



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département: Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Toxicologie: Xénobiotiques et Risques Toxicologiques.

Thème:

Nanotoxicité de Fe_3O_4 (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif

Paramécium sp.

Présenté par:

M^{elle}. Abid Amna

M^{elle}. Amarouche Amal

Devant le jury:

HAMEL Mahdia	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Présidente
ROUABHI Rachid	Prof	U.L.T. Tébessa	Rapporteur
ROUACHDIA Roukaya	M.A.A	U.L.T. Tébessa	Examinatrice

Date de Soutenance: 31/05/2016

ملخص

خلال دراستنا قمنا بالاهتمام بتقييم سُمية الجزيئات المتناهية في الدقة لأكسيد الحديد على نموذج خلوي: البرامسيوم والتي تتكيف بشكل كلي مع الدراسات السمية ، بيد أن زراعة العضويات الصغيرة قد مكنتنا من التقييم السهل لسمية المادة الغريبة. النتائج المتحصل عليها أظهرت سُمية الجزيئات المتناهية في الدقة لأكسيد الحديد على النمو الخلوي للبرامسيوم، عن طريق تثبيط النمو، النسبة المؤوية الموجبة للاستجابة، اضطراب الحركية وزيادة مدة التضاعف، كما أننا لاحظنا تغيرات مرفولوجية وانكماش على مستوى البرامسيوم المعالج.

من خلال الدراسة البيوكيميائية توصلنا إلى وجود اضطرابات على مستوى الأيضيات الرئيسية: البروتينات، الغلو سيدات، اللبيدات وهذا تزامنا مع كبح الأيض الخلوي. من ناحية أخرى كشفت متابعة المؤشرات الحيوية حصول تغيرات ظهرت جلية من خلال زيادة في نشاط الـ CAT، GST، GPx، والـ c CYT ونقصان في معدل الـ GSH. كما أننا لاحظنا أيضا تحريض الإجهاد التأكسدي والذي تمثل في زيادة في معدل الـ MDA.

عزل ميتوكوندري البرامسيوم سمح لنا بملاحظة تضخمه مع حدوث اختلال في نفاذية هذه الأخيرة.

الكلمات المفتاحية: تسمم، الجزيئات المتناهية في الدقة Fe_3O_4 ، البرامسيوم، الإجهاد التأكسدي، ميتوكوندري، مؤشر حيوي.

Abstract

In this study we are interested in the evaluation of the toxicity of Fe₃O₄ nanoparticles, on oxidative stress indicators of a cell model *Paramecium sp.* which is perfectly adapted with toxicological studies, the culture of these micro organisms allowed us to evaluate easily the toxicity of these nanoparticles.

Results show cytotoxicity of the Fe₃O₄ nanoparticles, through the inhibition of growth, a percentage of positive response, mobility perturbation with a long time of division, we have also demonstrated morphological changes of treated paramecium which became encysted.

The biochemical study showed a major disturbance in macromolecules including: proteins, carbohydrates, lipids and parallel to an inhibition of the respiratory metabolism.

On another level monitoring biomarkers showed significant dose-dependent fluctuations in the nanoparticles, which are expressed by induction of CAT activity, GST, GPx, accompanied with a decrease in GSH.

We have also demonstrated the induction of oxidative stress confirmed by an increase in the rate of MDA.

Treatment by FeO-NPs caused a mitochondrial dysfunction translated by a swelling of and a high permeability according to the controls.

Key words: Toxicity, Fe₃O₄ nanoparticule, parameciumsp, Oxidative Stress, Mitochondria, biomarkers

Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité des nanoparticules de Fe_3O_4 , sur les paramètres de stress oxydatifs d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium sp* qui est parfaitement adapté aux études toxicologiques. La culture de ce micro-organisme nous a permis d'évaluer aisément la toxicité des xénobiotiques.

Les résultats montrent une cytotoxicité des nanoparticules de Fe_3O_4 , à travers l'inhibition de la croissance, un pourcentage de réponse positif, une perturbation de la mobilité et une augmentation du temps de dédoublement. Nous avons également mis en évidence des changements morphologiques des paramécies traitées qui deviennent enkystées.

L'étude biochimique a mis en évidence une perturbation des principaux macromolécules à savoir: protéines, glucides, lipides et ce parallèlement à une inhibition du métabolisme respiratoire.

Sur un autre plan le suivi des biomarqueurs a révélé d'importantes fluctuations doses-dépendantes pour les nanoparticules, qui se sont manifestées par une induction des activités CAT, GST, GPx, Cytochrome C et une diminution du taux de GSH.

Nous avons également mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif confirmé par une augmentation du taux de MDA.

L'isolement des mitochondries de paramécies nous a permis de mettre en évidence un gonflement mitochondrial avec perturbation de la perméabilité de celle-ci.

Mots clés: Toxicité, Nanoparticules de Fe_3O_4 , *Paramecium sp*, Stress Oxydatif, Mitochondries, Biomarqueurs.



Dédicace

A mon père,

A son amour incomparable

A sa présence indispensable

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

À mes frères Khalid, Souhail.

À mes sœurs Kholoud, Djoumana, Rined.

*Pour leurs présences, et leurs conseils Pour leurs écoutes,
leurs supports et leurs paroles rassurantes au quotidien*

À toute ma famille et mes amis.

Amal

DÉDICACE

A mon père,

A son amour incomparable

A sa présence indispensable

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

A mes chères sœurs, et mes frères

Qui sont ma raison de vivre et qui m'ont entourée de tous

Soins imaginables pour atteindre à cet aboutissement

Particulièrement Youssef

Pour son présence, et ses conseils Pour son écoute, son support et son parole rassurante au quotidien

Mes chères amies Amoula, Bayda, Afra, et mes yeux Rabab

Je ne trouverai jamais des mots pour vous exprimer mon profond

attachement et ma reconnaissance pour l'amour,

la tendresse et surtout pour votre présence

dans mes moments les plus difficiles

La réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible, sans la contribution de

toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont supporté, encouragé et aidé

d'une manière ou d'une autre. Merci à toutes et à tous.

Amna

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH, le Clément qui manifeste sa clémence, qui nous avons donné la force, le courage et la patience durant ces longues années d'étude.

Nos remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences Exactes et Science de la Nature et de la Vie, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenons à remercier tout particulièrement P'. ROUABHI Rachid pour la qualité de son encadrement scientifique, bien sur, mais aussi humain.

Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton humour et ton soutien; ta persévérance lors des périodes où rien ne semblait vouloir fonctionner, et ta rigueur dans l'interprétation des résultats ont permis à ce travail d'être ce qu'il est.

Nous remercierons vivement M^{me} HAMEL Mehdi, non seulement pour avoir accepté de présider ce jury, mais aussi pour la qualité de la formation qui nous a donné.

Ces mêmes remerciements s'adressent à M^{me} ROUACHDIA Roukaya pour l'intérêt et l'attention qu'elle est accordé à ce travail et d'avoir accepté d'en être l'examinatrice.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Table des matières

ملخص

Abstract

Résumé

Remerciement

Dédicace

Table des matières

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Partie I: Synthèse bibliographiques

Chapitre 1: Nanoparticules

1. Les nanoparticules	02
2. Les nanoparticules de Fe ₃ O ₄	02
3. La taille nanométrique	03
4. Caractérisations physico-chimiques	03
5. L'origine des nanoparticules	04
5.1. Les nanoparticules d'origine naturelle	04
5.2. Les nanoparticules de synthèse	04
5.2.1. La coprécipitation	04
5.2.2. Synthèse en microémulsion	04
5.2.3. Décomposition thermique	05
5.2.4. La méthode polyol	05
5.2.5. La voie hydrothermale	05
5.3. Bilan	06
6. Contrôle de la taille des particules	07
7. Utilisation et applications	08
8. Les voies d'absorption	08
9. Distribution	09
10. Mode d'action	10

Chapitre 2: Stress oxydant

1. Le stress oxydant	11
----------------------	----

2. Les dérivés actifs de l'oxygène	12
2.1. Définition	12
2.2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène	13
3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène	13
3.1. Les cibles lipidiques	13
3.1.1. La peroxydation non enzymatique	14
3.1.2. Les conséquences de la peroxydation lipidique	15
3.2. Les cibles non lipidiques	15
3.2.1. L'oxydation des sucres	15
3.2.2. L'oxydation des protéines	16
3.2.3. Oxydation de l'ADN	16
4. Les systèmes de protection	17
4.1. Les superoxyde dismutases	18
4.2. Catalase(CAT)	19
4.3. Les glutathion peroxydases (GPx)	19
4.4. Glutathion S-Transférases (GSTs)	20
5. Les antioxydants non enzymatiques	20
5.1. Les antioxydants liposolubles	20
A. La vitamine E (tocophérols)	20
B. Les caroténoïdes	22
5.2. Les antioxydants hydrosolubles	22
A. La vitamine C (acide ascorbique)	22
B. Les oligoéléments	22
C. Les groupements thiols	22
D. Le glutathion réduit (GSH)	23
6. Rôle de la mitochondrie dans la production de ROS	23
a. La mitochondrie	23
b. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire	24
c. Les espèces actives de l'oxygène (ROS)	25
1. Rappels sur les protozoaires	26
2. Les principaux types de protozoaires	26
3. Les paramécies	27
3.1. Rappels sur la Paramécie (<i>Paramecium sp</i>)	27

3.1.1. Respiration	28
3.1.2. Mouvement	28
3.1.3. Reproduction	28
4. Choix de <i>Paramecium sp</i> Comme modèle biologique	29

Partie II: Etude expérimentale

Chapitre 1: Matériels et méthodes

1. Matériels	30
1.1. Matériel biologique	30
1.2. Matériel chimique	30
2. Méthodes	30
2.1. Méthodes de culture des paramécies	30
a. Une culture mixte	30
b. Une culture pure (repiquage)	30
2.2. Mode de traitement	31
3. Tests de cytotoxicité chez les paramécies	31
3.1. Mesure de la cinétique de croissance	31
3.2. Comptage des cellules	32
3.3. Calcul du pourcentage de réponse	32
3.4. Détermination du nombre et temps de génération	32
a. Le nombre de génération	32
b. Temps de génération	33
4. Dosage des paramètres biochimique	34
4.1. Dosage des métabolites	34
4.1.1. Dosage des protéines	34
4.1.2. Dosage des lipides	34
4.1.3. Dosage des glucides	34
5. Dosage des biomarqueurs non enzymatiques	35
5.1. Malonaldéhyde (MDA)	35
5.2. Dosage du glutathion (GSH)	36
6. Dosage des biomarqueurs enzymatiques	37
6.1. Dosage de l'activité du catalase (CAT)	37
6.2. Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST)	37
6.3. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)	38

6.4. Dosage du cytochrome c oxydase	39
7. Isolement et gonflement mitochondrial	39
Chapitre 2: Résultats	
1. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les paramètres morphologiques	41
1.1. Observation microscopique	41
1.2. L'effet du Fe ₃ O ₄ -NPs sur la mobilité des paramécies	43
1.3. L'effet du Fe ₃ O ₄ -NPs sur la croissance des paramécies	44
1.4. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le nombre des paramécies	44
1.5. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur la vitesse des paramécies	45
1.6. Pourcentage de réponse	46
1.7. Le nombre de génération	46
1.8. Temps de génération	47
2. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les métabolites des paramécies	48
2.1. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux des protéines	48
2.2. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux des lipides	48
2.3. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux des glucides	49
3. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les biomarqueurs non enzymatiques	50
3.1. Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'évolution du taux de MDA	50
3.2. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux de GSH	51
4. L'effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les biomarqueurs enzymatiques	52
4.1. Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les variations de l'activité CAT	52
4.2. Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur les variations de l'activité de GST	53
4.3. Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'évolution de l'activité GPx	54
4.4. Taux de cytochrome c chez les paramécies témoins et traités par Fe ₃ O ₄ -NPs	55
5. L'effet sur les paramètres mitochondriaux	56
5.1. Variation du volume des mitochondries traitées par Fe ₃ O ₄ -NPs	56
5.2. Variation de la perméabilité mitochondrial lors de l'injection du Ca ²⁺	57
5.3. Variation de quantité d'oxygène consommé chez les paramécies témoins et traités par Fe ₃ O ₄ -NPs	58
Discussion	60
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

