou des organismes vivants. **(Azzouz, 2012).**

Par contre, toutes les maladies fongiques ne sont pas contrôlables avec un fongicide, on peut penser à des maladies vasculaires comme la fusariose. Généralement, les maladies causées par des bactéries où des virus ne sont pas contrôlées par les fongicides. **(Carisse D, 2008).**

II.2.Classification Des Fongicides

II.2.1.Classification par mode d'action sur les parasites

Les fongicides ont des modes d'action très diversifiés, et agissent selon deux voies principales. L'une est à une action directe sur les parasites et l'autre nécessite l'intermédiaire des plantes-hôtes pour transformer les fongicides en composés phytotoxiques.

➤ Fongicides à action directe

Les fongicides à action directe possèdent un (uni-site) ou plusieurs sites d'action biochimique (multi-sites), et perturbent directement le métabolisme (respiration, biosynthèses) ou la structure du cytosquelette cellulaire. Si les fongicides uni-sites inhibent la croissance mycélienne et/ou la germination des spores de champignon, les fongicides multi sites sont cependant plus actifs sur la germination des spores que sur la croissance mycélienne.

➤ Fongicides actifs par l'intermédiaire de la plante hôte : stimulateurs des défenses naturelles

Ces fongicides ont pour propriété de stimuler les défenses de la plante à traiter. Au cours d'un cycle d'infection, les champignons sécrètent des protéines phytopathogènes telles les éliciteurs. En réponse à cette agression, la plante déclenche plusieurs mécanismes de défense, dont l'induction de phytoalexines, lesquelles inhibent la croissance de ces pathogènes **(INRA – Cemagref, 2005).**

II.2.2. Classification par mode d'action sur la plante

En se basant sur leur comportement vis à vis de la plante, deux groupes principaux peuvent être distingués : les fongicides systémiques et les fongicides non systémique ou de contact.

II.2.2.1. les fongicides non systémique

Un fongicide de contact lorsqu'il est appliqué à la surface de la plante forme une barrière protectrice qui est toxique pour la germination des spores ou pour le mycélium du champignon responsable de la maladie. Les composés chimiques ne pénètrent pas dans les tissus de la plante (**Carisse, 2013**).

Exemple : Substances polyvalentes ou multi-sites

Ces composés inhibent simultanément plusieurs fonctions essentielles du champignon; ils n'ont pas de cible enzymatique spécifique. De ce fait, on n'observe pas ou très peu de résistance de champignons vis-à-vis de ces molécules (**Leroux, 2003**). Les produits multi-sites sont utilisés soit en pulvérisation sur le feuillage des cultures, soit en traitement des semences. Ils inhibent plus particulièrement la germination des spores. Du fait de leur faible rémanence, leur application doit être régulièrement renouvelée. Plusieurs familles chimiques appartiennent à cette catégorie comme Les dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe, zinèbe, zirame, thirame...) qui sont des produits non phytotoxiques et même activateurs de croissance des plantes (**Françoise R, 2004**).

II.2.2.2. Les fongicides systémiques

La systémie des fongicides se limite uniquement à une systémie xylémienne: le produit diffuse de la semence (zone d'application) vers le sol environnant puis est absorbé par les racines au moment de la germination pour migrer vers les parties aériennes (**FrançoiseR, 2004**).

Exemple : Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires

Ces inhibiteurs peuvent provoquer l'apparition de résistance chez les champignons pathogènes, en particulier si leur utilisation est excessive comme les Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase (**Françoise R, 2004**).

III. Généralité sur le xénobiotique utilisé

III.1. Définition de Mancozèbe

Le Mancozèbe 80 WP est un fongicide de contact de la famille des Dithiocarbamates. Son action préventive multi-site permet de réduire considérablement les risques d'attaque fongique sur diverses cultures (**Ineris, 2014**).

Cette substance est autorisée en Europe, pour son usage agricole en tant que fongicide. En France, une cinquantaine d'intrants sont identifiés pour plus de 40 traitements sur arbres fruitiers (agrumes, abricotiers, noyers, oliviers, pêchers, poirier, pommiers, pruniers), légumes (betteraves, carottes, courgettes, concombres, haricots, oignons, poireaux, pommes de terre, , pois, etc.), fruits (fraisiers, , tomates, etc.), céréales (avoine, blé, orge), tournesol, arbres et arbustes d'ornements (dont rosiers), fleurs (chrysanthèmes), vignes, etc. (**Ineris, 2014**).

Le principal métabolite de Mancozèbe chez les mammifères est l'éthylène thiourée (ETU), responsable de la toxicité au niveau de l'organe cible, la thyroïde.

III.2. Mode d'action de Mancozèbe

Le Mancozèbe fait partie des fongicides affectant le processus respiratoire. Selon **Dorothée B (2011)** Ces fongicides agissent sur différentes étapes du catabolisme oxydatif de molécules organiques (glucides, lipides), processus servant à générer de l'énergie pour la cellule sous forme d'ATP. De nombreuses molécules affectent en particulier la chaîne respiratoire mitochondriale, constituée d'une série de transporteurs d'électrons. Ces molécules sont capables d'inhiber la germination des spores des champignons, de bloquer l'élongation du filament mycélien, et aussi d'immobiliser les zoospores des oomycètes (groupe comprenant les mildious).

Les dithiocarbamates interagissent avec les enzymes respiratoires métalliques, il y a chélation entre le fongicide et le métal de l'enzyme respiratoire, formant des complexes de grande taille (**Dorothée B, 2011**).

Le Mancozèbe inhibe la germination des spores, corrélée avec l'inhibition de la respiration, due au blocage d'enzymes ou coenzymes à groupement thiols SH. Ils sont faiblement toxiques pour l'homme du fait de leur interaction avec le glutathion, qui conduit à leur dégradation (**Dorothée B, 2011**).

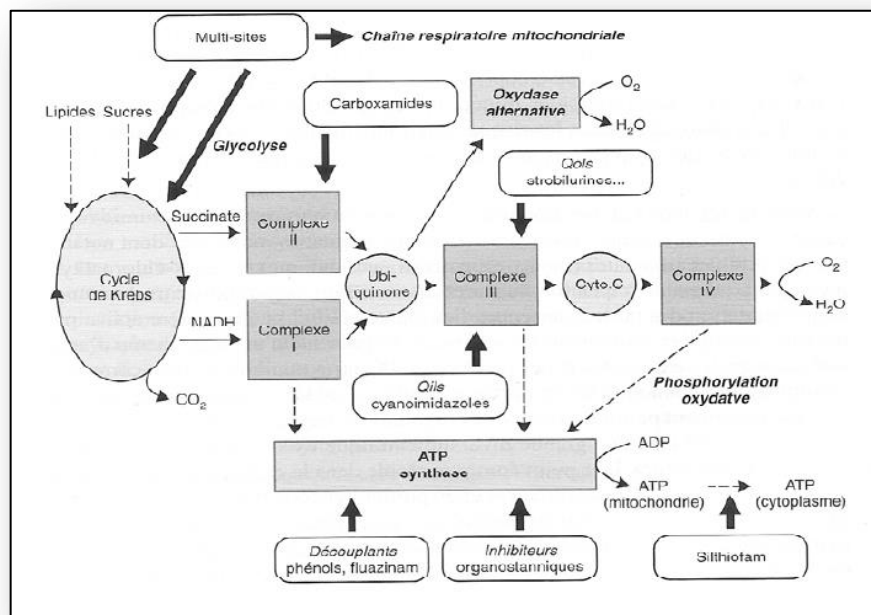


Figure 02 : Cible des fongicides affectant les processus respiratoires

(Regnault R C *et al.*, 2005).

III.3. Identification de produit (Mancozèbe 80 WP)

Tableau 01 : Identification de fongicide Mancozèbe 80 WP (ECH ; 2006) (ECH ; 2009) (Ineris ; 2014)

Nom	Mancozèbe 80 WP
Fonction	Fongicide
Numéro CAS	8018-01-7
Formule brute	(C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄) x(Zn) y
Nom chimique	Ethylène-bis (dithiocarbamates) de manganèse (polymérisé), complexe avec le sel du zinc
Structure chimique	$\left[\text{S}-\overset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{Mn} \right]_x \text{Zn}_y$
Etat physique	Poudre
Couleur	Gris jaune

III.4. Propriétés physicochimiques de Mancozèbe 80 WP

**Tableau 02 : Propriétés physicochimiques de Mancozèbe 80 WP (ECH ; 2006)
(ECH;2009) (E.C ; 2009)**

Caractéristique	Valeur
poids moléculaire (g/mol)	271.3
solubilité dans l'eau à 20°C (g/l)	Insoluble
Poids moléculaire [g/mol]	271,3
Hydro- solubilité [mg/L]	2 – 20
Pression de vapeur [Pa]	1,33 10 ⁻⁵
Coefficient de partage carbone organique-eau (Koc) [L/kg]	Moyenne des valeurs mesurées (étendue): 997,5 (363 – 2334, n=4)
Constante de dissociation (pKa)	10,3 à 25°C

III.5.Toxicité de Mancozèbe 80 WP

III.5.1.Latoxicité aigüe de Mancozèbe 80 WP

Le Mancozèbe présente une très faible toxicité aiguë après administration par voie orale, cutanée ou par inhalation. Il est légèrement irritant pour les yeux et sensibilisant pour la peau. (INRS ,2016).

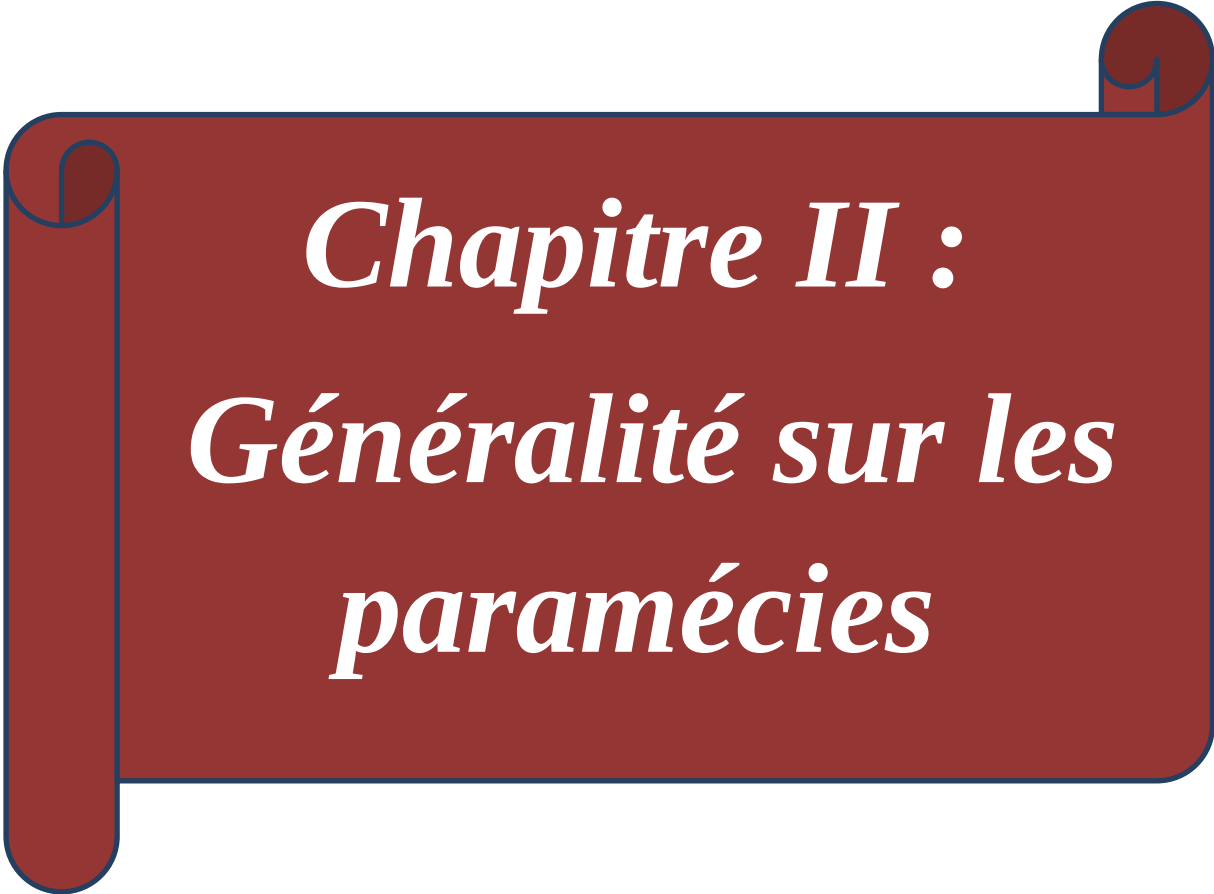
III.5.2.Toxicité chronique de Mancozèbe 80 WP

Chez l'animal, l'exposition répétée par ingestion ou inhalation induit une hypothyroïdie (INRS ,2016).

III.5.3.Toxicité sur l'Homme

L'exposition aiguë aux préparations à base de Mancozèbe est responsable d'irritations cutanées et muqueuses de sévérité variable. Les réactions de sensibilisation sont fréquentes et des cas de photosensibilisation sont rapportés. Les dithiocarbamates peuvent induire un syndrome antabuse lors de l'ingestion ou l'application cutanée d'alcool pendant ou après exposition. L'exposition répétée entraîne une atteinte thyroïdienne. Un lien entre l'exposition au manèbe (fongicide très proche du Mancozèbe) et la survenue d'une maladie de Parkinson a été établi. Des publications suggèrent également la survenue d'effets immuno-modulateurs. Des effets génotoxiques ont été mis en évidence dans l'étude. Une étude a mis en évidence un risque de leucémie lors d'expositions au Mancozèbe et au toxaphène. Une association modérée est montrée pour des anomalies du tube neural. **(INRS ,2016)**

Il existe quelques données dans la littérature relatives à l'exposition au Mancozèbe seul chez les travailleurs des usines de production ; la plupart des données publiées concernent les effets rapportés lors de l'exposition professionnelle aux préparations commerciales. La présence de co-formulants dans les préparations est susceptible de modifier sensiblement le profil toxicologique observé chez l'animal à partir des études effectuées sur la substance active seule. **(INRS ,2016).**

A decorative red scroll with a dark blue outline, featuring rolled-up ends on the left and right sides. The text is centered on the scroll.