N° Figure	Titre	Page
01	Structure spinelle des nanoparticules de Fe ₃ O ₄	03
02	Images MET de nanoparticules d'oxyde de fer de (a) 5 nm, (b) 9 nm, (c) 12 nm et (d) 16nm synthétisées par décomposition d'oléate de fer	07
03	Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme	09
04	Schéma illustrant la fonctionnalisation des nano oxyde de fer et leur reconnaissance par des cellules cibles	10
05	Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants	12
06	La peroxydation lipidique non enzymatique	14
07	Principales classes de dommages de l'ADN due au stress oxydatif	17
08	Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule	18
09	Les trois types de la SOD	19
10	Structure de la vitamine E	21
11	Régénération de la vitamine E	21
12	Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie	24
13	Schéma d'une cellule protozoaire	26
14	Structure d'une paramécie	28
15	Tests de Cytotoxicité des paramécies traitées par les molécules: le Zn et vit D et Zn/vitD	33
16	Observation microscopique des paramécies témoins au 7 ^{ème} jour.	41
17	Observation microscopique des paramécies témoins au 12 ^{ème} jour après.	41
18	Observation microscopique des paramécies au 7 ^{ème} jour traité par 7.5*10 ⁻² mg/ml de Fe ₃ O ₄ -NPs	42
19	Observation microscopique des paramécies au 12 ^{ème} jour traité par 7.5*10 ⁻² mg/ml de Fe ₃ O ₄ -NPs.	42
20	Observation microscopique des paramécies de la 7 ^{ème} jour traité par 0.1 mg/ml de Fe ₃ O ₄ -NPs.	43
21	Observation microscopique des paramécies du 12 ^{ème} jour traité par 0.1 mg/ml de Fe ₃ O ₄ -NPs.	43

Liste des figures

22	Cinétique de la croissance de la DO des paramécies témoins et traitées aux Fe ₃ O ₄ -NPs en fonction de temps.	44
23	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur la croissance des paramécies en fonction de temps.	45
24	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur la vitesse des paramécies en fonction de temps.	45
25	Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs.	46
26	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le nombre de génération des paramécies.	47
27	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le temps de génération des paramécies	47
28	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux de protéines totales en fonction du temps.	48
29	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux de lipides en fonction du temps.	49
30	Effet de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le taux des glucides en fonction du temps.	50
31	Effet de deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur taux de MDA en fonction du temps.	51
32	Effet de concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'évolution du taux de GSH en fonction du temps.	52
33	Effet de concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'activité Catalase chez les paramécies en fonction du temps.	53
34	Effet de deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'activité GST des paramécies en fonction du temps.	54
35	Effet de deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur l'activité GPx des paramécies en fonction du temps.	55
36	Effet de deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs sur la concentration du cytochrome C en fonction du temps.	56
37	Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des deux concentrations croissantes de Fe ₃ O ₄ -NPs en fonction du temps.	57
38	Effets de Fe ₃ O ₄ -NPs sur le volume des mitochondries des paramécies après l'injection du Ca ²⁺ .	58
39	Effets Fe ₃ O ₄ -NPs sur la respiration mitochondrial des paramécies.	59

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	Page
01	Comparaison des caractéristiques principales des méthodes de synthèse d'oxyde de fer les plus utilisées	07

Liste des abréviations

- ADN:** Acide desoxyribonucléique.
- AG:** Acide gras
- AGI:** Acide gras insaturé
- AGPI:** Acide gras poly insaturé
- ANOVA:** analysis of variance (analyse de variance)
- ASS:** Acide Sulfosalicylique.
- ATP:** Adenosine triphosphate.
- BSA:** Serum Albumin Bovin.
- BBC :** Bleu brillant de coomasie.
- CAT:** Catalase.
- CDNB:** 1-Chloro,2,4-Dinitrobenzène.
- DO:** Densité optique
- DTNB:** Acide 5,5''Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.
- EAO:** Espèces Actives de l'Oxygène.
- EDTA:** Ethylène diamine tetra-acétique.
- ERO:** Espèces réactives d'oxygène
- Fe₃O₄:** Oxyde de fer
- GPx:** Glutathion peroxydases.
- GST:** Glutathion-S-transférases.
- GSH:** Glutathionne
- GSSG:** Glutathion disulfure.
- H₂O₂:** Peroxyde d'hydrogène
- MDA:** Malondialdéhyde.
- MET:** Microscope électronique à transmission
- nM:** nmol
- NPs:** Nanoparticules
- PTPM:** Pore de transition de perméabilité mitochondriale
- RL:** Radical libre
- ROS:** Réactifs oxygen species.
- SOD:** Superoxyde dismutase
- SPIONS:** Supermagnétique Iron Oxide Nanoparticles
- TBA:** Acide Thiobarbiturique

Liste des abréviations

TCA: Acide Trichloroacétique.

TP: Tampon phosphate

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

Introduction

Introduction

Présentent dans notre environnement quotidien depuis la nuit des temps, les particules ultrafines que on les regroupe actuellement sous la dénomination de nanoparticules, envahissent insidieusement et progressivement notre vie quotidienne, sans que pratiquement personne ne le sache (**Picot, 2012**).

Grâce à leur propriété physiques, chimique voire biologique découlent spécifiquement de cette taille nanométrique, les nanomatériaux (dimension <100 nm) sont utilisés dans de nombreuses applications grand public (cosmétique, matériaux nano structurés,...). (**Zeyons, 2008**) Cependant, leur présence grandissante inquiète car leur impact potentiel sur les humains et l'environnement reste mal connu. Cette étude est consacrée à une compréhension approfondie des interactions physicochimiques et biologiques entre un modèle biologique unicellulaire d'eau douce considéré également comme bon bioindicateur de la pollution des eaux : *Paramecium Sp* du fait que ces cellules peuvent rendre compte d'éventuelles altérations du milieu aussi minimes soient-elle (**Chapman, 2001**), avec des nanoparticules de Fe_3O_4 et ce à travers le suivre de certains paramètres morpho-physiologiques comme la cinétique de croissance, le pourcentage de réponse, et aussi des marqueurs situés en amont de la cascade d'évènements et qui constituent donc les premières évidences de perturbations. Au niveau subcellulaire, nous nous sommes ainsi intéressés au suivi de marqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydant.

Pour mieux étayer les effets éventuels sur ces paramètres, il nous a semblé judicieux de comprendre leurs mécanismes cellulaires (biochimiques) mis en jeu notamment le métabolisme des macromolécules telles lipides, protéines et glucides. Notre intérêt s'est le suivre du métabolisme énergétique de la paramécie et les modifications éventuelles pouvant survenir à la suite d'un traitement par les nanoparticules de Fe_3O_4 et ce à travers la perturbation et/ou l'inhibition de la consommation d' O_2 qui est un signe avant-coureur d'un stress oxydatif. Or l'on sait que l'organite clé de ce phénomène n'est rien d'autre que la mitochondrie, ce qui nous a conduit naturellement à des essais en vue de l'isolement des mitochondries de paramécies dans un premier temps, puis à tester les nanoparticules choisies directement sur ces organites. Enfin les résultats obtenus à partir de ces essais nous permettront d'émettre une hypothèse sur la toxicité du Fe_3O_4 -NPs sur un modèle alternatif et d'ouvrir par conséquent sur des perspectives.

Partie I:
Synthèse bibliographique

1. Les nanoparticules

Le développement des nanotechnologies est considéré comme la révolution industrielle du XXI^{ème} siècle (**Poupon et al., 2011**). En effet, les nanotechnologies ont un impact sur l'économie mondiale du fait de leurs applications dans un grand nombre de secteurs. Le domaine de la nanotechnologie est défini comme la combinaison de la science et de l'ingénierie.

La nanotechnologie peut toucher aussi bien le design, la synthèse et caractérisation des particules (**Sahoo et al., 2007**). Les nanoparticules sont définies comme étant des particules ayant une taille de l'échelle nanométrique (entre 1 et 100nm soit 10⁻⁹ d'un mètre) (**Laurent et Mahmoudi 2011; Moore 2006; Wahajuddin et Arora 2012; Wu et al., 2008**). Les chercheurs ont un réel engouement pour les nanoparticules en grande partie pour la toxicité des nanoparticules.

Cependant, les propriétés nanométriques sont très mal connues, les chercheurs essaient de déterminer l'impact possible toxique des nanoparticules sur les microorganismes et les mécanismes de toxicité qui sont utilisés (**Jiang 2009., Hajipour et al., 2012**), leur toxicité dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques telles que leur forme (Wahajuddin et Arora, 2012), leurs caractéristiques de surface (**Nhiem et al., 2010; Szalay 2012; Wahajuddin et Arora 2012**), leur attraction électrostatique (**Morones et al., 2005; Aruoja et al., 2009**), leur taille (**Wahajuddin et Arora, 2012**) et aussi à la composition des nanoparticules (**Aruoja et al., 2009**)(**Jiang et al., 2009**).

2. Les nanoparticules de Fe₃O₄

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des semi-conducteurs, c'est-à-dire qu'il y a une conductivité électrique due au flux d'électrons. (**Teja et Koh 2009; Wahajuddin & Arora 2012; Wu et al., 2008**)

Les nanoparticules super paramagnétiques d'oxyde de fer (SPIONs) ont des propriétés intéressantes pour diverses applications médicales comme le ciblage de drogue, la résolution imagerie, et la réparation de tissu (**Hajipour et al. 2012**). ainsi qu'une activité chimique qui leur donne un rôle déterminant dans des domaines variés, comme la catalyse, le stockage des données, la microélectronique, ou les matériaux nucléaires (**Gota, 2008**).

L'atome de fer possède un moment magnétique très fort à cause de ces quatre électrons de la troisième orbite. Les (SPIONs) utilisent le phénomène de superparamagnétisme, lorsqu'appliqué à un champ magnétique externe, jusqu'à saturation. Cependant, dès que le champ magnétique est arrêté, il n'y a plus d'interaction magnétique (**Wahajuddin et Arora,**

2012). Ce genre de comportement est surtout retrouvé chez les nanoparticules d'oxyde de fer plus petites que 20nm. Les propriétés magnétiques des oxydes de fer sont exploitées dans diverses applications: contraste pour le IRM, et le traitement de cancer. Toutes ces applications sont dépendantes de certains paramètres des nanoparticules comme leur taille, leur forme, leurs caractéristiques de surface, et leurs propriétés magnétiques (Teja et Koh 2009).

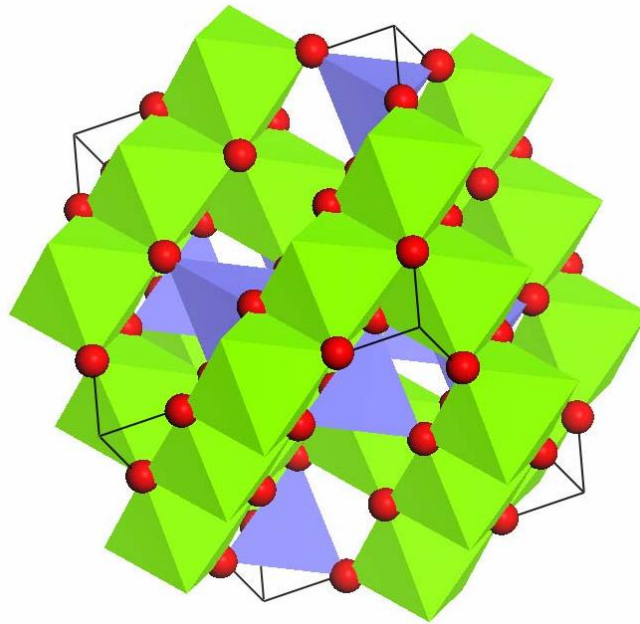


Figure 01: Structure spinelle des nanoparticules de Fe₃O₄ (Daou, 2007).

3. La taille nanométrique

Les nanoparticules se situent à une échelle moléculaire comprise entre celle d'une molécule d'ADN de 2.5 nm de large et celle d'un globule rouge humain de 800 nm de diamètre. Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. Cette propriété est très étudiée en médecine et pharmacologie car elle permet d'utiliser les nanoparticules comme vecteurs de médicaments vers des cellules cibles (Melanie, 2007).

4. Caractérisations physico-chimiques

Leurs propriétés magnétiques sont excellentes et cela est dû à leur petite taille. En effet, il y a une corrélation entre la taille de la particule et ses propriétés. (Durmus *et al.*, 2013) Plus la particule est petite et plus son moment magnétique sera élevé. La composition chimique est le facteur de base associé aux propriétés particulières de ces nanoparticules (Jia *et al.*, 2008).

5. L'origine des nanoparticules

5.1. Les nanoparticules d'origine naturelle

Ils sont produits par différents phénomènes dont la condensation de gaz dans l'atmosphère, mais aussi l'activité volcanique, les feux, les marées, l'érosion. C'est ce qui est plus communément connu sous le nom de particules ultrafines.

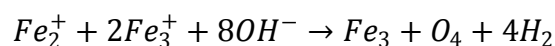
5.2. Les nanoparticules de synthèse

La voie classique de synthèse de ces NPs est la voie chimique. Le contrôle de la taille, la forme et composition des NPs dépend du type de sels utilisé, du ratio Fe⁺²/Fe⁺³, le pH et la force ionique du milieu (Alloun, 2011).

5.2.1. La coprécipitation

La méthode la plus commun est la coprécipitation de sels de fer (Matthias, 2010), elle est probablement la plus simple et la plus efficace pour obtenir ces nanoparticules d'oxyde fer qui sont généralement préparées grâce à un mélange stœchiométrique de sels ferreux et ferrique en milieux aqueux.

La réaction chimique de formation Fe₃O₄ peut être écrite comme suite:



Cependant, avec cette méthode, la distribution de taille des nanoparticules obtenues est trop grande comprise entre 2 et 16 nm, donc notre produit n'est pas assez homogène (Alloun, 2011).

5.2.2. Synthèse en microémulsion

Une microémulsion est une dispersion isotropique thermodynamiquement stable de deux liquides non-miscibles, dans laquelle le microdomaine de l'un ou de l'autre liquide ou même des deux est stabilisé par un film interfacial de tensio-actifs.

Dans les microémulsions d'eau dans l'huile, la phase aqueuse est dispersée en microgouttes (en général 1 - 50 nm de diamètre) entourées par une monocouche d'agent tensio-actif. La taille de micelle est déterminée par le rapport molaire de l'eau à l'agent tensio-actif.

En mélangeant deux microémulsions identiques eau-huile contenant les réactifs désirés, les microgouttes se heurteront, fusionneront, et se casseront encore sans interruption, pour donner finalement naissance à un précipité dans les micelles (Daou, 2007).

Par addition d'un solvant, tels que l'acétone ou l'éthanol, aux microémulsions, le précipité peut être extrait en filtrant ou en centrifugeant le mélange. Dans ce sens, une microémulsion peut être un nanoréacteur pour la formation de nanoparticules.

Ont décrit la synthèse de nanobâtonnets d'oxyde de fer par une réaction de type sol-gel dans des micelles inverses formées par l'acide oléique et de l'éther benzylique, en utilisant FeCl et l'oxyde de propylène comme extracteur de proton.

La technique de microémulsion permet la synthèse de nanoparticules sphériques, en bâtonnets ou même sous forme de tubes.

Bien que de nombreux types de nanoparticules magnétiques aient été synthétisés d'une façon contrôlée avec cette méthode, son utilisation reste limitée car le rendement est très bas. Ajouté à cela, de grandes quantités de solvant sont nécessaires pour synthétiser des quantités appréciables d'un matériau, ce qui rend ce processus délicat à utiliser à l'échelle industrielle (Alloun, 2011).

5.2.3. Décomposition thermique

Les méthodes de synthèse par décomposition thermique s'inspirent de la synthèse de nanocristaux semi-conducteur de haute qualité et des oxydes en milieu non aqueux.

La synthèse de particules magnétiques avec des tailles et des formes contrôlées est réalisée par décomposition thermique de composés organométalliques dans des solvants organiques ayant une température d'ébullition élevée et en présence d'agents tensio-actifs stabilisants.

Des nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques monodisperses de tailles comprises entre 5 et 20 nm peuvent être formées.

5.2.4. La méthode polyol

L'hydrolyse forcée de sels d'ions de métaux de transition en milieu polyol est une autre voie de synthèse de ferrites spinelle. Les sels ioniques de métaux de transition se dissolvent dans les solvants polyol.

La taille et la morphologie des particules sont essentiellement fixées par deux paramètres: Le taux d'hydrolyse, qui est le rapport de la quantité d'eau sur la quantité de matière des cations métalliques dans le milieu et le rapport de la quantité de contre-ions (souvent des ions acétates) des sels ioniques sur la quantité des cations métalliques. La taille des particules obtenues est inférieure à 10nm (Mezni, 2013).

5.2.5. La voie hydrothermale

Les particules obtenues par les précédentes voies de synthèse peuvent subir un traitement supplémentaire en milieu hydrothermal, de manière à modifier par exemple la taille, la morphologie et la structure cristalline des particules. La synthèse hydrothermale met en jeu différents mécanismes:

- ✓ Un phénomène de dissolution-cristallisation qui assure le transport de matière via la solution : C'est le cas du mûrissement d'Ostwald qui entraîne la croissance secondaire des particules. Dans le cas où le précipité initial n'est pas la phase thermodynamiquement stable, un nouveau régime de nucléation (le plus souvent hétérogène) et de croissance se met en place et conduit à la nouvelle phase.
- ✓ Un réarrangement à l'état solide qui entraîne la réorganisation locale de la structure initiale, par exemple, comme la cristallisation d'une phase amorphe ou la déshydratation d'un hydroxyde.
- ✓ Une agrégation de particules primaires qui peut contribuer à abaisser l'énergie interfaciale et à accroître fortement la taille des particules finales. Ce dernier mécanisme est actuellement l'objet d'une controverse pour savoir s'il permet d'obtenir une dispersion monodisperse de particules.

Ce problème est d'autant plus intéressant que l'agrégation peut être parfois ordonnée et conduire à la formation de monocristaux par élimination des joints de grains (liaison chimique entre les surfaces ou recristallisation des zones de joints) (Daou, 2007).

5.3. Bilan

Les avantages et les inconvénients des cinq méthodes de synthèse mentionnées ci-dessus sont brièvement récapitulés dans le Tableau. La coprécipitation est la méthode la plus simple. Elle permet un contrôle de la composition et de la morphologie, une pureté des composés très satisfaisante. En terme de contrôle de taille et de morphologie des nanoparticules, la décomposition thermique semble la meilleure méthode développée jusqu'ici.

Les microémulsions peuvent être également employées pour synthétiser des nanoparticules monodisperses avec des morphologies spécifiques. Cependant, cette méthode exige une grande quantité de solvant. Finalement la synthèse hydrothermale reste une méthode relativement peu explorée pour la synthèse de nanoparticules magnétiques, bien qu'elle permette l'élaboration de matériaux d'excellente cristallinité.

Tableau 01: comparaison des caractéristiques principales des méthodes de synthèse d'oxyde de fer les plus utilisées (Daou, 2007)

Méthode de synthèse	Condition de synthèse	Temps de réaction	Solvant	Taille (nm)	Distribution de taille	Control de la morphologie	Rendement
coprécipitation	Très simple	Minutes	Eau	<20	Passable	Moyen	Elevé
Microémulsion	Complicé	Dizaines de minutes	Eau/organique	<50	Relativement étroite	Bon	Passable
Milieu polyol	Très simple	Dizaines de minutes	Organique	<10	Relativement étroite	Très bon	Moyen
Hydrothermale	Simple haute pression	Heures	Eau Eau/éthanol	<1000	Relativement étroite	Très bon	Moyen
Décomposition thermique	Complicé	Heures	Organique	<40	Très étroite	Très bon	Elevé

6. Contrôle de la taille des particules

La taille des particules dépend donc de la concentration du précurseur, la quantité de ligands ajoutés, la vitesse de chauffage, ainsi que la durée et la température de croissance.

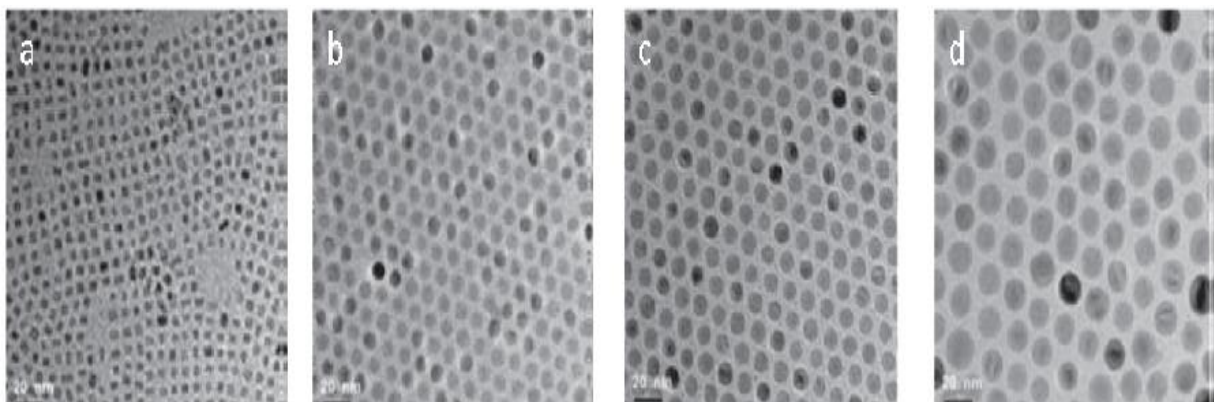


Figure 02: Images MET de nanoparticules d'oxyde de fer de (a) 5 nm, (b) 9 nm, (c) 12 nm et (d) 16 nm synthétisées par décomposition d'oléate de fer (Matthias, 2010).

7. Utilisation et applications

Depuis plus de 30 ans, le secteur de recherche de nanotechnologie ne cesse de se développer passant d'un intérêt physique et biologique initialement à des application clinique (**Talantik, 2014**), dans ces applications biomédicales, la taille et les propriétés physicochimiques des nanoxyde de fer sont importantes car se la peut fortement affecter le temps de résidences des nanoparticules dans le sang et leur biodisponibilité (**Gupta et al., 2005**).

Combiné à des médicaments ou gènes. Ces NPs peuvent changer la viabilité ou les processus de transcription des cellules, ce qui les rend fortement intéressante pour l'industrie pharmaceutique, la biologie cellulaire et les diagnostiques.

Elles permettent une nouvelle approche de la recherche et développement d'un médicament puisqu'elles sont capables d'interagir avec les cellules de manière spécifiques.

Elles sont utile en tant qu'outils versatiles pour les diagnostics précoce notamment utilisée en tant qu'agent de contraste en imagerie IRM), souvent combiné lors des screening de nouvelles molécules.

Ces NPs de Fe₃O₄ super paramagnétiques sont capable de se lier aux médicament, protéines, anticorps ou nucléotides et peuvent être dirigés vers un organe, tissu, ou tumeur en utilisant un champ magnétique externe (**Nhiem et al., 2010; Puceket et al., 2011; Szalay et al., 2012; Teja et Koh 2009; Wahajuddin et Arora 2012; Wu et al., 2008**).

Ainsi, les effets secondaires systématiques peuvent être évités (exemple: dans le traitement des tumeurs cancéreuses, les cellules saines seront épargnées).

Les patients sont donc amenés à être exposés à des produits pharmaceutiques contenant ces NPs.

Il est alors important de connaitre leur biocompatibilité et d'étudier leur toxicité, notamment cellulaire (**Alloun , 2011**).

8. Les voies d'absorption

Il existe plusieurs voies d'entrée potentielle des nanoparticules manufacturées dans les organismes vivants. Le système respiratoire est généralement la première venant à l'esprit du fait de l'analogie avec les particules atmosphériques ultrafines. Mais d'autres voies d'exposition comme l'ingestion (système gastro-intestinal), la voie cutanée (système dermique) et les injections de nanoparticules dans la circulation sanguine sont également à prendre en considération compte tenu des modes d'utilisations des nanoparticules manufacturées. Chaque voie présente habituellement une barrière à cette pénétration tandis

que les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, et atteignent leur cible cellulaire.

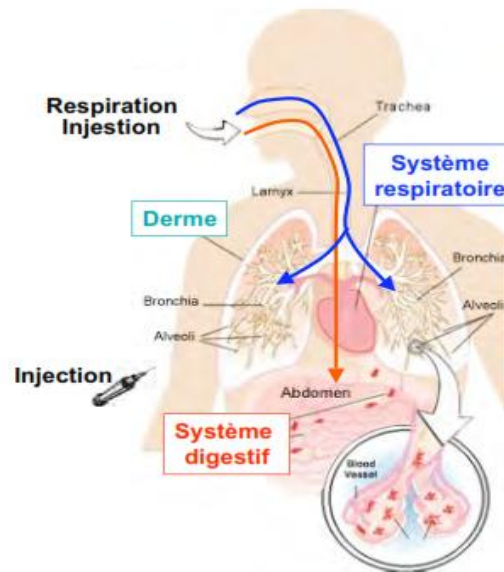


Figure 03: Différentes voies d'entrée des nanoparticules dans l'organisme (Auffan, 2008).

9. Distribution

Les nanoparticules pouvaient franchir ces barrières de protection, se distribuer dans l'organisme et s'accumuler dans certains organes, principalement lors des expositions respiratoire ou digestive (Oberdörster *et al.*, 2005).

Dans ces applications biomédicales, la taille et les propriétés physico-chimiques des nanoparticules d'oxyde de fer sont importantes car cela peut fortement affecter le temps de résidences des nanoparticules dans le sang et leur biodisponibilité. Par exemple, les nanoparticules de taille comprise entre 10 et 100 nm auront un temps de résidence optimal dans la circulation sanguine alors que les particules de 200 nm ou inférieures à 10 nm seront retenues par la rate ou le système rénal respectivement. D'autre part, une fois dans l'organisme, des protéines contenues dans le sang vont s'adsorber à la surface des nanoparticules.