Chapitre II :

Généralité sur les paramécies

I. Rappel sur les protistes

I.1. Définition des protistes

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

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

- Les **Actinopodes** qui émettent de fins pseudopodes rayonnants.
- Les **Cnidosporidies** sont des parasites dont le stade initial est un germe amiboïde et le stade final une spore pourvue d'un filament évaginable.
- Les **Rhizoflagellés** qui comprennent les rhizopodes et les flagellés.
- Les **Sporozoaires** (ou **Apicomplexes**) sont dépourvus à l'état adulte d'appareil locomoteur. Ce sont des parasites des cellules animales pourvus d'un complexe apical et se reproduisant par sporogonie.
- Les **Infusoaires** ou **Infusoires** sont des protistes de grande taille (jusqu'à 300 µm pour la paramécie). Ils sont munis d'un **macronucléus** et d'un **micronucléus**. On y distingue:

*Les **Holotriches** (paramécie).

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

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

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

I.2. Phylogénie des Protistes

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

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

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

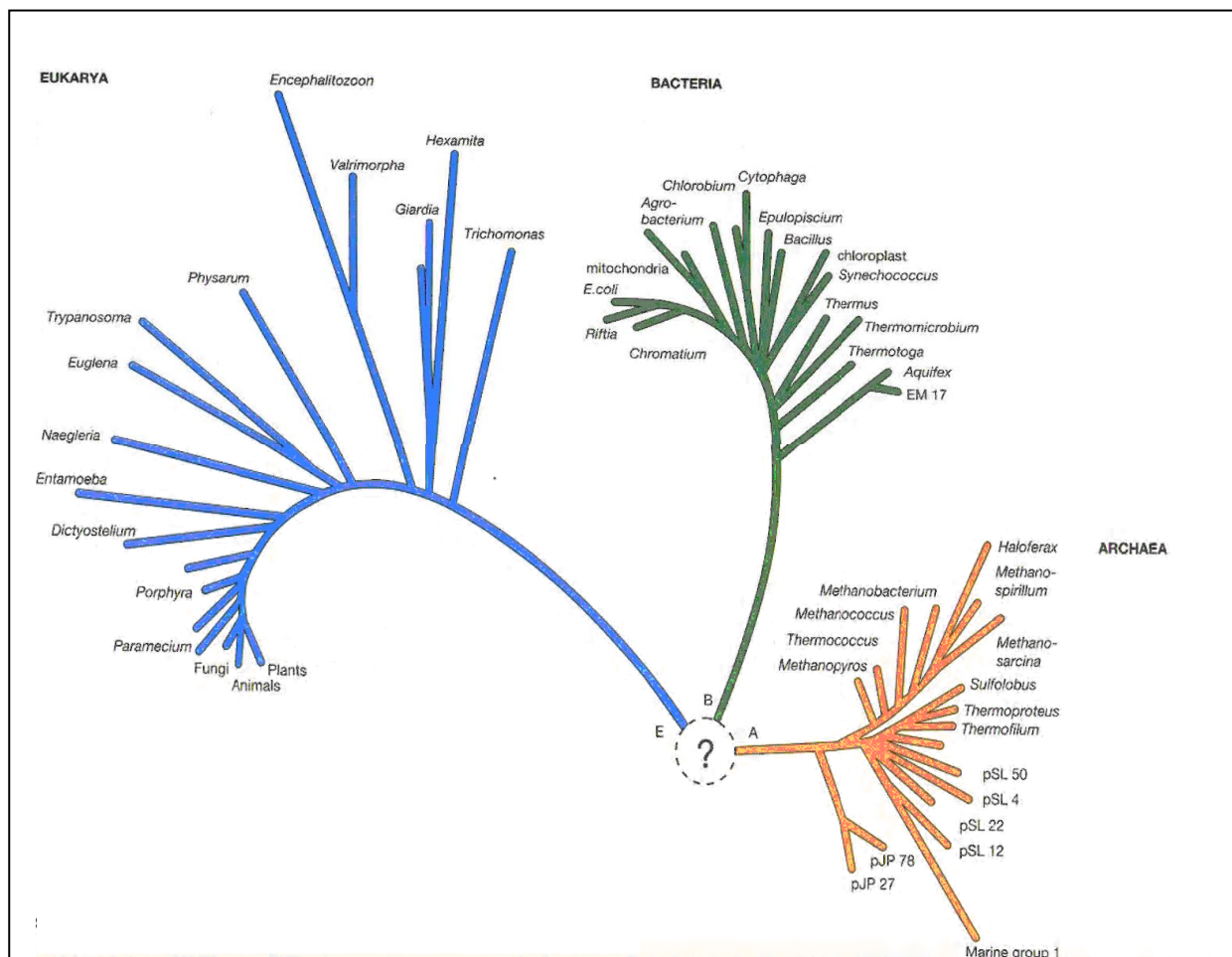


Figure 03 : Position du genre *Paramecium* dans le système « Trois domaines »

(Woese *et al.*, 2000).

II. Rappel sur les Paramécies

II.1. Définition

La paramécie est un micro-organisme unicellulaire du groupe des protozoaires, qui vit dans les eaux douces stagnantes, une seule espèce vit en eau salée, elle se cultive facilement en laboratoire (**Sbartai I, 2013**).

Les représentants du genre *Paramécium* sont parmi les plus fréquentes des Protozoaires. Ils sont très abondants dans les eaux contenant des débris végétaux ou dans les infusions de foin (infusoires) car les bactéries dont ils se nourrissent pullulent à la surface des végétaux en décomposition. Le genre *Paramecium* inclut environ 15 espèces, actuellement enregistrées, mais moins de 10 peuvent être considérés comme *Paramécium* vrai (**Benbouzid H, 2012**).

II.2. Morphologie

C'est une cellule allongée à la forme d'une pantoufle, dont l'extrémité antérieure est arrondie et l'extrémité postérieure effilée. 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 (**Gogendeau, 2005**).

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

Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose. L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique (**Beaumont et Cassier, 1998**).

Le corps est uniformément recouvert de cils, la Paramécie est un **Cilié holotriche**. Au cours de leurs déplacements, dont la vitesse est de l'ordre de 1 à 3 millimètres, les battements des cils assurent le transport des particules alimentaires jusqu'au cytopharynx (la bouche)

situé au fond d'une sorte d'entonnoir. Ce sont des prédateurs qui se nourrissent d'autres micro-organismes, principalement des bactéries (**Beaumont et Cassier, 1998**).

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**).

Le cortex de la paramécie est composée d'unités corticales répétée longitudinalement le long de la surface plusieurs milliers de fois. La rangée longitudinale des unités est appelé cinétie. Le terme cinétosomes est utilisé généralement à la place du "*corps basal*" ou "*granules basaux*". Une seule unité corticale consiste à un cil (attaché à un cinétosome) ; à un système de fibres, notamment les fibres cinétodesmales et enfin un sac parasomal (**Beale et Preer, 2008**).

La paramécie possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires :

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

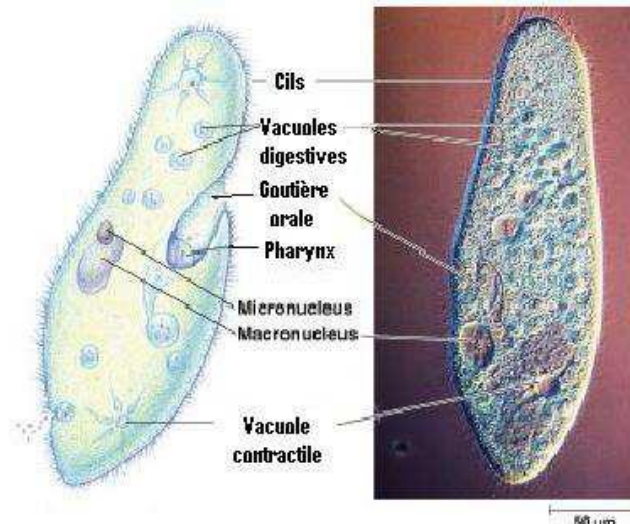


Figure 04 : Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

II.3.Mouvement

Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé, une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle (Cohen, 2007).

II.4.Reproduction

Les paramécies se reproduisent par :

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

II. 5. Alimentation

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

II. 6. 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**).

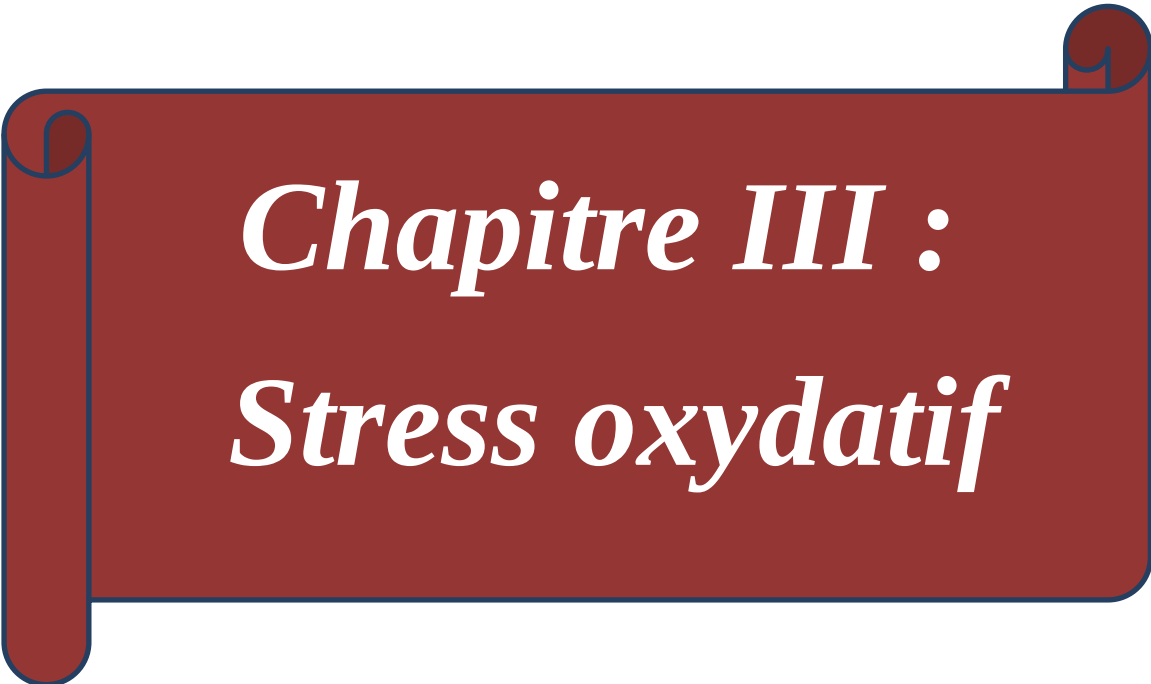
II.7. Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé lors de l'invention du microscope au dix-septième siècle. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille, et la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle d'étude privilégié pour les scientifiques. Depuis 50 ans, une petite communauté de biologistes américains, européens et japonais l'utilise pour l'étude de l'organisation cellulaire et de l'hérédité, en particulier des phénomènes épigénétiques (**Cohen, 2007**).

Des chercheurs du CNRS et du Génomoscope ont réalisé le décryptage du génome somatique de la paramécie et découvert qu'il possède près de 40000 gènes, contre "seulement" 25000 pour l'homme. Ils ont ensuite démontré que ce patrimoine exceptionnel résultait d'au moins trois duplications successives de tout le génome (**Cohen, 2007**).

Les duplications de génome sont des événements rares mais qui se sont produits de

manière récurrente au cours de l'évolution des eucaryotes. Depuis longtemps, on postulait qu'elles pouvaient être à l'origine de transitions évolutives majeures, car le doublement du nombre de gènes offre un large potentiel d'innovation, et donc d'adaptation des espèces (Cohen, 2007).



Chapitre III : *Stress oxydatif*

I. Définition et origine de Stress oxydatif

Le stress oxydant, déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants (**Dominique et al., 2002**). En effet, le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (**Chiali, 2014**).

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions suivant des thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée (**Favier, 2003**).

II. Radicaux libres et système biologique

II.1. Définition et mode de production

Un radical libre se définit comme un atome ou une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non pairé(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) (**Berger, 2006**). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (**Koechlin- Ramonatxo, 2006**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui joue un rôle particulier en physiologie. On distingue :

- **Radicaux primaires** dérivés de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $OH^\bullet$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO) (Chiali F.Z ,2014).
- **Radicaux secondaires**, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Chiali F.Z ,2014).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène singlet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives oxygénées (ERO). La formation des ERO requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme des catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres(Chiali F.Z ,2014).

La production et le métabolisme des ERO apparaissent très compartimentés et indépendants dans les différents compartiments cellulaires mais le transport des ERO d'un compartiment à l'autre est possible lorsque les capacités de neutralisation de ces ERO sont dépassées. Les sources métaboliques produisant les ERO sont nombreuses : chaîne respiratoire mitochondriale, cytochromes P-450, activité de la NADPH oxydase, myéloperoxydase, NO synthase, xanthine oxydase (Afonso *et al.*, 2007).

II.1.1.ERO d'origine mitochondriale

Lors du métabolisme oxydatif, 2 à 5 % de l'oxygène consommé est converti en radical superoxyde. Ceci est dû à des électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire et se fixent directement sur l'oxygène moléculaire (O_2)(Chiali F.Z ,2014).

Le radical superoxyde est peu réactif, il ne traverse pas les membranes cellulaires et il est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène lors de la réaction, catalysée par un des membres de la famille des superoxydes dismutases (SOD)(Chiali F.Z ,2014).

Le peroxyde d'hydrogène est également peu réactif mais il a la capacité de traverser les membranes cellulaires et, en présence de métaux de transition tel que le Fe^{2+} , de se

transformer en un puissant oxydant, le radical hydroxyle, selon la réaction de Fenton (**Ré et al., 2005**).

II.1.2. Autres sources d'EOR

La cessation de la fourniture d'ATP par les mitochondries entraîne une paralysie des pompes calciques (Ca^{2+} ATPase) et autorise une entrée massive de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule qui a comme conséquence l'activation d'une protéase Ca^{2+} dépendante qui assure la conversion de la xanthine déshydrogénase (XD) en xanthine oxydase (XO). Contrairement à la XD, la XO utilise l' O_2 au lieu du FAD ou du NAD^+ comme accepteur d'électrons pour former O_2 et H_2O_2 (**Eschwège, 2005**).

D'autres études montrent que les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent une source majeure d'EOR. Ces enzymes sont exprimées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes de l'adventice et les cellules mésangiales. Leur activité peut être régulée par de multiples facteurs dont l'angiotensine II (**Griendling et al., 2000**), la thrombine, l'acide arachidonique et ses métabolites, des facteurs de croissance, le tumor necrosis factor ($\text{TNF } \alpha$), ainsi que par des forces hémodynamiques (**Dominique et al., 2002**).

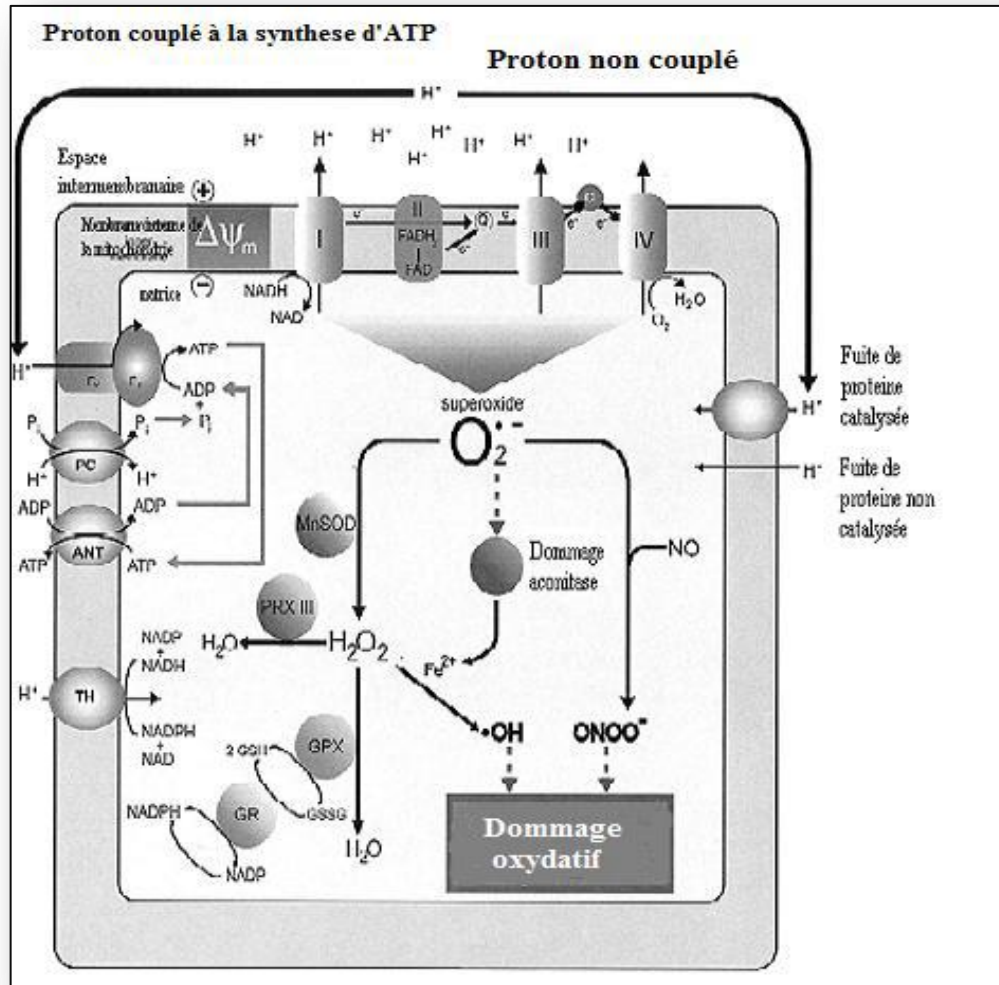


Figure 05 : La mitochondrie est la principale source d'EOR (Ré *et al.*, 2005).

II.2.Fonctions des radicaux libres

Les EOR de par leur réactivité participent à de nombreuses fonctions : phagocytose, bactéricide, signalisation cellulaire (Chiali F.Z, 2014).

Les EOR participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose, et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (Chiali F.Z, 2014).

Les EOR régulent de nombreux facteurs de transcription tels que l'activateur protéine-1 (AP-1) et le heat shock factor-1 (HSF-1) qui activent des gènes dits « protecteurs » pour la cellule (Chiali F.Z, 2014).

En effet, ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou le heat shock protein (HSP) contribuant aux processus de réparation et régénération cellulaire **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**.

En plus, les EOR participent à l'apoptose, qui physiologiquement représente un processus bénéfique qui protège contre le cancer et diverses maladies immunitaires **(Dominique et al., 2002)**.

II.3. Substances oxygénées réactives et leurs mécanismes d'action

Les radicaux libres sont capables d'entraîner des modifications chimiques altérant gravement les structures protéiques, lipidiques, glucidiques ainsi que les nucléotides **(Tessier et Marconnet, 1995)** mais aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxiques et mutagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides **(Favier, 2003)**.

III. Le système antioxydant cellulaire

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques **(Dröge, 2002 ; Packer et al., 1997)**.

La plupart des antioxydants peuvent être divisés en 2 groupes, hydrophobes ou hydrophiles. Les hydrophobes constitués par les vitamines A, E, les flavonoïdes, l'ubiquinol (Coenzyme Q10), la bilirubine, la mélatonine. Les hydrophiles comme les glutathions, l'acide urique, la vitamine C, les thiols, les protéoglycans, l'acide hyaluronique qui protège contre l'oxydation des lipides, des protéines, des sucres, et de l'ADN dans les milieux liquides **(Halliwell, 1991 ; Koolman et al., 1999 ; Browne et al., 2008)**.

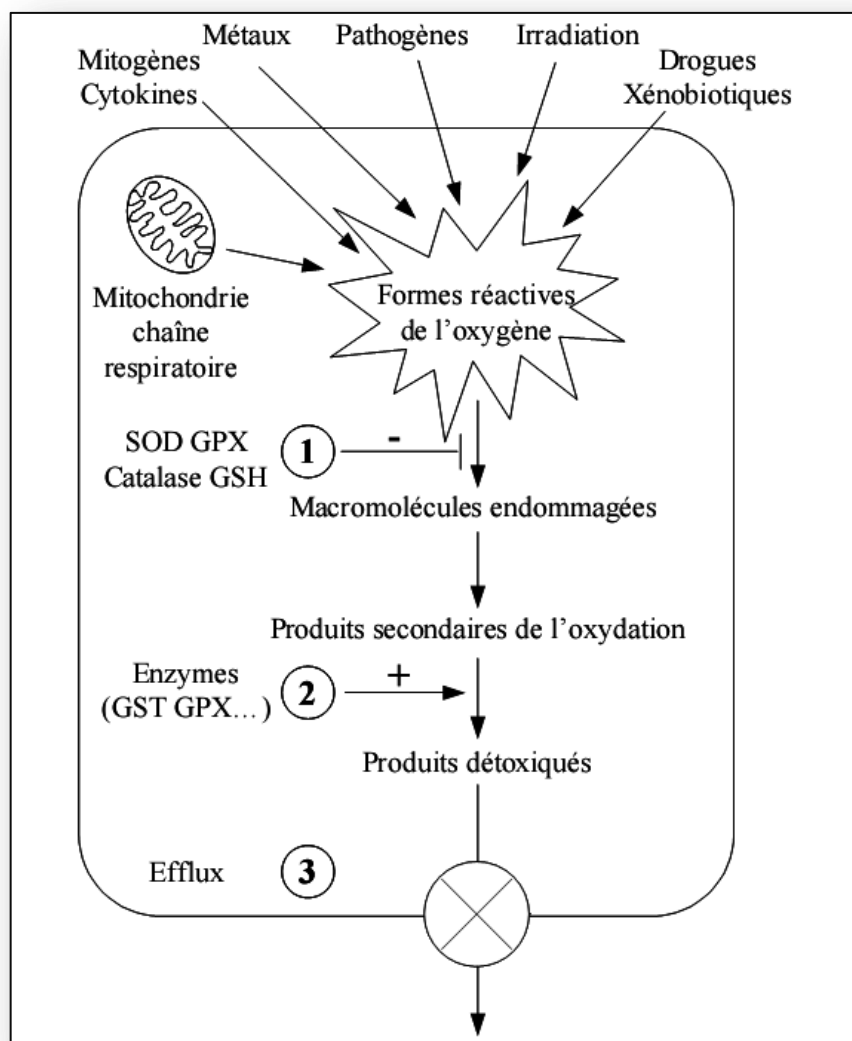


Figure 06 : Les différents niveaux de la défense antioxydant(Hayes et Mc Lellan, 1999).

III.1.Les antioxydants endogènes

III.1.1.Les antioxydants endogènes enzymatiques

Des enzymes comme les superoxydes des dismutases (SOD), les catalases (CAT), les glutathions peroxydases (Gpx), supportés par l'action des enzymes glutathions réductases (GR) et glucose-6-phosphate déshydrogénases, font partie du système de défense contre les ERO.

L'activité des enzymes antioxydants dépend de cofacteurs minéraux, qui sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe), et sont qualifiés

d'antioxydants non enzymatiques indirects (Elosua *et al.*, 2003 ; Morris *et al.*, 2003 ; Lyn Patrick, 2006 ; Bleys *et al.*, 2006).

III.1.2. Antioxydant endogène non enzymatique

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003).

La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxy et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

III.2. Antioxydants exogènes ou nutritionnels

III.2.1. Vitamines

III.2.1.1. Vitamine E

La vitamine E agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol. La vitamine E est liposoluble et a été démontrée comme le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Morris *et al.*, 2003). Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis *et al.*, 2003, Lyn Patrick, 2006).

III.2.1.2. Vitamine A

Le bêta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants, mais ils sont moins connus et abondants (Shils *et al.*, 2006). La vitamine A est responsable de la neutralisation des singulet d'oxygène, d'anion superoxyde, de peroxy-nitrites, de radicaux lipidiques et son action se fait dans les milieux lipidiques.

La vitamine A agit sur les ERO en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (Bleys *et al.*, 2006).

III.2.1.3. Vitamine C

La vitamine C ou acide L'ascorbique est hydrosoluble. Elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman *et al.*, 1999). Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, singulet d'oxygène, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH.

IV. Biomarqueurs de stress oxydant retenus pour notre étude

A la suite d'une étude bibliographique sur les biomarqueurs de stress oxydant, notre choix s'est porté sur le suivi de trois marqueurs de stress oxydant : l'activité de deux enzymes (catalase et glutathion S transférase) et la concentration d'une molécule clé du système antioxydant (le glutathion). Le choix d'une approche multiparamétrique dans le cas de l'étude du stress oxydant a en effet été motivé par le fait que le système cellulaire de défense antioxydant est complexe et régi par de nombreuses interactions entre l'ensemble de ses éléments. La catalase est une enzyme présente chez tous les organismes aérobies. Chez les eucaryotes, elle est principalement située à l'intérieur des peroxysomes (corpuscules cytoplasmiques entourés d'une membrane simple). Ces derniers contiennent également des oxydases, génératrices de peroxyde d'hydrogène. La plupart des CAT sont formées de quatre sous-unités identiques contenant chacune un ion Fe^{3+} situé dans un noyau héminique (Pelmont, 1995).

IV.1. Le glutathion, un antioxydant non enzymatique

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

En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, ce qui témoigne, là encore, de l'importance de la coopération entre les différents systèmes de défense anti radicalaire. Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense anti

radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase. L'étude de ce composé semble donc justifiée (**Pompella et al., 2003**).

IV.2.L'activité catalase

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

V. Les dommages induits par les ROS

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides (**Hulbert et al., 2005 ; Pamplona et al., 2000**), une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN (**Richter et al., 1988**). Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du port de transition de perméabilité (PTP).



Partie II : Etude Expérimentale

Matériel et
METHODES

1. Matériels

1.1. Matériels biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un micro-organisme unicellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.*

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

Règne : *Protista*

Embranchement : *Ciliophora*

Classe : *Oligohymenophora*

Ordre : *Peniculida*

Famille : *Parameciidae*

Genre : *Paramecium*



Figure 07: Structure d'une paramécie.