Cette adsorption est à l'origine de retrait des nanoparticules de la circulation sanguine par le système réticuloendothélial. Généralement, afin de limiter l'adsorption de protéines et de prolonger le temps de résidence des particules dans les organismes, les nano-oxydes de fer sont enrobés de molécules organiques. Cet enrobage a pour but de fonctionnaliser les nano-oxydes afin de les rendre reconnaissables par les cellules cibles uniquement.

Ainsi, les nanoparticules magnétiques étaient capables de délivrer des substances médicamenteuses directement dans des tumeurs cérébrales. Le corollaire est que des nanoparticules indésirables pourraient se retrouver distribuées un peu partout dans les organismes et atteindre les ramifications les plus profondes des voies respiratoires, franchir les barrières épithéliales ou encore passer dans la circulation sanguine (Poupon, 2011).

10. Mode d'action

Les SPIONs sont considérés être biocompatibles, une fois dans l'organisme, des protéines contenues dans le sang vont s'adsorber à la surface des nanoparticules. Cela en fait un candidat idéal pour les applications biomédicales (lorsque mis en contact avec l'humain).

Cependant, Du fait de leur grande surface spécifique et de la forte réactivité de surface, il est possible que la génération de ROS par les nano-oxydes soient plus importante que pour des oxydes de tailles micrométriques (Melanie, 2007), les nanoparticules peuvent être internalisées ou adsorbées en surface des cellules et induire des effets toxiques.

La petite taille des nanoparticules leur permet d'interagir de façon particulière avec les systèmes biologiques (protéines, membranes, cellules) (Zeyons, 2008).

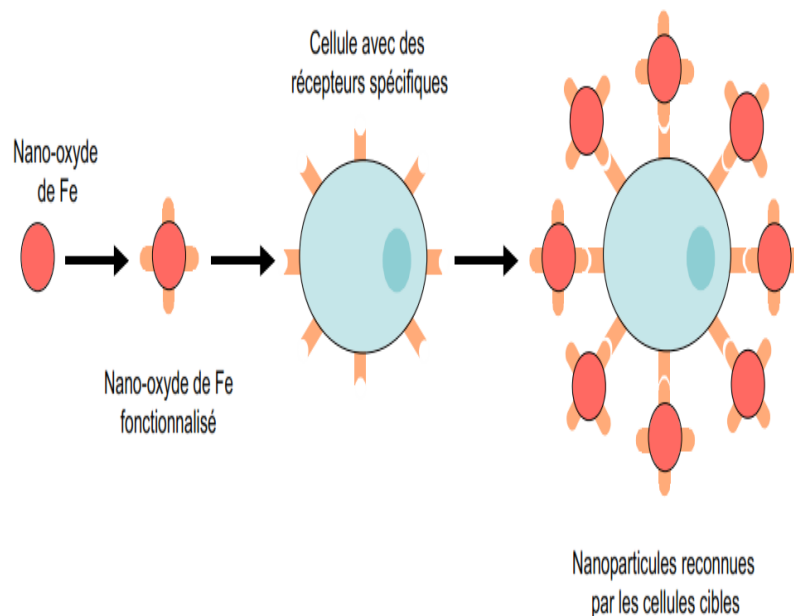


Figure 04 : Schéma illustrant la fonctionnalisation des nano oxyde de fer et leur reconnaissance par des cellules cibles (Gupta *et al.*, 2005).

1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et l'élimination de ces ERO (Sayre *et al.*, 2005).

A titre d'exemples quelque cas favorisant cet état est:

- L'introduction dans la cellule des radicaux libres ou d'espèces réactives oxygénées (Polluants photochimiques pénétrant l'organisme via le système respiratoire, l'alimentation ou les muqueuses).
- Un défaut du système de protection, par exemple une mutation inactivant une des enzymes du système de protection ou une carence en une des vitamines.
- L'introduction dans la cellule ou dans un organe des molécules hautement réactives, par exemple nanoparticules (très petite et à surface spécifique très développée). Si celles-ci sont nombreuses, les macrophages n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme provoquant une réaction inflammatoire exacerbée (Bartosz, 2003).

Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme...) est un facteur d'inflammation et de mutagenèse, mais il est aussi jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Haleng *et al.*, 2007).

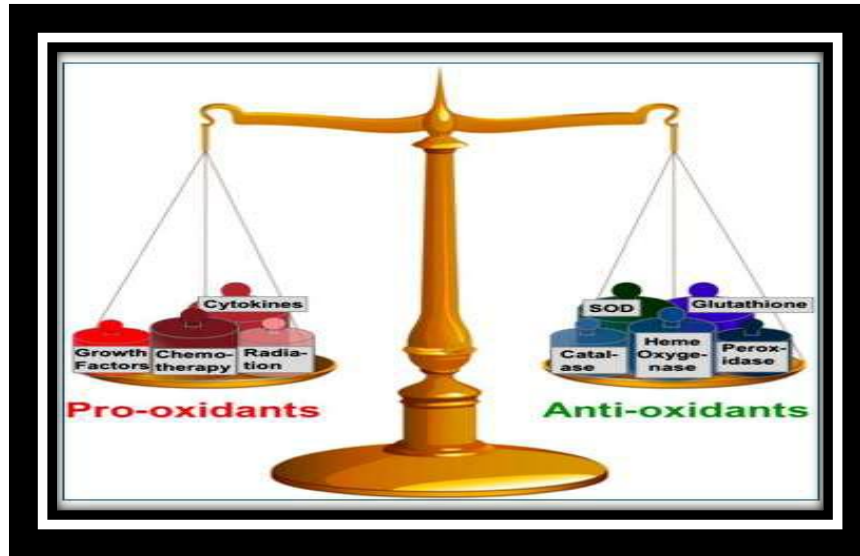


Figure 05: Balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants (Josiane, 2010).

2. Les dérivés actifs de l'oxygène

2.1. Définition

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante : les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (Januels, 2003).

Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) (Massart, 2011). Dans certaines conditions métaboliques, la réduction de l'oxygène (O_2) est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres.

Les EAO incluent les RL et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), et l'ozone (O_3) (Patrick, 2006).

- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde O_2^- , les radicaux hydroxyles HO^\bullet , peroxyde ROO^\bullet , alkoxyde RO^\bullet) (Januels, 2003).

Ces espèces oxygénées sont formées en faible quantité dans les conditions Physiologiques (au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, lors de réactions Inflammatoires) mais elles sont éliminées rapidement par le système antioxydant cellulaire (**Januels, 2003**), mais, l'état d'un déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (**Kirschvink et al 2008**).

2.2. Formation des dérivés actifs de l'oxygène

La principale source d'ERO est la chaîne de transfert d'électron des mitochondries; la production d'oxydant par les neutrophiles et les macrophages est également une source importante qui dépend de l'activité enzymatique de la NADPH-oxydase pendant l'emballage oxydatif «respiratory burst» des cellules inflammatoires (**Lamprecht et al 2004**). D'autres sources dépendent d'enzymes comme les xanthines oxydases, les oxydases membranaires, les synthétases de l'oxyde nitrique, qui produisent physiologiquement des oxydants (**Radak et al., 1995**).

La présence de pro-oxydants peut transformer les oxydants en des formes plus réactives, comme par exemple, le fer qui favorise la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyle (HO^{\bullet}) (**Kirschvink et al 2008**).

Dans les mitochondries qui produisent en particulier des radicaux superoxydes ($^{\bullet}O_2^-$) et des H_2O_2 , la présence simultanée d'AGPI, de protéines, d'oxygène, d'électrons, et de fer, font des membranes mitochondriales un site particulièrement sensible aux attaques radicalaires (**Massart, 2011**). L'oxygène est l'accepteur final d'électron en provenance des substrats énergétiques, sa réduction ne peut se faire qu'un électron à la fois (réduction univalente) et de ce fait il résulte une production inévitable d'intermédiaires très réactifs. Il est estimé que 2 à 5% de l'oxygène consommé est transformé en $^{\bullet}O_2^-$ (**Massart, 2011**).

3. Les cibles des dérivés actifs de l'oxygène

3.1. Les cibles lipidiques

L'oxydation des lipides ou peroxydation lipidique, correspond à la détérioration oxydative de doubles liaisons d'acides gras insaturés (AGI), dans des esters de glycérol (tissu adipeux), de phospholipides (membranes), ou de cholestérol (**Valko et al., 2007**).

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ROS radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est à dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique.

3.1.1. La peroxydation non enzymatique

Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives:

L'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell et al., 1989). La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras R \cdot à partir l'attaque par un RL d'un des groupes méthylène (CH $_2$ \cdot) de l'acide gras adjacent à une double liaison par soustraction d'un atome d'hydrogène (H \cdot). Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que HO \cdot ou HOO \cdot (Clarkson et al., 2000).

Le radical lipidique R \cdot subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d'O $_2$ et former un radical peroxyde (ROO \cdot). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un H \cdot à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction.

L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de Fe $^{2+}$ ou Cu $^{2+}$ et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes. La réaction en chaîne peut être heureusement interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Januels, 2003).

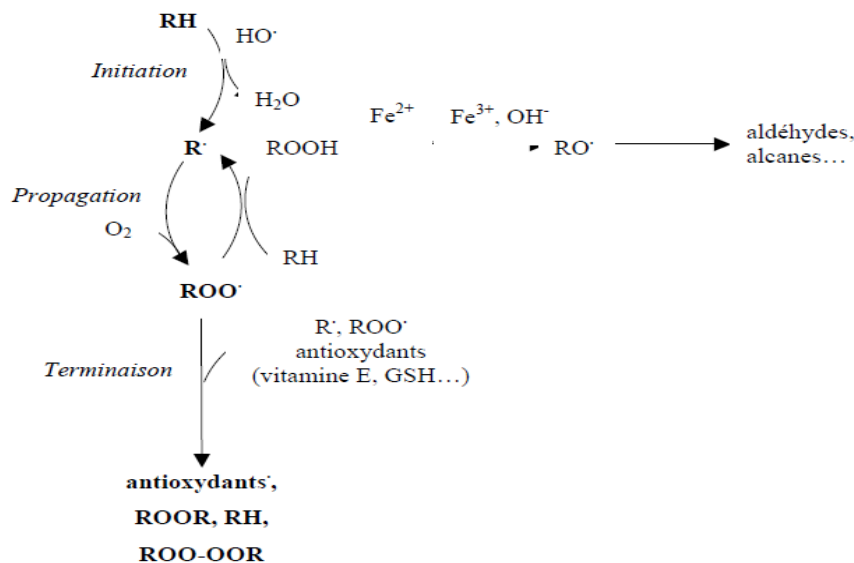


Figure 06 : La peroxydation lipidique non enzymatique (Januels, 2003).

3.1.2. Les conséquences de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique spontanée s'avère toujours néfaste. Dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène et a plusieurs conséquences:

- La présence d'un groupement peroxyde perturbe les interactions hydrophobes lipides/lipides et lipides/protéines, ceci conduit à des altérations structurales des membranes et des lipoprotéines.
- La fluidité des membranes est diminuée et la perméabilité est augmentée, des enzymes et des récepteurs membranaires sont susceptibles d'être inactivés.
- Les hydroperoxydes lipidiques sont à leur tour la source de radicaux libres qui peuvent induire des modifications secondaires des autres membranes et/ou des constituants des lipoprotéines (**Kuhn et al 2002**).

Ceci met en péril l'intégrité des organites et/ou de la cellule et peut conduire à une lyse des organites comme de la cellule.

3.2. Les cibles non lipidiques

La production excessive de radicaux libres est responsable de lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides), mais aussi de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides.

3.2.1. L'oxydation des sucres

Les sucres sont attaqués par les ERO (H_2O_2 , $\bullet O_2^-$, $\bullet OH$ ou des radicaux peroxydes d'AG), avec abstraction d'hydrogène au niveau d'une des liaisons CH-OH. Le radical alkyles ($\bullet C-OH$) ainsi formé se combine immédiatement avec de l'oxygène pour former un carbonyle (C=O) et expulser un radical hydroperoxyde ($\bullet OOH$). L'opération se prolonge jusqu'à former un composé dicarboxylé. Par auto-oxydation (RL), des sucres comme le glucose forment des composés dicarboxylés (contenant deux C=O), dont les plus connus sont les glyoxal et les glycolaldéhydes, qui pourront se lier à des protéines par réaction de Maillard et altérer les propriétés chimiques de celles-ci. Ceci a été démontré chez des diabétiques et a été corrélé avec la sévérité de la maladie au travers des protéines glycosylées. La glyco-oxydation des sucres et la glycation des protéines a également été mise en évidence dans les agglomérats de protéines caractéristiques de certaines maladies neurodégénératives.