❖ Justification du choix de *Paramecium sp.* comme modèle biologique

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

- Leur facilité à être cultivé en laboratoires, leur multiplication rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (**Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995**).
- Le taxon est présent, abondant et facilement identifiable (**Marchese et al., 1996**) ;
- Leur mobilité grâce à des cils possédant la même structure que ceux des cellules épithéliales respiratoires des mammifères (**Gräfet al., 1999**),
- Sa distribution géographique est large (**Bennett et al., 1992**) ;
- Leur utilisation comme modèles biologiques dans de nombreuses études toxicologiques : (**Kamola, 1995**) ; **Bernal, 1995** ; **Rouabhi, 2006**).

- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (**Kosmala et al, 1999**) ;
- Son habitat naturel correspond au compartiment aquatique testé (**Taylor et al., 1991**) ;
- Leur utilisation dans le cadre de la lutte contre la pollution des milieux aquatiques puisqu'ils sont considérés comme des bio – indicateurs (**Madoni, 2000 ; Dias et al. , 2003; Nola et al., 2003**).
- Il est sensible au produit testé (**Mc Pherson et al., 2000**) ;
- Il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit et éventuellement sa bioaccumulation (**Chapman, 2001**).

1.2. Matériel chimique

L' xénobiotique utilisés dans notre étude est un fongicide appelé Mancozèbe 80 WP dont la formule brute est : $C_8H_{12}MnN_4S_8Zn$.

La matière active de ce dernier est le Mancozèbe qui appartient à la famille des Dithiocarbamates. Cette substances actives confère à Mancozèbe 80 WP une action préventive multi site permet de réduire considérablement les risques d'attaque fongique sur diverses cultures.

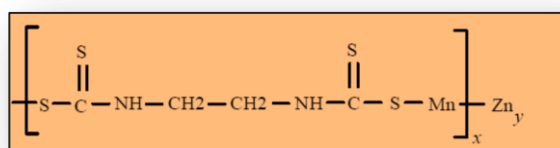


Figure 08 : formule chimique de Mancozèbe 80 WP(Ineris ; 2014)

2. Mode de traitement

On utilise trois concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP (0.4, 0.6 et 0.8) mg/ml mesuré par la balance de précision, les concentrations retenues pour le traitement sont le résultat de plusieurs tests, le suivi de la croissance par la mesure de densité optique des paramécies se poursuit jusqu'au troisième jour (72h), (observation microscopique).

Nous avons réalisée des tests sur des aliquotes de 20ml de culture de paramécie sachant que chaque testes est répété trois fois.

3. Méthodes

La grande diversité des espèces aquatiques et des xénobiotique testé rend difficiles les comparaisons d'une étude à l'autre, ce qui suggère que le suivi de certains paramètres comme la cinétique de croissance et le pourcentage de réponse donnera des informations sur la physiologie de l'organisme à un temps donné.

➤ Objectif du travail

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets du Mancozèbe 80 WP sur un modèle cellulaire alternatif *Paramécium sp.*, d'abord en raison de la forte similitude entre le métabolisme des paramécies et les cellules de mammifères ensuite du fait que ces cellules peuvent rendre compte d'éventuelles altérations du milieu aussi minimales soient-elles.

3.1. Culture des paramécies

Nous avons utilisé la technique de **Beaumont et Cassier (1998)** qui comprend :

3.1.1. Une culture mixte

Nous avons effectué une culture mixte dont la technique est la suivante :

- ❖ Faire macérer ou infuser du foin dans un récipient contenant 1 litre d'eau de pluie.
- ❖ Abandonner l'infusion dans un lieu tiède (15 à 20°C), sombre et bien aéré.
- ❖ Filtrer, quelques jours plus tard (3 à 4 jours) apparaissent les premiers flagellés, ces organismes se nourrissent aux dépens du voile bactérien.

3.1.2. Une culture pure

Afin de suivre pendant plusieurs semaines la croissance d'une paramécie et obtenir un grand nombre de ces protozoaires ciliés il est nécessaire de réaliser des cultures pures (**Wichterman, 1953**).

Nous avons préparé le milieu de culture selon la méthode de **Beisson et al., (2010)**. La méthode consiste à sécher des feuilles de laitue dans un four jusqu'à ce qu'elles soient brunes et fripées. Les réduire en poudre dans un mortier cette poudre peut être conservée indéfiniment dans un récipient hermétiquement clos.

- ❖ Rajouter 1,5 g de cette poudre à 1 litre d'eau distillée, et porter à ébullition pendant 5 min.
- ❖ Filtrer le liquide chaud et le répartir dans des flacons de 250 ml avant de le passer à l'autoclave.
- ❖ Laisser reposer au moins une nuit avant l'ensemencement.

3.2. Paramètres mesurés

3.2.1. Tests de cytotoxicité

3.2.1.1. Cinétique de croissance cellulaire

Le paramètre physiologique étudié est la cinétique de croissance des paramécies qui s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 600 \text{ nm}$ en fonction du temps (**Lavergne, 1986 ; Sauvart et al., 1999**).

La cinétique de croissance pour les différents traitements est suivie en fonction du temps aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

T0 : observation microscopique + DO

T1 : après 24 H : observation microscopique + DO

T2 : après 48 H : observation microscopique + DO

T3 : après 72 H : observation microscopique + DO

La figure (09) illustre le protocole suivi pour les tests de cytotoxicité.

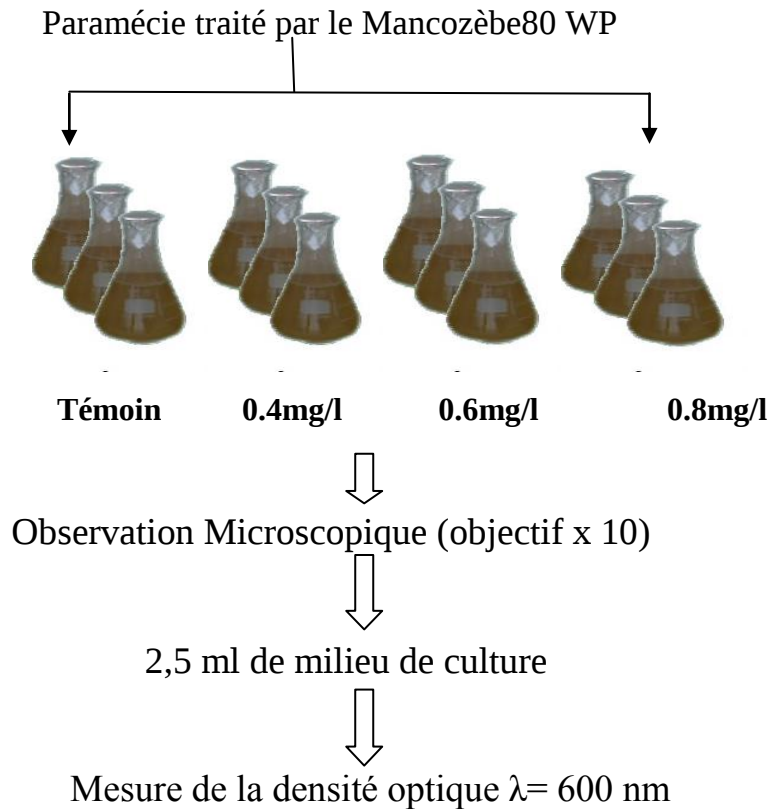


Figure 09: Protocole d'essai de cytotoxicité chez les paramécies

3.2.1.2. Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis du polluant, il est basé sur l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de réponse} = \left[\frac{(\text{NC} - \text{NE})}{\text{NC}} \right] \times 100$$

Où :

NC : nombre des cellules témoins

NE : nombre final 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**).

3.2.2. Paramètres Biochimiques

3.2.2.1. Dosage des principaux métabolites

Le dosage des lipides, protéines et glucides pour les trois traitements ainsi que pour les témoins est réalisé selon le protocole expérimental de (Shibko *et al.*, 1966).

Protocole expérimental

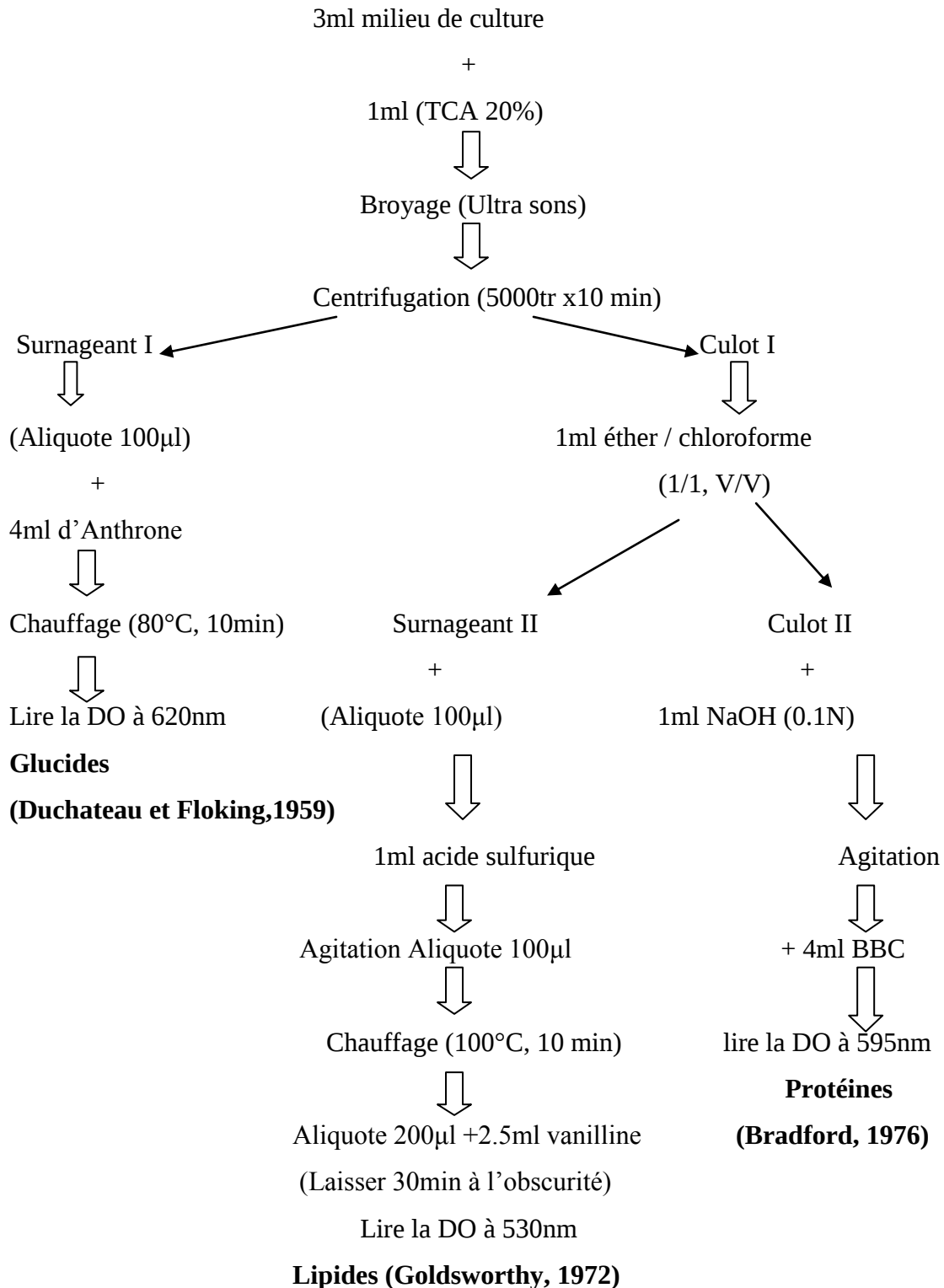


Figure10 : Protocole de dosage des macromolécules biochimiques (Shibko *et al.*, 1966)

3.2.2.2. Dosage des biomarqueurs de stress oxydative

Le devenir des xénobiotique dans les organismes dépend de divers voies métaboliques mises en jeu face à l'agression de ces agents (**vidal, 2000**). En générale les changements engendrés par la présence d'un xénobiotique dans l'organisme sont de deux types : la mobilisation au niveau moléculaire (protection de l'organisme par transformation de contaminant en une forme inoffensive et facile à excréter).

La deuxième variante est l'induction des effets toxiques qui sont dus, soit au xénobiotique lui-même, soit dus aux métabolites produit de la biotransformation de ce contaminant (présente une toxicité plus élevée que la substance d'origine (**van der Oost et al., 2003**)).

➤ Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un stress oxydative potentiel induit par le fongicide Mancozèbe 80 WP sur *paramécium sp.* Et ce à travers le suivi de certains biomarqueurs du stress aux niveaux cellulaires.

Pour cela, nous nous sommes intéressés aux :

- ❖ Le glutathion qui est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le Compartiment intracellulaire (**Pompella et al., 2003**).
- ❖ La catalase qui est une enzyme présente chez tous les organismes aérobies.

3.2.2.2.1. Dosage du glutathion (GSH)

❖ Principe de la méthode :

Le taux du 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-mercaptopurique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobénzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesure a une longueur d'onde de 412 nm.

❖ Protocole expérimental :

-Mettre 3ml de milieu de cultures individuellement (témoins et traités) en présence de 1ml d'EDTA à 0,02M.

-Broyer les échantillons aux ultrasons (Sonifer B-30) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.

- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Passer au vortex et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours/min pendant 5minutes.
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6105, U.V.et Visible).

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

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

1 : Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.

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

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

0,8 : Le volume de l'homogénat.

0,5 : Le volume du surnageant.

Mg : quantité de protéine.

3.2.2.2.2. Dosage de l'activité catalase

❖ Principe de dosage

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

❖ Protocole expérimentale

La mesure de l'activité catalase (CAT) est réalisée suivant la méthode de **Cakmak et Horst (2003)**. C'est une méthode de décroissance de l'absorbance enregistrée pendant deux minutes pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$.

Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl de l'extraitez enzymatique brute, 50 μl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3% et 2850 μl de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extraitez enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. L'activité catalase est calculée par la formule suivante :

$$X (\mu\text{mol} / \text{mn} / \text{mg} \text{ proteine}) = \frac{(\Delta\text{DO} \times 10)}{\epsilon \times L \times 0,05 \text{ mg}}$$

Où **DO** est la densité optique et **0,040** est le coefficient d'extinction de l'eau oxygénée.

X : μmoles de H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines

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



Résultats et Discussions

I. Résultats

I.1. Les tests de cytotoxicité

I.1.1. Courbe de croissance

La courbe de croissance obtenue nous permet d'avoir des données quantitatives, La figure (11) représente l'évolution de la densité optique (DO), en fonction du temps, traduisant ainsi les variations de la croissance cellulaire.

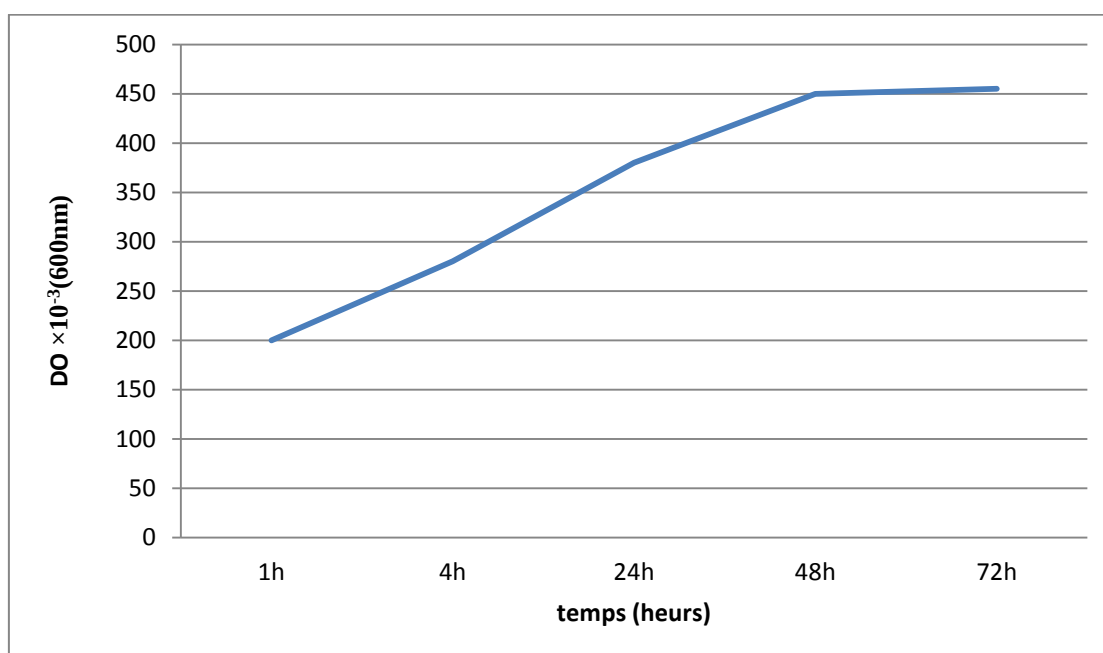


Figure 11 : Cinétique de la croissance des paramécies en fonction du temps.

Nous constatons une croissance normale des paramécies dont la DO est de 0.200 nm à T₁ correspond à phase de latence, puis une phase très rapide qui dure presque 2 jours caractérisée par une augmentation exponentielle de DO pour atteindre à la fin de cette phase une valeur de 0.450 nm, cette phase est suivie par une troisième phase stationnaire dont la DO atteint 0.455 nm où le nombre de cellules demeure constant.

I.1.2. Effet du Mancozèbe 80 WP sur la cinétique de croissance

La figure (12) illustre l'effet du Mancozèbe 80 WP sur l'évolution de la croissance des paramécies. Toutes les mesures ont été effectuées pendant la phase exponentielle de croissance.

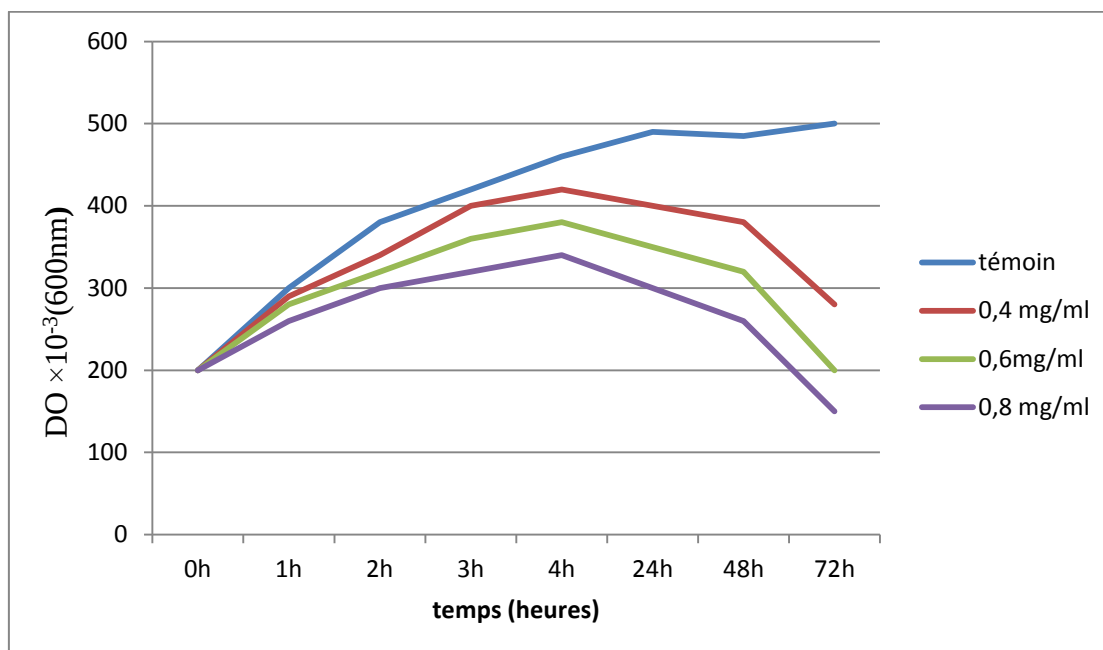


Figure 12 :Cinétique de la croissance des paramécies traitées auMancozèbe 80 WP

On observe que dès la mise en contact du xénobiotique avec les cellules et jusqu' à 1h de traitement le nombre de cellules témoins et traitées évoluent de manière similaire.

Entre 1h à 24h de traitement au mancozèbe 80WP, nous constatons une différence dans l'évolution de la courbe de croissance, une diminution de croissance est remarquable en fonction du temps surtout pour les concentrations 0.6 mg/ml et 0.8 mg/ml.

Au-delà 24h de traitement, cette diminution est bien confirmé, pour le nombre de cellules traité par les concentrations 0.6 mg/ml et 0.8 mg/ml, après 48h de traitement la croissance subit une inhibition totale. Alors que pour la concentration0.4 mg/ml la diminution de nombre des cellules n'est observée qu'après 48h.

I.1.3.Effet de du Mancozèbe 80 WP sur le pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse (**Wong et al., 1999**) est un paramètre permettant d'évaluer l'effet du pesticide aux différentes concentrations et confirme les résultats obtenus concernant la cinétique de croissance du microorganisme étudié.

La figure (13) montre que le pourcentage de réponse des paramécies est dose dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes: il est de : 24% à 0.4 mg/ml ,60% à0.6 mg/ml et de 70% à 0.8 mg/ml où plus de la moitié de la population est inhibée par cette dose.

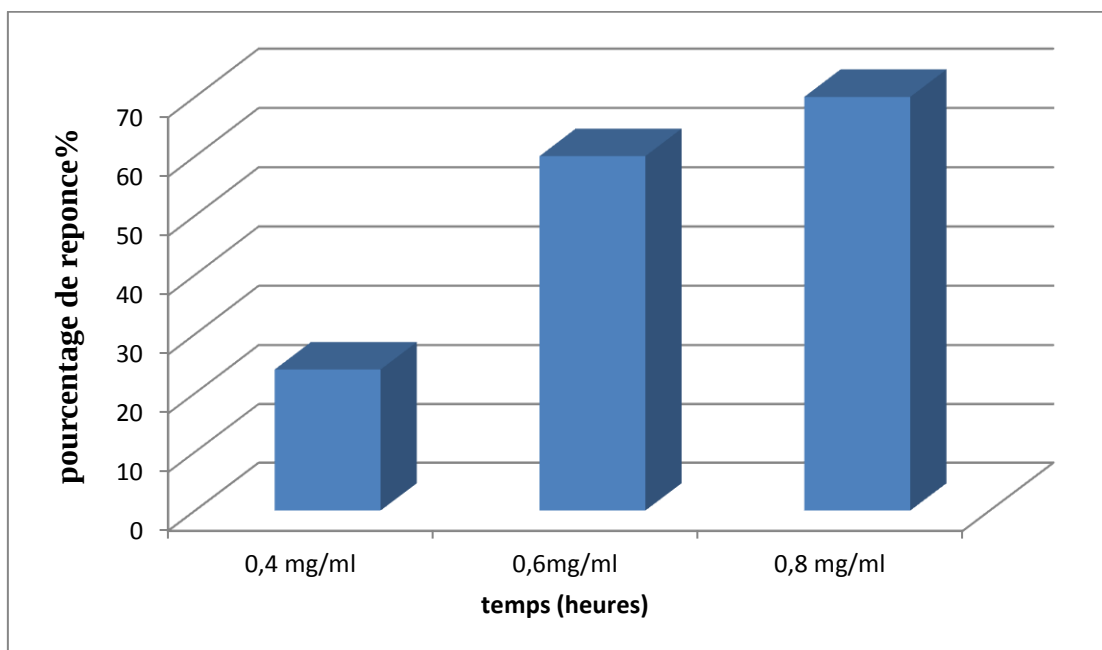


Figure 13: Pourcentage de réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP

I.2. Evolution des paramètres biochimiques

I.2.1. Effet du Mancozèbe 80 WP sur les principaux métabolites

I.2.1.1. Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des protéines

Afin de suivre les différentes activités enzymatiques impliquées dans la métabolisation et/ou la détoxification du xénobiotique, nous avons procédé en premier lieu à l'évaluation du taux de protéines totale. La figure (14) représente l'évolution du taux de protéines en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP.

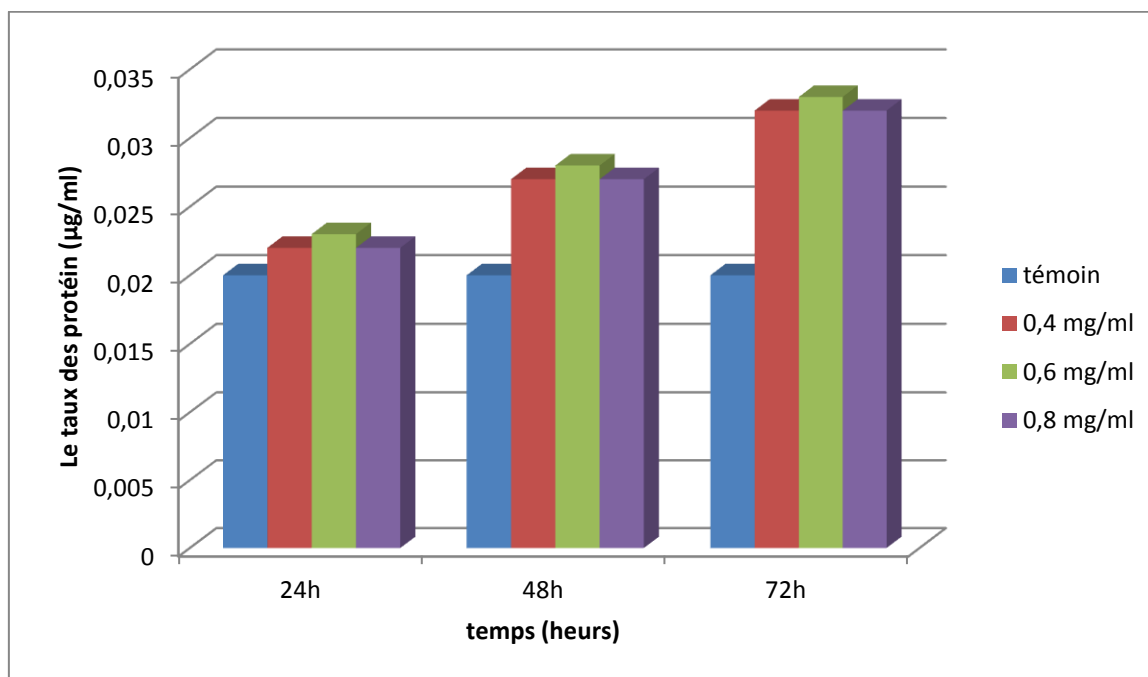


Figure 14 : Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des protéines

Nous remarquons que les taux de protéines totales augmente d'une manière très remarquable durant le traitement, nous constatant aussi que cette augmentation est dose dépendante.

I.2.1.2. Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des lipides

La figure (15) représente l'évolution du taux de lipides en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP.

Nous constatons une diminution de taux des lipides à partir de 24h de traitement en comparaison au témoin, sachant que nous avons observé que cette diminution est dose dépendante.