3.2.2. L'oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger la majorité des ERO générés (50–75%). Leur oxydation affecte la fonction des protéines qui peuvent se fragmenter ou former des agglomérats les rendant susceptibles à la protéolyse, et résulte en la formation de protéines carbonylées (PC) dont l'accumulation peut être dosée comme témoin de l'oxydation (**Clarkson et al., 2000**). Suivant leur nature les acides aminés subiront des attaques radicalaires présentant des successions de réactions différentes. Toutefois l'oxydation des acides aminés est similaire à celle des sucres et implique une attaque radicalaire ($\text{LOO}\cdot \rightarrow \text{LOOH}$, ou autre) sur un des groupes méthyle lié à un atome d'azote. Le radical d'acide aminé obtenu réagira avec l'oxygène pour former un composé avec expulsion d'un radical peroxyde d'hydrogène ou d'un peroxyde d'hydrogène, le composé obtenu étant ensuite transformé en un aldéhyde (**Spiteller, 2006**).

3.2.3. Oxydation de l'ADN

Les ADN nucléaire et mitochondrial constituent une cible cellulaire importante. Les attaques radicalaires au niveau des désoxyriboses ou des bases puriques et pyrimidiques peuvent conduire à leur oxydation ainsi qu'à des coupures mono- ou double-brin de l'ADN, responsables éventuellement de mutations pouvant aboutir à la mort cellulaire (**Imlay, 1988**).

De puissants systèmes de réparation (glycosylases, endonucléases) permettent d'assurer dans la plupart des cas la conservation du génome (**Januels, 2003**).

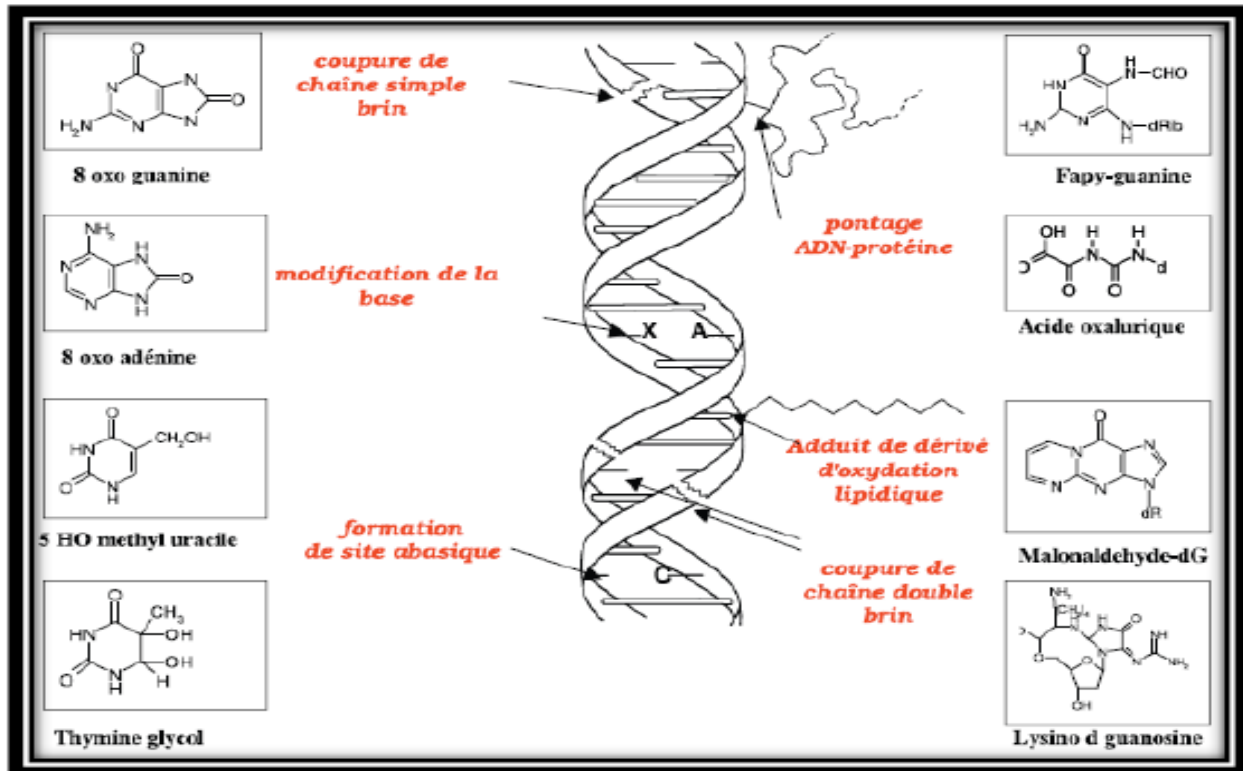


Figure 07: Principales classes de dommages de l'ADN due au stress oxydatif (Favier 2003).

4. Les systèmes de protection

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances. On peut citer : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GSH-Px ou GPx), les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases (GSH-R) ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites utilisent un donneur d'équivalent réducteur le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydant (Delattre *et al.*, 2005).

Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères:

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- Être rapidement absorbé.

- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire (Valko, 2006).

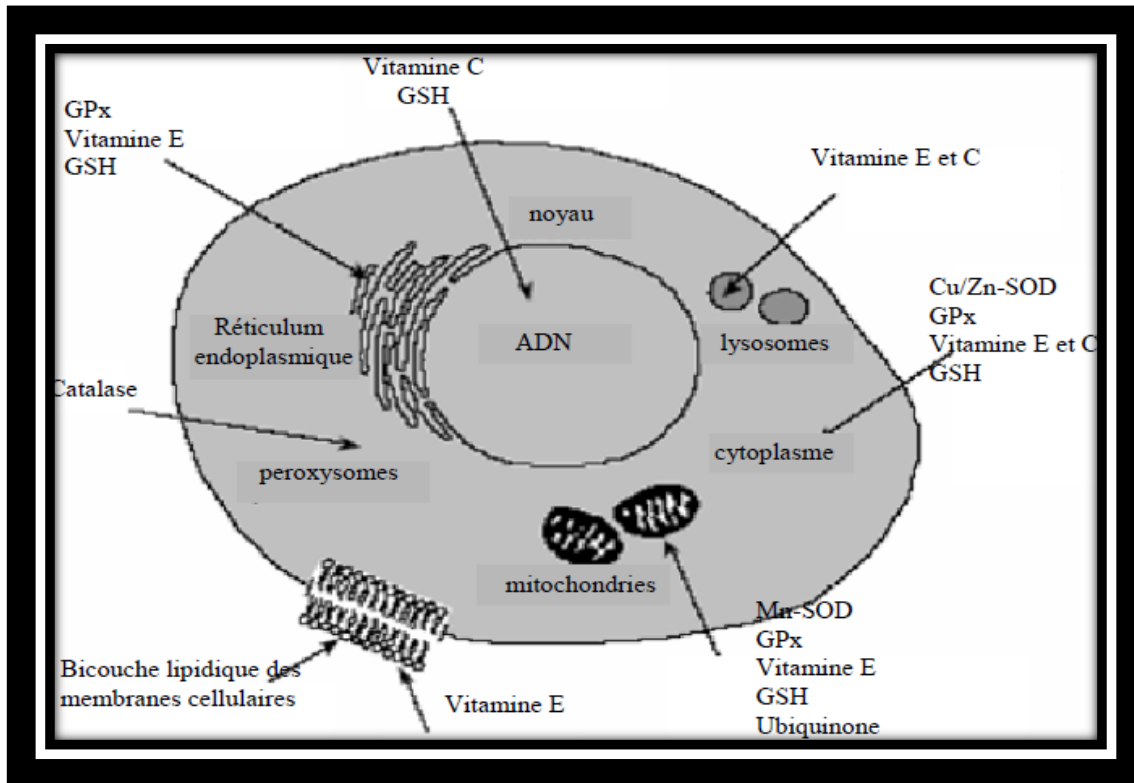


Figure 08 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Garait, 2006).

4.1. Les superoxyde dismutases

La famille des SODs représente un important système d'enzymes contenant des métaux dans leur centre catalytique, favorise la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et en O_2 . Les SODs existent sous trois isoformes dont la structure d'ensemble est restée conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde (Zelko *et al.*, 2002). Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les SOD à manganèse (Mn-SOD) protégeant la mitochondrie, des SOD à cuivre-zinc (Cu, Zn-SOD) protégeant le cytosol et la face externe des cellules (ec-SOD). Il est cependant important de noter que la présence de la Cu, Zn-SOD n'est pas exclusive au cytosol car cette dernière présente également une certaine activité au niveau des lysosomes, des peroxysomes, du noyau et de la membrane mitochondriale (Ntimbane, 2009).

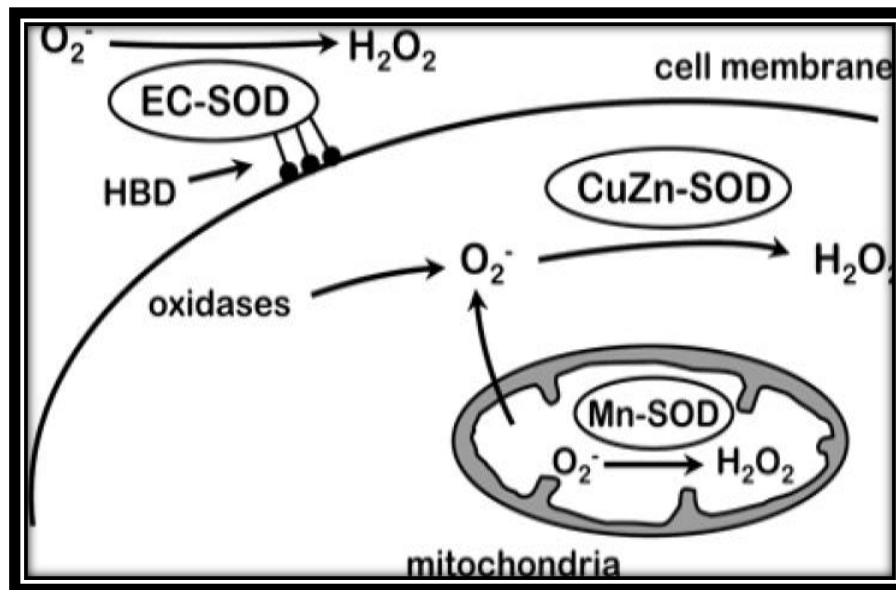
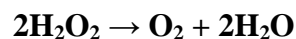


Figure 09: Les trois types de la SOD (Frank *et al*, 2004).

4.2. Catalase (CAT)

Catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques.

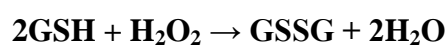
L'activité catalytique de la catalase est très élevée:



La catalase (CAT) est une protéine ubiquitaire fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, elle est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (riches en oxydases) ce qui limite son action par rapport à des peroxydases cytoplasmiques. Cette enzyme métabolise l' H_2O_2 résultant de l'action des SOD ou celui génère par l'action des oxydases pour donner de l'eau. En éliminant l' H_2O_2 , la CAT détoxifie indirectement la cellule des O_2^- qui sont transformés en H_2O_2 par les SODs (Ntimbane, 2009).

4.3. Les glutathion peroxydases (GPx)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPx) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Wassmann, 2004).



4.4. Glutathion S-Transférases (GSTs)

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés électrophiles. La fonction des GSTs la plus connue est leur activité de catalyser des réactions de conjugaison entre le glutathion et des substances nocives pour diminuer leurs réactivités avec les macromolécules intracellulaires **(De Moffarts, 2007)**.

Les GST complètent l'action des glutathion peroxydases (GSH-Px) dans la seconde ligne de défense enzymatique antioxydante, les GSTs préviennent les dommages cytotoxiques et génotoxiques causés par les composés électrophiles générés comme produits de dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant **(Fatmi, 2013)**.

5. Les antioxydants non enzymatiques

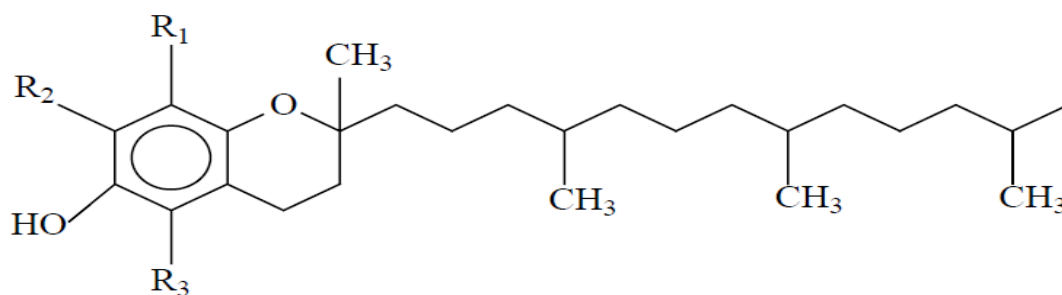
Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces oxygénées réactives. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (α -tocophérol, caroténoïdes) **(Januels, 2003)**.

5.1. Les antioxydants liposolubles

Situés essentiellement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques circulantes, ces antioxydants sont capables grâce à leur structure chimique, de réagir directement avec les ROS et d'inhiber ainsi la peroxydation lipidique. Les principaux antioxydants liposolubles appartiennent à la famille des tocophérols ou des caroténoïdes **(Januels, 2003)**.