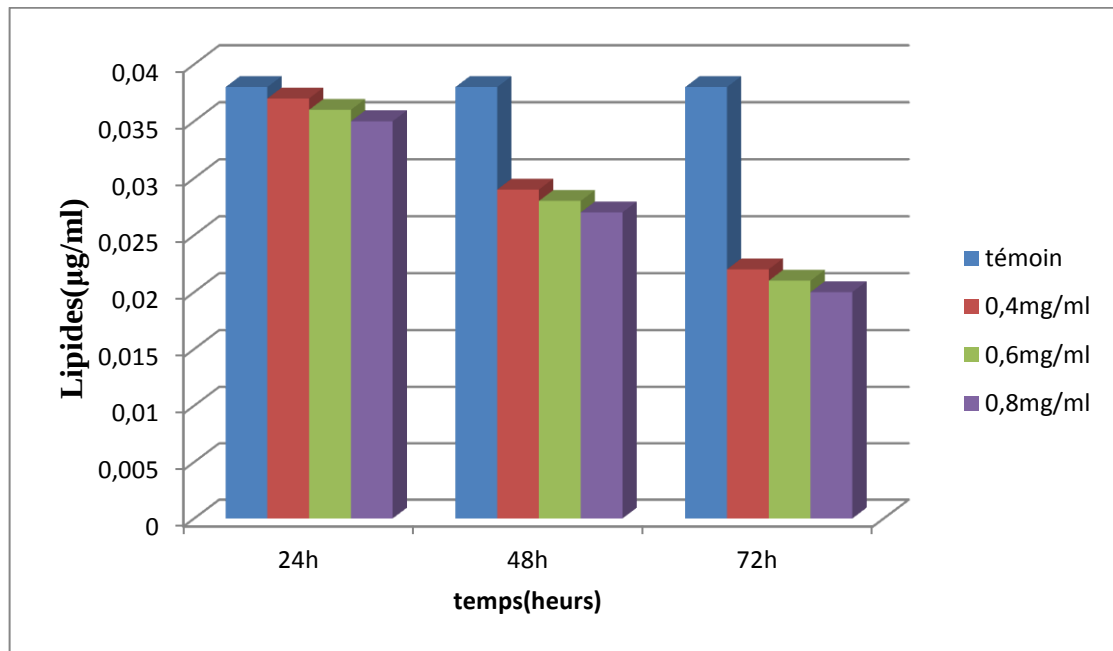


Figure 15 :Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des lipides

I.2.1.3.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des glucides

La figure (16) représente l'évolution du taux de glucides en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP.

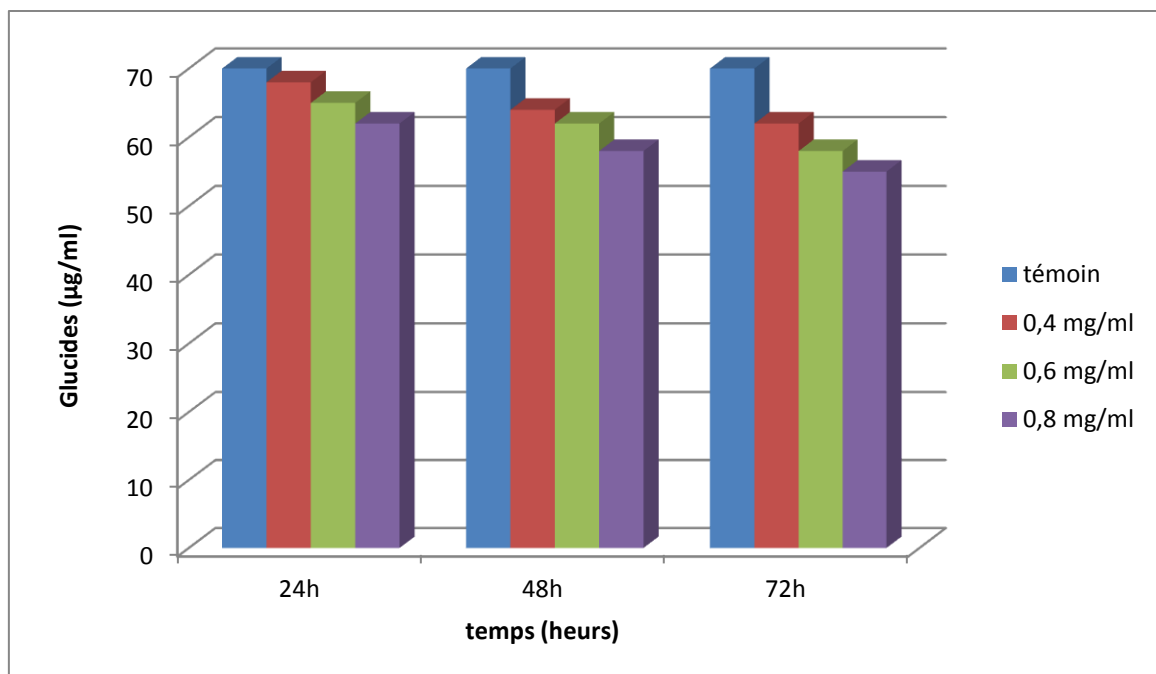


Figure 16 : Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux des glucides.

Nous avons enregistré une déplétion des glucides très remarquable surtout pour les fortes concentrations (0.6 et 0.8 mg/ml) de xénobiotique qui diminue de manière très importante surtout pour la dose 0.8 mg/ml qui atteint 55ug/ml.

I.2.2. Effets du Mancozèbe 80 WP sur l'évolution des biomarqueurs

I.2.2.1. Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de GSH

La figure (17) représente l'évolution de taux de GSH en fonction de temps en présence des concentrations croissantes de Mancozèbe 80 WP

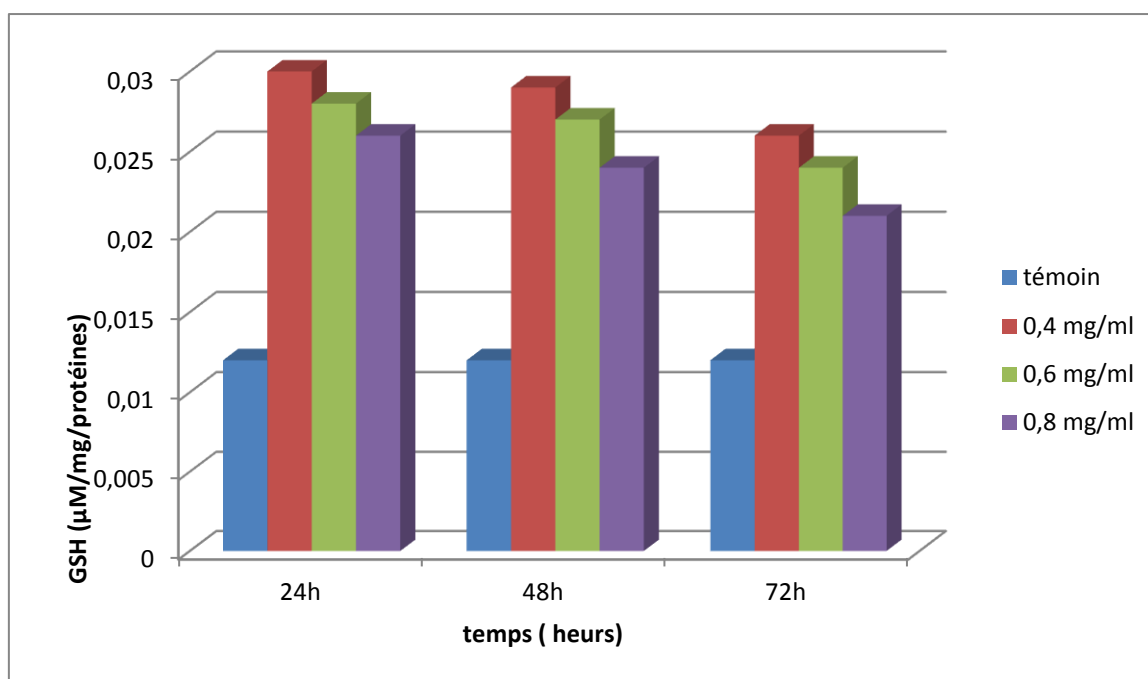


Figure 17 : Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de GSH

Nous remarquons une diminution du taux de GSH après traitement par différents concentrations de Mancozèbe 80 WP.

Cette diminution est très remarquable après 48h de traitements qui est de manière dose-dépendante.

I.2.2.2.Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de l'activité catalase

Les résultats obtenus de l'activité Catalase en fonction du temps et des différentes concentrations de Mancozèbe 80 WP sont représentés sur la figure (18).

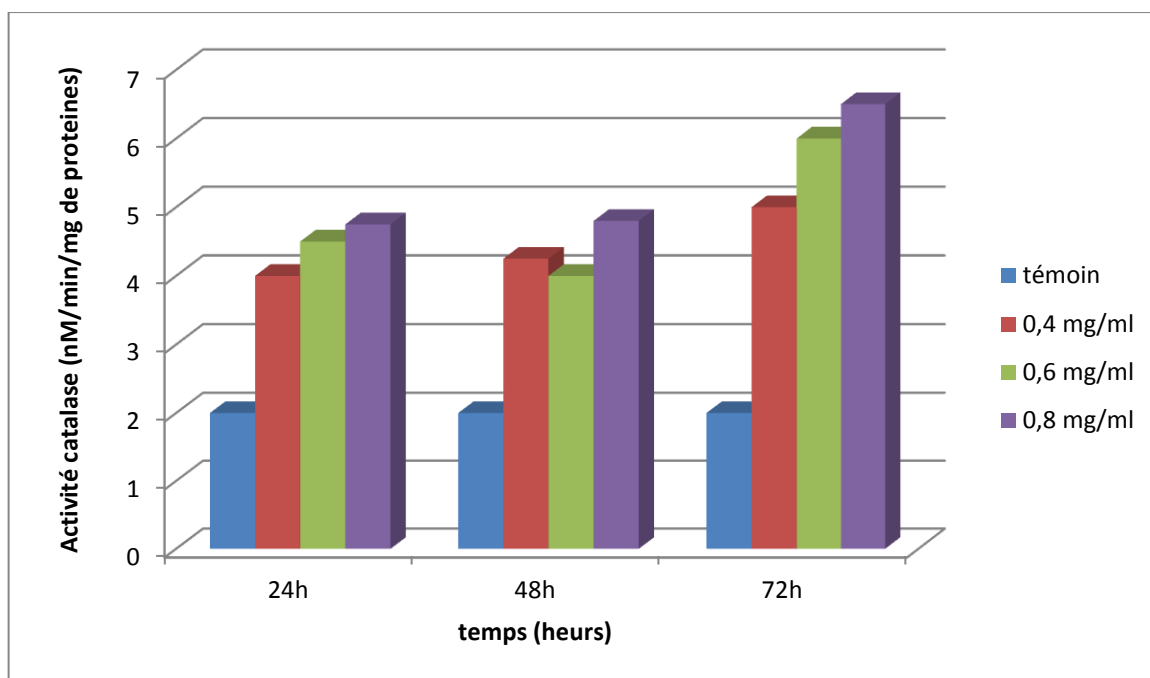


Figure 18 : Effet de Mancozèbe 80 WP sur le taux de l'activité catalase

Nos résultats montrent que cette activité augmente de façon progressive selon la dose et le temps d'exposition donc elle est dose dépendante. Cette augmentation est particulièrement observée chez les paramécies traitées avec les plus fortes concentrations de Mancozèbe 80 WP 0.6 et 0.8mg/ml et ce par rapport au témoin après 72h de traitement, alors chez les témoins, l'activité catalase ne subit aucune variation et reste constante.

II. Discussions

Le rythme de la courbe de croissance dans le modèle établi par nos expériences est comparable à celui des bactéries décrites par **Prescott et al., (2003)**. Les étapes de la courbe de croissance sont les mêmes dans les deux types d'organismes malgré que la croissance bactérienne est plus forte et plus rapide que celle des paramécies de point de vue nombre, vitesse et le temps de génération (**Dreidt et al., 1994 ; Prescott et al., 2003**).

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

Après le traitement par le Mancozèbe 80 WP nos résultats montre que quel que soit la concentration de xénobiotique, la croissance est inhibée en fin de traitement (72h). La toxicité se manifeste en premier lieu par une importante diminution du nombre de cellules qui est dose dépendant en fonction du temps d'exposition et ce dès le début du traitement.

Ceci nous amène à confirmer l'influx du Mancozèbe 80 WP à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la paroi cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive de xénobiotique mais qui reste néanmoins perméable (**Beaumont et Cassier, 1998**). Ces résultats sont en accord avec ceux **d'Einicker-Lamaset al.,(2002)** qui a étudié la toxicité du Zinc et du Cuivre sur *Euglena gracilis* (algue chlorophyllienne flagellée) ; **Cleuvers,(2003)** qui a montré que l'Ibuprofène inhibe la croissance de *Desmodesmus subspicatus* à la concentration de 315 mg/L et immobilise les *Daphnia magna* à 108 mg/L et **Benbouzid (2012)**.

Nos résultats sont en accord aussi avec ceux de **Sbartai et al., (2009)** qui ont testé l'effet du Bifenazate et de l'indoxacarbe (pesticides) et qui ont mis en évidence l'importance du facteur -croissance des paramécies- en toxicologie cellulaire et ceux de **Bouaricha et al., (2013)** qui ont étudié la toxicité du Proclaim (biopesticide) sur les paramécies.

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 différentes concentrations des xénobiotiques utilisés.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par **Redouen-salah (2004)** qui a rapporté l'effet inhibiteur de rejets métalliques sur une algue unicellulaire (*Tetraselmis suecica*) et où le pourcentage de réponse est dose – dépendant. De plus, nos résultats rejoignent ceux de **Sbartai (2005)** qui confirme cet effet dose –dépendant chez des paramécies traitées au Cadmium. **Sbartai et al., (2009)** rapportent de mêmes résultats.

Nous avons constaté que l'addition de Mancozèbe au milieu induisant une augmentation du taux des protéines totales, cette augmentation est toujours dose dépendant.

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

Les protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, sous l'action des radicaux libres oxygénés (**Stadtman ,1990 ; 1993**). Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (**Bonnefont, Rousselot et al., 2001**) tous les acides aminés peuvent être oxydés : ainsi la méthionine peut se transformer en méthionine sulfoxyde et la tyrosine en nitrotyrosine. Les protéines constituées de ces acides aminés oxydés peuvent l'être de façon irréversible ou non. En effet dans le cas de l'oxydation des méthionines, celle-ci peuvent être régénérées par des enzymes méthionines sulfoxyde réductase.

L'attaque des radicaux sur les fonctions thiol(SH) des cystéines conduit à la formation de pontes disulfure (S-S) modifiant la structure de la protéine. Ces modifications peuvent conduire à la perte de la fonction de l'activité de la protéine (**Deanet al., 1997**) et il en résulte que les protéines modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées par le protéasome.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Peccini et al., (1994) ; Masaya et al., (2002)** qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins), Ainsi ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Benbouzid (2012)** et **Boulassel (2014)** qui ont respectivement mis en évidence une

stimulation de taux des protéines totales chez les *Paramécium sp* en présence des agents thérapeutique de synthèse et des AINS.

L'évolution du taux de lipides suggère une altération de la membrane cellulaire sachant que cette dernière est composée de 50% de lipides (phospholipides) et que le pesticide agit sur les protistes dès la mise en contact. Ce résultat a été confirmé par celui de **Grara (2011)** qui a rapporté la diminution du taux de lipide en fonction des concentrations croissantes de cadmium. Selon **Aurousseau (2002)**, les radicaux oxygénés libres sont toxiques via la dégradation des lipides dont la β oxydation, comme le suggèrent les travaux de **Padjama et Rao, (1994)** qui ont mis en évidence une diminution des taux de lipides dans les tissus de *Bellamya dissimilis* exposés à des pesticides, la forte solubilité du xénobiotique est à l'origine de cette atteinte des lipides.

Les résultats qui nous avons trouvé sont en accord avec ceux de **Benbouzid(2012)**,ce qui confirme la toxicité de l'xénobiotique testés particulièrement aux plus fortes concentrations que les faibles concentrations.

Nous avons également mis en évidence une déplétion du taux des sucres totaux en présence de Mancozèbe 80 WP. ce qui en accord avec les travaux de **Cherait(2015)** qui a étudié l'effet d'un Nifedipine sur *Saccharomyces cerevisiae*, et (**Boulassel et al., 2013**) qui étudie l'effet du Paracétamol sur *Paramicium tetraurelia* cette diminution du taux des sucres peut être expliquée par l'activation de l'AMPK qui va stimuler les vois cataboliques et inhiber les vois anaboliques (**Foretz et al., 2006**) mais aussi par leur hydrolyse afin de produire certains molécules clés dans la défense antioxydant cellulaire telle que NADPH.

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

Dans notre travaille nous avons obtenu une diminution du taux de GSH pour les échantillons traité par le Paracétamol en fonction du temps. Le glutathion se trouve dans le cytosol en concentration élevée, le reste étant localisé dans les mitochondries, le noyau et

les peroxyosomes (Lu, 2000). Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion a un rôle très important dans le maintien de l'état réduit de la cellule (Yu, 1994). Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque oxydatif (Drögue, 2002). En effet, le GSH élimine les xénobiotiques comme les pesticides par conjugaison. Ce processus peut faire intervenir la glutathion-S-transférase (Renneberg, 1982, Noctor *et al.*, 2002).

La réduction du taux de GSH peut être expliquée par les réactions de réduction des espèces activées de l'oxygène et des lipides hydroperoxydés catalysées par les glutathion peroxydases et par l'utilisation massive de ce dernier par la GST dans les réactions de conjugaison. Bien que certains intermédiaires réactifs se conjuguent spontanément au GSH, la majeure partie de ces réactions est catalysée par la GST. De ce fait, la structure des conjugués est dépendante de la régio-sélectivité des GST impliquées dans la formation de ces composés (Evans *et al.*, 2004 ; Hayes *et al.*, 2005). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Habig *et al.*, (1974) ; Regoli *et al.*, (1998) ; Canesi *et al.*, (1999) ; Ringwood *et al.*, (1999) ; Brigelius-Flohe, (1999) ; Roche *et al.* (2003). La diminution du taux de GSH, est due au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds (Dickinson et Forman 2002 ; Viarengo et Nott, 1993 ; Viarengo, 1994).

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Azzouz (2012), qui a étudié la toxicité d'un insecticide sur *paramecium tetraurelia*, et de Benbouzid *et al.*, (2012), qui ont testé des phosphoramidate sur *paramecium aurelia* aussi avec ceux de Bouaricha *et al.*, (2013).

Parmi les enzymes impliquées dans les systèmes de détoxification, la catalase occupe une place de choix. En effet cette enzyme apparaît dans les premières lignes de défense contre les radicaux libres.

Nous avons ainsi constaté, une augmentation de l'activité CAT après l'exposition pour la molécule Mancozèbe 80 WP. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Wenning *et al.* (1988), car la catalase est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide à la contamination par les xénobiotiques. En effet, l'activité catalase consiste en une transformation du peroxyde d'oxygène (H₂O₂) en eau et en oxygène moléculaire (O₂). Or la production de H₂O₂ est induite par la présence de composés

exogènes à l'organisme comme notamment nos xénobiotiques de synthèses (**Brown et al., 2004**), ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, Lipides et protéines) (**Vlahogianni et al., 2007**).



Conclusion et Perspectives

Conclusion

La problématique initiale de ce travail était l'étude des réponses physiologiques et comportementales de *Paramécium sp* vis-à-vis d'un fongicide de la famille des dithiocarbamates, est un fongicides de contact composé d'une matière active (Mancozèbe) commercialisée sous le nom Mancozèbe 80 WP.

Les paramécies ont été utilisés dans le passé pour l'évaluation rapide de la toxicité des pesticides (**Kamola, 1992; Juchelka et Snell, 1995; Rouabhi et al., 2006; Rao et al., 2007**).

Pour ce faire, nous avons essayé d'optimiser la croissance de *Paramécie sp* en maîtrisant les conditions physicochimiques du milieu de culture. Nos résultats ont montré que cette espèce de protozoaires suit, dans des conditions bien précises, une courbe avec quatre étapes (latence, exponentielle, constance et déclin). L'allure de cette courbe peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la température, la composition du milieu de culture...etc.

Le traitement par le Mancozèbe a été effectué après la réalisation d'un modèle de croissance à 28°C. L'impact de l'xénobiotique utilisée sur la croissance est très remarquable, particulièrement aux concentrations les plus élevées qui peut aller jusqu'à la mort des cellules.

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire et le pourcentage de réponse. Plusieurs biomarqueurs ont été évalués aussi. Chez la paramécie, nous avons mesuré la concentration en glutathion réduit (GSH), en protéines, en glucides et en lipides, ainsi que l'activité enzymatiques catalase (CAT).

A l'issue de ce travail nous pouvons conclure que les paramécies occupent une place de choix vue son cycle de vie court, sa multiplication rapide et son comportement et sa culture simple et facile au laboratoire. et que L'hypothèse la plus plausible que nous pouvons avancer, est que l'xénobiotique testé induit la formation de « **radicaux libres** » conséquence logique d'un stress chimique cellulaire.

Perspectives

En perspectives, il serait intéressant :

- D'élargir les tests de cytotoxicité sur des cellules animales en culture ;
- D'entamer une recherche pluridisciplinaire en impliquant des chimistes, afin d'étudier la toxicité des produits de dégradations des pesticides testés sur l'environnement aquatique.
- D'étudier la respiration à partir de mitochondries isolées des paramécies.
- D'Analyser de manière fonctionnelle les entités moléculaires induites par le stress chimique et, identifier et caractériser les gènes impliqués dans les processus mis en jeu dans la signalisation des stress chimiques et/ou dans la régulation de la réponse cellulaire ;
- D'étudier le devenir de ces toxiques, leurs différentes formes de stockage (spéciation), afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la concentration et de la biotransformation de ces éléments au niveau cellulaire.

*Références
Bibliographique*

A

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

Afonso Valéry, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, Abderrahim Lomri (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74 .636–643.

Aurousseau B. ; 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux: Conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim*, 15(1), 67-82.

Azzouz, z., 2012 : Etude des effets toxiques d'un fongicide (AmistarXtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Doctorat de l'université d'Annaba. 141, p 114.

B

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

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

Beale, G.H., Preer, J.R., 2008: *Paramecium*: genetics and epigenetics. 1st edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton. 191p.

Beaumont et Cassier ; 1998 . Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3ème édition DUNOD, pp : 123-143.

Beisson, J., Betermier, M., Bre´ M., Cohen J., Duharcourt, S., Duret, L., Kung, C., Malinsky, S., Meyer, E., Preer, J.R. et al.; 2010: *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010, pdb.emo140.

Benbouzib, H., 2012 : Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricides sur des protistes ciliés. thèse de doctorat de l'université d'Annaba. p 87.

Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M. Djebar M.R. (2012). Toxic effects of

phosphoramidate on *Paramecium* sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicol. Environ. Chem.* 94(3): 557-565.

Bennett, J., and Cubbage, J.; 1992: Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater

Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. Of Ecology, Olympia, WA. 29pp.

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

Bernal J., Ruvalacaba .S. ,1995. Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. *Toxicology* 108 ,165-173.

Bleys, J., Miller, ER., Pastor-Barriuso, R., Appel, LJ., and Guallar, E. ; 2006 :

Vitamin mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition.* 84(4):880-887.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Beaudeau, JL., Peynet, J., Legrand, A., Dellattre, J: Aging and oxidative stress . Which potential markers ? *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2001, 59(4) :453-9.

Bordjiba O, Ketif A (2009). Effet de Trois Pesticides (Hexaconazole, Bromuconazole et Fluazifop-p-butyl) sur quelques Métabolites Physio-Biochimiques du Blé dur : *Triticum durum*. *Desf. European Journal of Scientific Research* ISSN. pp.260-268.

Boscolo, R., and Roychowdhury, V. P.; 2003: On the Uniqueness of the Minimum of the Information-Theoretic Cost Function for the Separation of Mixtures of Nearly Gaussian Signals". In *Proceedings of the 4th International Symposium on Independent Component Analysis and Blind Signal Separation (ICA2003)*, 137--141, Nara, Japan.

Bouaricha, H., Berrebbah, H., GRARA, N., DJEBAR M.R. 2013. Response of *paramecium* sp. with respect to an insecticide (Proclaim): growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(8): 4172- 4180.

Boulassel, A., Djabar., M.R., Roubhi R., Djabar, H., 2013: Physiological and biochemical changes observed in alternative cell model : *paramusium tetraurelia* treated with paracetamol. *International Journal of Biosciences*, 9, 1-10.

Boulassel, A., 2014: Evaluation de la toxicité de deux médicaments : le Paracétamol et l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire : *Paramecium tetraurelia*. Essai à l'échelle subcellulaire.

Boveris A, Oshino N, and Chance B., 1972.The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617- 630,

Bradford, M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72:248- 54. [développement initial de la méthode au bleu de Coomassie].

Brigeius-Flohe, R., 1999: Tissus-specific function of individual glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 951-965.

Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D.J., Svendsen C., Hankard P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphère*, 57, 1675-1681.

Browne, RW., Bloom, MS., Schisterman, EF., Hovey, K., Trevisan, M., Wu, C., Liu, A., Wactawski-Wende, J., 2008: Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*. 13(2):160-83.

C

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999 :Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46:67-76.

Camard JP (2010). Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé. P11.

Calvet R. (2005). Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole Editions. p. 637.

Carisse D(2013). Comment bien utiliser ses fongicides – systémiques, transaminaires et cie –dans l'oignon. Agriculture et agroalimentaire, Canada. P2.

Cavalier Smith T. and Chao E.E.Y.; 2003: Phylogeny and classification of phylum Cercozoa(Protozoa). *Protist*154: 341-58.

Chapman P.M.; 2001: Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* 463, 149–169.

Cleuvers, M., 2003: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142: 185-194.

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.

Charbonnel J (2003). Contribution de l'atmosphère à l'exposition aux pesticides par la consommation de produits de jardin. École national de la santé publique.P2.

Cherai., 2015: Evaluation à échel cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un compose de la famille des dihydropyridine sur un modèleexperimentalbioindicateur de stress.

CudmoreLarison, David & Charles, Newton Abbot; 1977. The Center of Life, A Natural History of the Cell.

D

Dean, RT.,Fu, S., Stocker, R.,Davies, MJ.,Biochimstry and pathologyeofradicalmediatedprotein oxydation .*Biochem.J.*,1997,324 :1-18.

Dias N. ; Mortara R.A. ; Lima N. ; 2003 .Morphological and physiological changes in Tetrahymenapyriformis for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. Toxicology in vitro : 1- 9.

Dickinson, D, A., Forman, H, J.; 2002: Cellular glutathione and thiols metabolismBiochemical pharmacology, **64**, 1019-26.

Dominique BR, Peynet J, Beaudoux JL, Thérond P, Legrand A, Delattre J (2002). Stressoxydant, fonctionsvasculairesetathérosclérose Oxidative stress, vascular function andatherosclerosis. Nutrition clinique et métabolisme16 : 260–267.

Dreidt, F., Romick, T.L., Fleming ,H.P., 1994:A rapid method for the determination of bacterial growth kinetics. *J. Rap. Meth.Autom.Microbiol.* 3: 59-68.