A. La vitamine E (tocophérols)

Désigne sous un terme générique l'ensemble des différents tocophérols (la molécule de tocol constituant la structure de base), et des différents tocotriénols. Elle est constituée d'un noyau 6-chromanol sur lequel est fixée une chaîne phytyle entièrement saturée. Les différents tocophérols (α , β , δ et γ) se distinguent entre eux par le nombre et la situation des groupements méthyles fixés sur le cycle phénolique. La chaîne aliphatique confère à la vitamine E sa liposolubilité et permet son incorporation dans les membranes cellulaires. La vitamine E est le principal agent antioxydant des membranes cellulaires en les protégeant contre les dégradations oxydatives. **(Bougeurene, 2012)** Elle bloque la chaîne de propagation en captant les radicaux alkoxyles et peroxyles générés lors de la peroxydation.



R1	R2	R3	Tocophérols
CH₃	CH₃	CH₃	α
CH₃	H	CH₃	β
CH₃	CH₃	H	γ
CH₃	H	H	δ

H	H	H	Tocol
----------	----------	----------	--------------

Figure 10: Structure de la vitamine E (Januels, 2003).

Le radical tocophéryle est peu réactif et n'induit pas de nouvelles réactions radicalaires. Le tocophérol peut être régénéré par la vitamine C (Urton, 1986), le GSH (Stahl, 1997), et l'ubiquinone (Chan, 1991).

L'α-tocophérol est l'isomère le plus abondant et possède l'activité antioxydante la plus forte (figure 11) (Ernster, 1992).

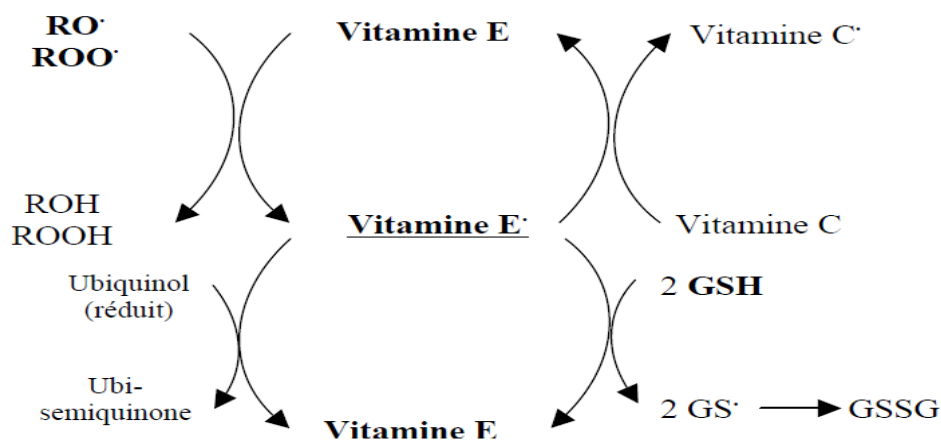


Figure 11: Régénération de la vitamine E (Chan 1991).

B. Les caroténoïdes

Sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O₂•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (**Valko et al., 2006**).

5.2. Les antioxydants hydrosolubles

A. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide L-ascorbique est une vitamine hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (**Koolman et al 1999**). Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ERO (O₂•-, HO•, 1O₂, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. L'organisation spatiale de la vitamine C lui permet de se lier à la phase aqueuse de la vitamine E oxydée dans la membrane cellulaire et de rapidement lui céder son électron. Après avoir cédé son électron, la vitamine C forme un radical très peu réactif, qui sera ensuite reconverti en vitamine C par une enzyme réductase, qui utilise du GSH (**Laren, 2007**).

B. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydants requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, le SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (**Garait 2006**). Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite (Fe²⁺), peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton) (**Kirschvink, 2008**).

C. Les groupements thiols

Les groupements thiols (au sein des résidus cystéines des protéines ou des petits peptides) dans leur forme réduite peuvent également piéger des radicaux libres (**Haleng, 2007**).

D. Le glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl- L-glycine) synthétisé par deux enzymes qui sont la γ -glutamylcysteine synthétase (γ -GCS) et la glutathion synthétase (**Ballatori, 1991**). Le GSH est considéré comme la molécule non-protéique possédant un groupement thiol, la plus répandue dans la cellule. Ce peptide est retrouvé en grande majorité dans les organes fréquemment exposés aux toxines (reins, foie, poumons et intestins) (**Gate, 1999**), tandis qu'une quantité limitée est retrouvée dans les fluides biologiques (**De Leve, 1991**). Sous sa forme réduite, le GSH agit comme antioxydant.

- En tant que piègeur de radicaux, il possède la capacité de lier «scavenger» directement les radicaux libres et de détoxifier indirectement les oxydants à travers des réactions enzymatiques (**Fang et al., 2002**);
- En tant que cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes (GSH-Px, GST);
- En participant à la détoxification des lipides hydroperoxydes par l'action de la peroxyredoxine 6;
- En régénérant l' α -tocopherol et l'acide ascorbique sous leur forme active (**Masella et al., 2005**).

Au cours de telles réactions, le GSH agit comme un donneur d'électrons en s'oxydant en GSSG. Le GSH est impliqué dans la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et dans la réduction des hydroperoxydes à travers une réaction catalysée par la GSH-Px (**Lei, 2002**).

Deuxièmement, le GSH peut se conjuguer aux xénobiotiques par une liaison directe/spontanée ou via une réaction catalysée par la GST, une réaction qui augmente les propriétés hydrophiles des xénobiotiques favorisant ainsi leur élimination. Troisièmement, le GSH peut se conjuguer au NO pour former un adduit S-nitrosoglutathion, lequel est clivé par le système thioredoxine pour régénérer le GSH et du NO (**Fang et al., 2002**). Sous sa forme GSH, GSSG et de son ratio GSH/GSSG, le glutathion est utilisé comme marqueur du système antioxydant et du stress oxydant (**De Moffarts et al., 2007**).

6. Rôle de la mitochondrie dans la production de ROS

a. La mitochondrie

La mitochondrie est présente dans la majorité des cellules eucaryotes (**Zhao et al., 2003**). Elle fournit, par sa synthèse de l'ATP, l'énergie indispensable au bon fonctionnement de la cellule vivante. Au cours d'une agression cellulaire, la mitochondrie peut se détourner de ce rôle physiologique et orienter le destin de la cellule vers la nécrose ou l'apoptose par l'intermédiaire du phénomène de la transition de perméabilité (**Bo, 2009**).

b. Le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire

Le transfert des électrons des coenzymes réduites à l'oxygène moléculaire par différentes réactions d'oxydoréduction est assuré par les 4 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, auquel est couplé le transport actif de protons vers l'espace intermembranaire, générant une différence de potentiel électrochimique.

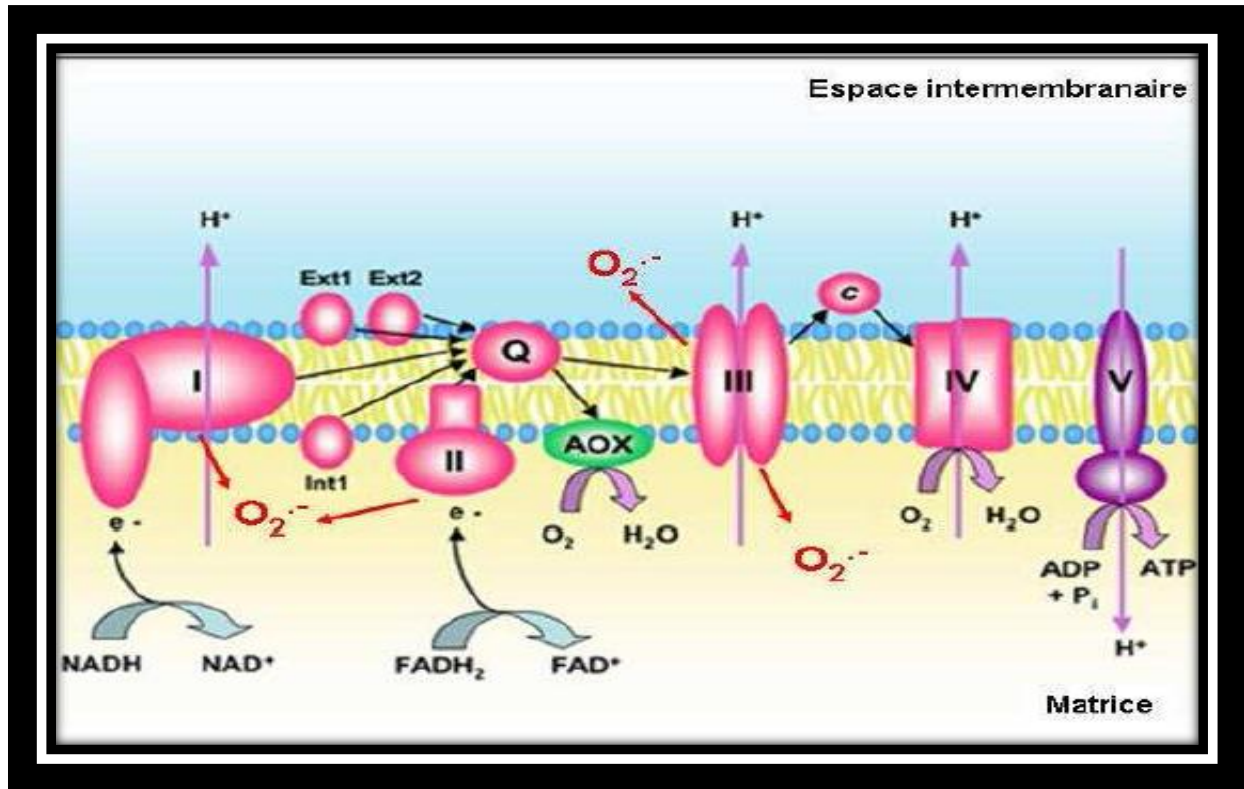


Figure 12: Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie (Lamprecht et al., 2004).

Les flèches rouges représentent les « fuites » d'électrons vers l'O₂ permettant de former des anions superoxydes.

Complexe I: NADH déshydrogénase;

Complexe II: Succinate déshydrogénase;

Complexe III: Cytochrome bc1;

Complexe IV: Cytochrome c oxydase;

Complexe V: ATPase;

Cytochrome C: NAD(P) H déshydrogénases externes.

Le flux d'électrons provenant du NADH matriciel est pris en charge successivement par le complexe I (NADH/ubiquinone reductase), l'ubiquinone (UQ), le complexe III (ubiquinol / cytochrome *c* réductase), le cytochrome *c*, le complexe IV (cytochrome *c* oxydase), et enfin l'oxygène moléculaire. Le flux d'électrons en provenance du FADH₂ suit le trajet : complexe II (succinate-ubiquinone-réductase), UQ, complexe III, cytochrome *c*, complexe IV, et enfin l'oxygène moléculaire. Dans les conditions physiologiques, une quantité très faible de l'oxygène réagissant avec la chaîne respiratoire est incomplètement réduit, principalement au niveau des complexes I et III, et donne ainsi naissance à des espèces radicalaires, qui ont des rôles importants de second messenger intracellulaire.

C. Les espèces actives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont des espèces chimiques, neutres ou chargées, qui ont la particularité de porter un électron célibataire (dit «non apparié») sur leur couche externe, ce qui les rend généralement instable et capable de réagir plus ou moins rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les ROS sont considérés comme des agents qui induisent des effets délétères, comme, la régulation des processus d'apoptose ou l'induction de la mort cellulaire (Saini *et al.*, 2004; Penna *et al.*, 2009).

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire de ROS: dans les cellules non phagocytaires, 80% de l'anion superoxyde provient du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène est réduit complètement en H₂O. Une proportion significative de l'oxygène (2% à 6%) échappe de la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Desagher *et al.*, 2000), pour donner naissance à l'ion superoxyde (O₂⁻).

Lorsque le fonctionnement de la chaîne respiratoire est normal et que le potentiel de membrane est faible, la production d'O₂⁻ par les complexes I et III s'effectue au cours du transfert des électrons du complexe I au cycle des quinones (forward electron transfer). Au niveau du complexe III, c'est le coenzyme Q, sous sa forme ubisemiquinone, qui est responsable de la production d'O₂⁻. Lorsque le potentiel de membrane est élevé (en l'absence d'ADP) et lorsque le FADH₂ est utilisé par le complexe II, il y a production d'O₂⁻ au sein du complexe I via le flux inverse d'électrons (reverse electron transfer) (Liu *et al.*, 2002; Loschen *et al.*, 1971).