Droge, W., 2002:Free radicals in the physiological control of cell function. *PhysiolRev*82, 47-95.

Duchateau G. et Florkin M.; 1959. Cent manipulations biochimiques simples. Edition Masson.

E

ECH: Europeancommission health (2006).Consumer protection directorate-general,Chemicals, contaminants and pesticides, Metribuzin. SANCO/10051/2006 – Rev. 1.1 November.

ECH: Europeancommission health (2009). Consumer protection directorate-general, Chemicals, contaminants and pesticides, Mancozèbe. SANCO/4058/2001–Rev. 4.4 July.

Einicker-Lamas M., Mezian G.A., Fernandes T.B., Silva F.L.S., Miranda K., Attia M. and Oliveira M.M.; 2002: *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environment Pollution*, 120: 779-786.

Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, JL., Covas MI., Ordóñez-Llanos, J., Marrugat, J. ; 2003 : Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis*. 167(2):327-334.

Eschwège. P (2005). Quelles sont les informations fournies par la transplantation rénale sur la protection rénale ?. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24 : 182–193.

Evans, D.C. Watt, A.P., Nicoll-Griffith, D.A., Baillie, T.A., 2004 : Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 3-16.

Favier A (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. p 108 – 115.

FAO. 1993. Pesticide Residues in Food 1993. Report. FAO Plant Production and Protection Paper n° 122, Rome. p.151.

Foretz, M., Taleux, N., GUIGAZ, B., Houman, S., Beauloye, C., et al., 2006: Regulation du métabolisme énergétique par l'AMPK, une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. (*medicine/science*) M/S, 4(22), 381-388.

G

Génoscope; 2007: Centre National de Séquençage. France.

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.

Goldsworthy, G.J.; Mordue, W. and Guthkelch, J.; 1972: Studies on insect adipokinetichormones. *Gen. Comp.Endocrinol.* **18**: 545-551.

Gräf F. and Stahr K.; 1999.A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER).In: Atlas of Benin and Niger.

Grara,N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluantsindustriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode*Helixaspersa*): Cas des métaux. Thèse de doctorat de l'Uniba.120, p.91.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M (2000).Modulation of protein kinaseactivity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology andpathophysiology.*ArteriosclerThrombVasc Biol.* **20**: 2175–2183.

H

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974 :Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.*J. Biol. Chem.* **249**:7130-7139.

Halliwell, B. ; 1991 : Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine.***91**:14– 22.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005 :Glutathiontrasferase. *Ann. Rev. Pharmacol.Toxicol.* **45**: 51-88.

Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* Oct; **31**(4):273–300

Hulbert, A.J.; 2005: On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J TheorBiol***234**, 277-288.

I

INRA – Cemagref : Institut Nationale de la Recherche Agronomique- Centre nationaldu Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (2005) Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapports INRA.

Inrs., 2010. Fiche toxicologique FT 277 Mancozèbe. Services techniques et médicaux de l'institut national de recherche et de sécurité. Agence française de sécurité des aliments p8.

Inrs., 2014. Fiche toxicologique FT 277 Mancozèbe. Services techniques et médicaux de l'institut national de recherche et de sécurité. Agence française de sécurité des aliments

J

Jamet P., (1994). The COST action 66: "fate of pesticides in the soil and the environment". Proceeding of the 5th international workshop on environment behaviour of pesticides and regulatory aspects.*European study Services*. pp. 35-42.

Jean J. G., Philippe L. 2005. Pesticides, agriculture et environnement l'utilisation des pesticides et en limiter réduire les impacts environnementaux Décembre: p14-15.

Juchelka C.M., Snell T.W. ,1995. Rapid toxicity assessment using ingestion rate of Cladocerans and Ciliates.*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28: 508-512.

K

Kamola Z., 1992. Toxicity of Fastac 10 EC, a pyrethroid insecticide to *Paramecium primaurelia* and *Tubifex* sp. *Folia Biol (Krakow)*. 40(3-4): 109-112.

Kamola Z., 1995. Notes on the Use of Invertebrates, especially Ciliates, in Studies on Pollution and Toxicity. *Folia biologica (Krakow)*, vol 43, No 1-2.

Koechlin-Ramonatxo C (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165–177.

Koolman, J., Rohm, KH. ; 1999 : Atlas de Poche de Biochimie. Flammarion:Paris.

Kosmala, A.; Charvet, S.; Roger, M.C. and Faessel, B.; 1999: Impact assessment of a wastewater treatment plant effluents using in stream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Res.*, **33**(1), 266-278.

L

Lavergne M.; 1985. Etude des effets du Diapézan et du Médazépan sur un protiste cilié. M&moire de D.E.A. de l'université de Paris VII, pp : 46.

Loper B.C, Gomez A.S, Rey G.M, Cancho G B, Simal G.J., 2005. Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water, analytical and biomalytical chemistry. vol 383(4): p 557-561.

Lyn Patrick ND. ; 2006: Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. Altern Med Rev. 11(2):114-127.

Lu, S.C., 2000 : Regulation of glutathione synthesis. In Current topics in Cellular Regulation, Vol. 36. Academic Press Inc. San Diego, pp. 95-116.

M

Madoni P. (2000). The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Poll.* 109: 53-59.

Marchese, M.R., & Brinkhurst, R.O.; 1996: A comparison of two tubificidoligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334: 163-168.

Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. ; 2003 : Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr.* 22(2):147-156.

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

McPherson, CA., Chapman, PM.; 2000: Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40:656-665.

Morris, CD., Carson, S. ; 2003 : Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 139:56–70.

Müller, O.F. , 1773 : *Vermium terrestrium et fluviatilium Historia*. 2 vols. in-4.

Multigner L., 2005. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, risques santé.* 4: p187-194.

N

Neuzil, J., Stocker, R., 1993: Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*. 331: 281-284.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002 :Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53(372): 1283-304.

Nola M., Njiné T., Foto S.M. , Kemka N. , Zébazé S.H. , Nguedji J.B.T. &Bouetou T.B., 2003 . Utilisation des protozoaires ciliés (*Parameciumafricanum*, *Colpidiumuncinatum*, *Neobursaridium gigas*) pour l'épuration bactériologique des eaux polluées en microcosme. *TROPICULTURA*, 21, 2, 73-78.

Nzengue Y. ; 2008 : Comparaison des mécanismes de toxicité redox du Cadmium , du cuivre et du zinc : place des métallo thionines et de P53. Thèse de doctorat, Université JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1, France .299 p.

O

OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development (2001).Guidancedocument on Acute Oral toxicity.Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment.N : 24.

P

Packer, L., Tritschler, HJ., and Wessel, K., 1997: Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free RadicBiol Med* 22, 359-378.

Padjama M.B., Rao; 1994.Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen and protein content in tissues of the freshwater snail, *Bellamyadissimillis* (Muller), *bull.environ. contam. toxicol*, 53, 142-148.

Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz ,C., Gredilla, R., Herrero, A., and Barja, G., 2000: Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlatewith maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev*112, 169-183.

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

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

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.

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

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., Dusart J. 2003: Microbiologie. Édité. De Boeck Université, 1164 p.

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

Purves, W.K. ; Orians, G.H. ; Heller, H.G. et Sadava, D.; 2000: Le monde du vivant, 2ème Édition Flammarion, pp : 552-577.

R

Rao V.J., Arepalli S.K. ,Gunda V.G. , BharatKumaret J., 2008. Assessment of cytoskeletal damage in *Paramecium caudatum*: An early warning system for apoptotic studies. Pesticide Biochemistry and Physiology 91: 75–80.

Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Kerkerian L, Had-Aissouni L (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. 24 : 502– 509.

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

Renneberg, H., 1982 : Glyphosate metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem.* 21: 2771-2781.

Regnault-Roger C. ; Fabres G. et Philogène B.J.R.; 2005. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Edition TEC & DOC, pp : 20-53.

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

Richter, C., Park ,JW., and Ames, BN., 1988: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-6467.

Ringwood, A.H., Connors, D.E., Keppler, C.J., DiNovo, A.A., 1999: Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in situ*. *Biomarkers.* 4: 400-415

Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2003 : Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le Vaccarès exposée à des polluants organiques persistants. *Rev.Ecol.* 58: 127-141.

Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R. (2006). Toxicity evaluation of flucyclozuron and diflubenazuron on the cellular model, *Paramecium sp.* *Afr. J. Biotech.* 5(1): 045-048.

S

Sbartai I, 2005: Thèse de Magistère : Modifications physiologiques et biochimiques observées chez un modèle cellulaire : *Paramecium sp* soumis à un traitement au cadmium. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 86 p.

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

Stadtman, ER., 1993: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal –catalyzed reaction. *Annu .Rev .Biochem .*, 1993, 62 :797-821.

Samworth M. et Morgan M., 2000 . Article on pond life : *Paramecium*. MISCAP Article : *Paramecium*, Text by MIKE SAMWORTH, images by MIKE MORGAN. Dec.95 Updated by the MISCAP Editor April 2000.

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

Shibko S., Pangborn J. and Tappel L.A. ; 1966. Studies on the release of lysosomal enzymes from kidney lysosomes. *J. Cell. Biol.*, 25, 479-483.

Shils, ME., Shike, M., Ross, AC., Caballero, B., Cousins, RJ., 2006: Modern Nutrition in Health and Disease. Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 396.

Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 27812-27817

Sonneborn T.M. (1974). Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis. *Cytologia*;16(9): 1063-1088.

Štirn J. (1982). Manuel des méthodes de recherche sur l'environnement aquatique: huitième partie - évaluation des modifications des écosystèmes marins dues à la pollution : (directives destinées au projet commun coordonné FAO(CGMP)/PNUE sur la pollution en Méditerranée). Food & Agriculture Org. p. 76.

Suty L. (2010). La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae. 328.

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

Tessier F, Marconnet P (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. 10 : 1-13.

V

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

Viarengo, A., Nott, J., 1993 : Mechanism 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 : effect on Ca^{+2} homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol*, 20, p.85-110.

vigourou_villard A (2006). Niveau d'imprégnation de la population générale aux pesticides : sélection des substances à mesurer en priorité. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et de travail.

Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos, M.J. Valavanidis A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54: 1361-1371.

W

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

Weckbecker G., Cory J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukaemia L1210 cells in vitro. *Cancer Lett.*, 40: 257-264.

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

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

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

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

Y

Yu, B.P., 1994 : Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité d'un fongicide sur un modèle cellulaire *Paramecium sp.*

Le principal objectif de notre travail est d'étudier l'effet de fongicide Mancozèbe 80WP sur un protiste cilié d'eau douce : *Paramecium sp.*

Trois concentrations de Mancozèbe 80 WP ont été choisies (0.4mg/l, 0.6mg/l, 0.8mg/l) et différents paramètres : physiologique (croissance et pourcentage de réponse), biochimiques (protéines total, lipides, glucides) et les biomarqueurs de stress oxydant (CAT et GSH).

Les résultats obtenus montrent une inhibition de la croissance cellulaire, ainsi qu'une diminution du taux des lipides et les glucides totaux. Nous avons également mis en évidence une diminution du taux de GSH et une stimulation d'enzyme de la métabolisation/détoxification : CAT, en plus une augmentation du taux de protéines totales. Ces données indiquent clairement le déclenchement d'un stress oxydatif.

Mots clé : Toxicité, Mancozèbe 80 WP, *Paraméciums p*, Stress oxydatif , métabolites principales, Biomarqueurs , pourcentage de réponse, croissance .

الملخص

توجد عدة أنواع من المبيدات تضم مواد فعالة مخصصة للتفاعل مع الكائن الحي، حيث عند تواجدها في الوسط البيئي يمكن أن تؤثر في الكائنات الحية غير المستهدفة. ان الهدف الرئيسي من بحثنا يتمثل في دراسة التأثير السمي لمبيد فطري Mancozèbe 80 WP على كائن من فصيلة الهذبيات البرامسيوم كنوع بيولوجي.

وقد بينت النتائج المتحصل عليها بان المبيد له تأثير سلبي على النمو الخلوي للبرامسيوم كما أثبتته حساب النسبة المئوية للاستجابة . إضافة إلى ذلك فان النتائج أظهرت نقص في الايضيات الرئيسية والمتمثلة في الدهون والغلوسيدات على غرار البروتينات التي تم تسجيل ارتفاع في معدلها. وفي الأخير ولإتمام دراستنا قمنا بدراسة المؤشرات الحيوية للأكسدة، فقد تبين وجود تنشيط إنزيم CAT مع انخفاض في معدل GSH.

الكلمات الدلالية: التأثير السمي- Mancozèbe 80 WP -البراميسيوم-الايضات الرئيسية-الاكسدة- المؤشرات الحيوية-النسبة المئوية للاستجابة.

ABSTRACT

In this study we are interested in the total evaluation of the toxicity of one fungicide , on a cell model *Paramecium* sp.

Therefore, a culture of *paramecium* sp. was treated with deferent concentrations of Mancozèbe 80 WP In our approach to assess the effects of this molecule; we measured the yeast cell growth and the rate of lipids, proteins and carbohydrates. In addition to the levels of some stress biomarker (GSH and CAT).

As a result of this research,
Mancozèbe 80 WP have a decrease on cell proliferation of *paramecium* sp, this inhibitory effect was dose-dependent and proportional to increasing concentration of mancozèbe.

The same result was found about the lipids and carbohydrates rates, when the results of proteins rate shown an increase of this parameter we have also demonstrated an increase of antioxidant enzyme(CAT) measured after exposure to *Mancozèbe* 80 WP , together a decrease of no enzymatic antioxidants(GSH levels). Our results indicate clearly an occurrence of oxidative stress.

Keywords: Toxicity, Acetaminophen, *paramecium* sp, biomarker, growth , Oxidative Stress.