1. Rappels sur les protozoaires

Les protozoaires appartiennent au règne des protistes (en grec protos = premier et zoo = animal). Les protozoaires sont des organismes unicellulaires microscopiques qui à cause de leur membrane nue, ne se retrouvent que dans les habitats humides ou aquatiques comme les océans, les lacs ou le sol. Ceux qui vivent dans le sol exploitent les micro-habitats humides retrouvés entre les granules. Les protozoaires n'ont pas de chlorophylle et se multiplient par mitose ou par reproduction sexuée. Chaque protozoaire est une cellule très spécialisée capable de remplir toutes les fonctions vitales, les protozoaires doivent se déplacer, digérer, respirer, éliminer leurs déchets par excrétion et se reproduire pour survivre. Les cellules protozoaires se constituent d'un noyau, de vacuoles, de mitochondrie, d'un réseau de membranes et d'une flagelle pour leur permettent de se déplacer (**Patterson, 1999**).

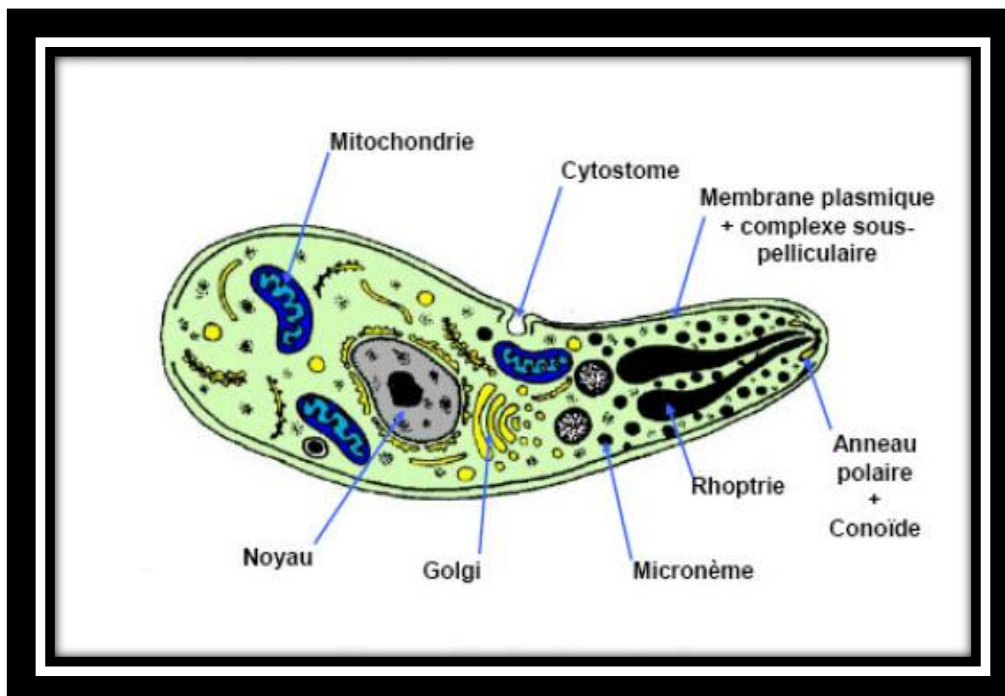


Figure 13: Schéma d'une cellule protozoaire (Chafai, 2012).

2. Les principaux types de protozoaires

On leur distingue cinq sous-embranchements:

- 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 Spiotriches ayant une ciliature buccale en spirale à droite (Stylonichia).
 - Les Péritriches ayant une ciliature buccale en spirale à gauche (vorticelle) (Sbartai, 2005).

3. Les paramécies

3.1. Rappels sur la Paramécie (*Paramecium sp*)

C'est une cellule allongée de grande taille 70-350 µm (Malinsky et al., 2010). Les cils vibratiles forment un revêtement continu sur toute la surface. Sur un des côtés, une large dépression sert à la capture des proies: le Cytostome ou Péristome qui marque la face ventrale de la Paramécie. Il se prolonge dans le cytoplasme par un Cytopharynx pourvu d'une membrane elle dont les mouvements entraînent les particules alimentaires au fond. Il se forme alors une vacuole alimentaire par endocytose. Quand la vacuole se détache de la membrane plasmique, une autre se forme aussitôt une succession de vacuoles traversent le cytoplasme en suivant un trajet défini pendant lequel il y a fusion avec des lysosomes primaires et digestion de leur contenu. Après la digestion, les vacuoles s'ouvrent vers l'extérieur en dessous du péristome et forment un orifice provisoire: le Cytoprocte.

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 (Benbouzib, 2012).

La Paramécie possède des trichocystes disposés régulièrement entre les grains basaux et les cils. Elle possède deux vacuoles pulsatiles qui fonctionnent alternativement : quand l'une est en diastole, l'autre est en systole. Il possède deux noyaux l'un est un petit noyau, le Micronucléus diploïde à rôle reproducteur ; et un gros noyau, le Macronucléus polyploïde à rôle purement végétatif.

Le paramécium est abondants dans les eaux contenant du matériel organique en décomposition où ils se nourrissent principalement des bactéries responsables de cette décomposition.

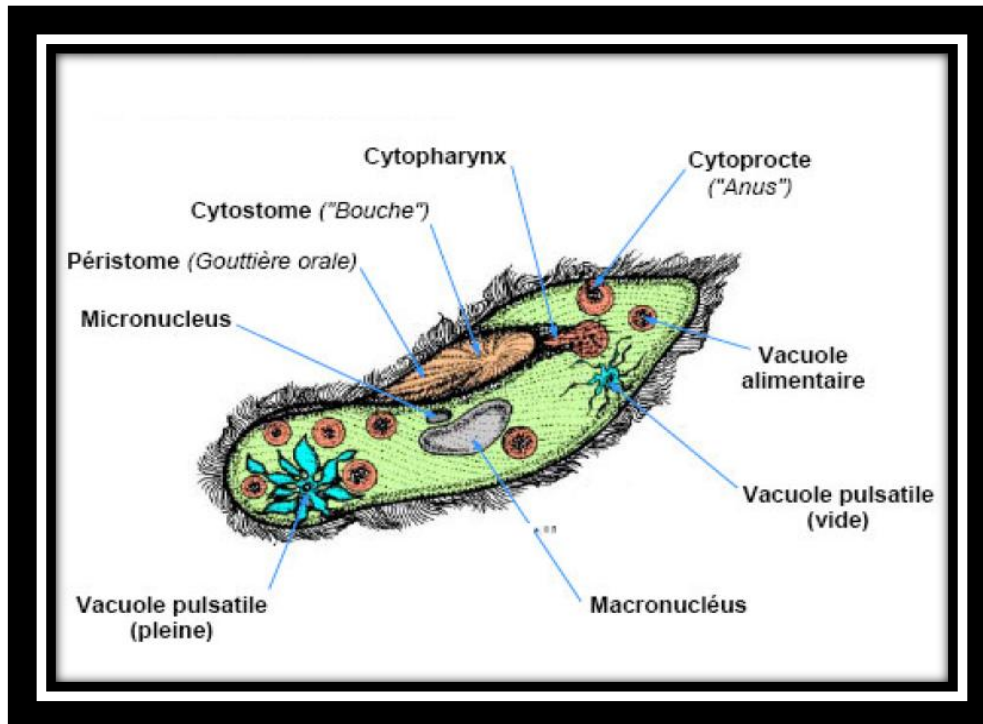


Figure 14: Structure d'une paramécie (Chafai, 2012).

3.1.1. 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 (Wichterman, 1953).

3.1.2. 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 (Azzouz, 2012).

3.1.3. Reproduction

Les paramécies se reproduisent par:

- **Division cellulaire:** les micronucleus se divisant par mitose, le macronucléus se divisant simplement en deux micronucleus fils.
- **Conjugaison:** la conjugaison des paramécies est un processus sexuel de recombinaison génétique (des paramécies individuelles échangent un micronucleus pendant la recombinaison), mais ce n'est pas un processus de reproduction. Les deux

mêmes cellules débutent et achèvent le processus et aucune nouvelle cellule n'est créée (Sbartai, 2005).

4. Choix de *Paramecium sp* Comme modèle biologique

L'espèce que l'on utilise lors de notre étude est choisie afin de répondre au mieux à ces critères, qui se traduisent par les contraintes suivantes:

- Le taxon est présent, abondant et facilement identifiable (Marchese et Brinkhurst., 1996).
- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala et al., 1999).
- Leur facilité à être cultivé en laboratoire, leur manipulation rapide (cycle de vie court) ainsi que leur moindre coût (Beal et Anderson 1993; Kamola 1995).
- Il est sensible au produit testé (Mc Pherson et Chapman 2000).
- Produit et éventuellement sa bioaccumulation (Chapman, 2001).
- 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).

Partie II:
Etude expérimentale

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé une culture pure d'un micro-organisme uni-cellulaire d'eau douce: *Paramecium sp.* qui constitue un bon bio-indicateur de pollution chimique d'eau douce de plus ; les paramécies présentent des caractères physiologiques comparables à celle des cellules épithéliales des êtres humains, ce protiste constitue un excellent modèle biologique pour la modélisation des tests de cytotoxicité.

1.2. Matériel chimique

Les nanoparticules d'oxyde de fer se situent à une échelle moléculaire comprise entre celle d'une molécule d'ADN de 2.5nm de large et celle d'un globule rouge humain de 800nm de diamètre. Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques.

2. Méthodes

2.1. Méthodes de culture des paramécies

La méthode utilisée est celle de **(Beaumont et cassier, 1998)** et comprend:

a. Une culture mixte: il est effectué selon les étapes suivantes

- Du foin est coupé en petits morceaux et infusé dans un récipient contenant de l'eau de robinet ou l'eau de pluie c'est possible.
- La préparation est laissée dans un lieu tiède (15 à 20°C), sombre et bien aéré. Quelques jours plus tard (3 à 4 jours) apparaît un voile bactérien sur la solution.
- On filtre l'infusion et on observe, sous microscope optique et sans coloration, les premiers ciliés (Ces organismes se nourrissent au dépend du voile bactérien).

b. Une culture pure (repiquage): Pour suivre pendant plusieurs semaines la descendance d'une paramécie ou pour obtenir un grand nombre de ces Protozoaires, il est nécessaire de réaliser des cultures pures **(Wichterman, 1953)**. Le milieu de culture est préparé selon la méthode de **(Beisson et al., 2010)**.

- Pour obtenir une culture pure nous avons utilisé l'infusion des laitues
- On fait une répartition du milieu de culture dans des flacons de 250 ml puis, on filtre le liquide chaud.
- On Laisse reposer au moins une nuit avant l'ensemencement **(Beaumont et Cassier, 1998)**.
- L'ensemencement: il se fait au fur et à mesure des besoins, le milieu est dilué (2 parts de milieu de culture mère pour une part d'eau distillée).

- On récupère quelques cellules des paramécies à l'aide d'une pipette et on l'ajoute au milieu de culture.
- On laisse 48h, qui est le temps nécessaire pour la multiplication des paramécies.

2.2. Mode de traitement

On subdivise la culture sur 9 érlenmeyers contenant chacun 200ml de culture pure, nous avons retenu deux concentrations croissantes de nanoparticule d'oxyde de fer, comme le suivant:

- Trois érlenmeyers pour les témoins;
- Trois érlenmeyers pour la **D1** = 7.5×10^{-2} mg/ml;
- Trois érlenmeyers pour la **D2** = 0.1 mg/ml

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 200 ml de culture pure de *Paramecium sp.*

3. Tests de cytotoxicité chez les paramécies

3.1. Mesure de la cinétique de croissance

La cinétique de croissance des paramécies est effectuée par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 600$ nm en fonction du temps (**Lavergne 1986; Sauvart et al., 1999**).

T0h: Observation microscopique + lecture de la densité optique (600nm)

T1h: Observation microscopique + DO

T2h: Observation microscopique + DO

T3h: Observation microscopique + DO

T4h: Observation microscopique + DO

T5h: Observation microscopique + DO

T6h: Observation microscopique + DO

T24h: Observation microscopique + DO

T48h: observation microscopique + DO

T72h: observation microscopique + DO

T96h: observation microscopique + DO

T120h: observation microscopique + DO

T288 h: observation microscopique + DO

L'observation microscopique est réalisée sous un microscope photonique au grossissement x 40.

Lors de ces observations on prend en considération : le mouvement, morphologie, la taille, nombre, et la division cellulaire.

3.2. Comptage des cellules

On détermine le nombre des paramécies par le comptage des cellules présent dans un 1ml de la culture, selon les étapes suivantes:

- On prélève des gouttes de 5µl trois fois de chaque échantillon, puis on dispose sur une lame.
- On réalise le comptage des cellules sous un microscope optique.
- Le nombre des cellules vivantes correspond à la moyenne obtenue des trois répétitions

Le comptage des cellules nous permettons de calculer le Pourcentage de réponse, le nombre et le temps de génération.

3.3. Calcul du pourcentage de réponse

C'est une évaluation de la réponse du protiste vis-à-vis de la nanoparticule d'oxyde de fer, les valeurs positives de pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance, tandis que les valeurs négatives de pourcentage de réponse indiquent une stimulation de la croissance (**Wong et al., 1999**).

$$PR = \frac{CN - EN}{CN} \times 100$$

PR: pourcentage de réponse

CN: nombre des cellules témoins

EN: nombre final des cellules traitées

3.4. Détermination du nombre et temps de génération

a. Le nombre de génération

Le nombre de génération est l'un des paramètres qui permettent d'évaluer la toxicité de NPs d'oxyde de fer vis-à-vis des paramécies.

On choisi le 2^{ème} et le 1^{er} jour pour calculer le nombre et le temps de génération selon la formule suivantes:

$$N = \frac{\log N1 - \log N2}{\log N2}$$

- **N:** nombre de génération
- **N1:** nombre des protozoaires au 2^{ème} jour
- **N0:** nombre des protozoaires au 1^{er} jour

b. Temps de génération

Le nombre de génération est déterminé selon la formule suivante :

$$G = \frac{\text{temps de croissance}}{N}$$

- **G** : temps de génération
- **Temps de croissance**: 24 heures
- **N** : nombre de génération

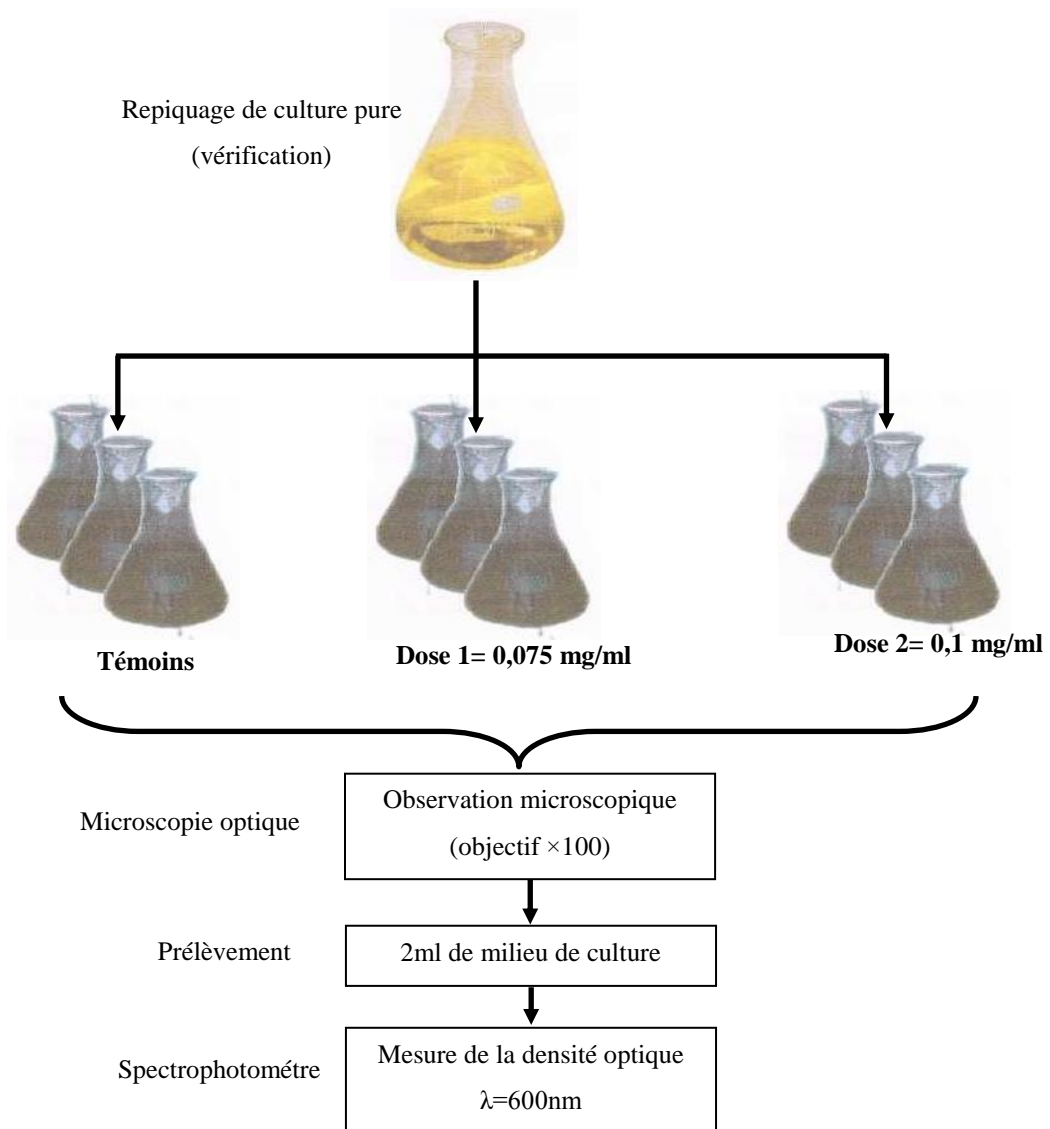


Figure 15: Tests de Cytotoxicité des paramécies traitées par les molécules: le Zn et vit D et Zn/vitD

4. Dosage des paramètres biochimique

4.1. Dosage des métabolites

4.1.1. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de **(Bradford, 1976)** qui utilise le bleu brillant de coomassie (BBC) comme réactif et (B.S.A) comme standard. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de B.S.A. (1 mg/ml) et le B.B.C (conservation environ 21 jours à 4°C) qui se prépare comme suit:

- 100 mg de BBC + 50 ml d'éthanol Agitation pendant deux heures.
- 100 ml d'acide orthophosphorique sont alors ajoutés et le tout est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée.
- Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100ml).
- Les absorbances ont été lue à une longueur d'onde de 595 nm.

4.1.2. Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de **(Goldsworthy et al. 1972)**. Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide orthophosphorique à 85% et 55 ml d'eau distillée) et une solution mère de lipides (2,5mg/ml) comme standard.

Et additionné 1 ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les tubes sont chauffés un bain marie (100°C pendant 10 min); de chaque tube 200 µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5 ml de réactif.

Les absorbances sont lues après 30 mn d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm.

4.1.3. Dosage des glucides

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959)**.

Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard , la méthode consiste à:

Additionner à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant des différents échantillons, 4 ml de réactif d'anthrone.

- Chauffer le mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min) une coloration verte se développe.
- L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm.

5. Dosage des biomarqueurs non enzymatiques

5.1. Malonaldéhyde (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosé selon la méthode de **(Buege and Aust, 1984)** Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) dans un milieu acide et chaud (100°C) en donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

Protocole expérimental

- Prélever 375 µl de surnageant.
- Ajouter 150 µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- Prélever 400 µl de surnageant.
- Ajouter 80 µl d'HCl 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.
- Lue La densité optique à $\lambda = 530$ nm.

L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

$$[C] \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg}} \text{ de protéines} \right) = \frac{DO \times 10}{\varepsilon \times L \times X \times Fd}$$

- **C** : la concentration en nmole/mg de protéines
- **DO** : densité optique lue à 530 nm
- ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \cdot 10^5$ M⁻¹/cm
- **L** : Longueur de la cuve utilisée (1cm).
- **X** : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml)
- **Fd** : Facteur de dilution (Fd = 0.2083).

5.2. Dosage du glutathion (GSH)

Principe de la méthode

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

Protocole expérimental

- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours/min pendant 5minutes.
- Prélever 0,5 de surnageant.
- 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 contre le blanc

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

$$GSH \left[M \frac{GSH}{mg} \right] = \frac{DO \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5}$$

- **DO** : la densité optique
- **1**: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml de l'homogénat+0,2ml de l'acide salicylique).
- **1,525** : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).
- **13100** : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à 412 nm).
- **0,8** : Le volume de l'homogénat.
- **0,5** : Le volume du surnageant trouvé dans un 1,25ml.

6. Dosage des biomarqueurs enzymatiques

6.1. Dosage de l'activité du catalase (CAT)

L'activité du catalase est déterminée selon la méthode de (Cakmak et Horst, 2003) Le principe repose sur la disparition de l' H_2O_2 à 25°C par la présence du catalase.

Protocole expérimental

- On prélève 100µl de l'extrait enzymatique brute + 500µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3 ml.
- On ajoute 2850µl de TP (50mM, PH= 7,2).
- La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

La réaction est contrôlée par une lecture continue pendant 15 minutes durant 1 minute à une longueur d'onde à 240 nm.

$$L'activité\ de\ CAT\ (MH_2O_2/min/m\ protiens) = \frac{\Delta DO \cdot VT}{\epsilon \cdot L \cdot X \cdot Ve}$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes en fonction du temps
- ϵ : Coefficient d'extinction du H_2O_2 ($3900\ \mu M^{-1} \cdot Cm^{-1} \cdot L$)
- L : largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1cm)
- X : quantité des protéines en mg/ml
- Vt : volume totale du mélange réactionnel en ml
- Ve : volume de l'extrait enzymatique en ml

6.2. Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST)

Principe de la méthode

La mesure de l'activité de GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro, 2.4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec des glutathion sous l'action de nombreuses forms de GST. La réaction de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340nm de longueur d'onde.

Protocole expérimental

La méthode utilisée dans cette étude pour doser le GST est celle de (**Habig et al., 1974**) celle-ci consiste à faire agir le GST contenue dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 15 minutes durant 1 minute à une longueur d'onde de 340 nm. Selon les étapes suivantes:

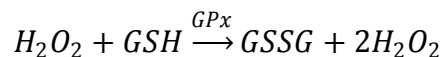
- Les échantillons sont homogénéisés dans un 1ml de TP (0,1 M, PH=6)
- Centrifuger à 1400 tours/min.
- Récupérer le surnageant comme source d'enzyme.
- Prélever 200µl de surnageant et ajoute 1,2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM).
- Le blanc contenant 200µl d'eau distillé remplaçant la quantité de surnageant.

$$\text{L'activité de la GST} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc}}{9,6 \text{ mg de protéine}}$$

- **DO:** échantillon/min : densité optique de l'échantillon par minute
- **DO blanc/min:** densité optique du blanc par minute
- **9,6:** coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

6.3. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de (**Flohe et Gunzler, 1984**). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence du glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de GPx selon la réaction suivante :



Protocole expérimental

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant);
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM);
- Ajouter 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4);
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min;
- Ajouter 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes;
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction;
- Mettre le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes;

- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes;
- Prélever 0.48ml de surnageant;
- Ajouter 2.2ml de solution tampon TBS;
- Ajouter 0.32ml de DTNB (1mM);
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante:

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

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

6.4. Dosage du cytochrome c oxydase

L'activité du cytochrome c oxydase est mesurée selon la méthode de (**Wharton et Tzagoloff, 1967**). Le cytochrome c oxydase, enzyme de la membrane interne mitochondriale assure le transfert d'électrons du ferrocyclochrome c aux molécules d'O₂. On peut suivre

- L'activité enzymatique peut être suivie par la mesure de l'oxydation du cytochrome c réduit à un logeur d'onde $\lambda = 550$ nm car seule la forme réduite absorbe à cette longueur d'onde.
- Le cytochrome c réduit est préparé dans du tampon phosphate (K₂HPO₄ 7,5 mM/KH₂PO₄ 7,5 mM pH 7,4) à une concentration finale de 3 mM;
- Une pointe de spatule de sodium dithionite est ajoutée de manière à réduire le cytochrome c.
- Pour chaque échantillon on ajoute, 950 μ l de tampon phosphate et 20 μ l de la fraction à doser sont bien agités et pré-incubés 2 min à 25°C (les mitochondries éclatent ainsi dans ce milieu très hypotonique).
- L'absorbance est mesurée à un logeur d'onde $\lambda = 550$ nm.

7. Isolement et gonflement mitochondrial

L'isolement des mitochondries a été effectué selon la méthode de (**Kristal et al., 1996**).

Protocole expérimentale

- Préparer l'homogénat à partir de 2ml de culture de chaque erlenmeyer dans 4ml de tampon d'isolement (210 Mm Manitol, 70 mM sucrose, 1Mm Tris-Hcl pH 7,5, 1Mm EDTA pH 7,5).

- Transférer l'homogénat dans des épindorfes pour faire des centrifugations différentielles à 4°C (1000 tours /min).
- Jeter le surnageant et récupérer les culots qui contiennent essentiellement les mitochondries pures.
- Laver les mitochondries 2 fois par le tampon d'isolement.
- Remettre le culot dans 1 ml de tampon de respiration.
- Les absorbances lue à un logeur d'onde $\lambda = 520\text{nm}$.
- On suivre le volume mitochondriale lors de l'injection des ions de calcium à partir d'une solution préparé (100mg Ca/100ml).
- Ajouter 20 μl de solution calcique ; ensuite la lecture à un logeur d'onde $\lambda = 520\text{nm}$.

Analyse statistique

Les résultats obtenues sont traités sous la forme de (moyenne \pm écartype) et ensuite sont représenté en des graphes à l'aide de Microsoft office Excel 2010.

Le test statistique réalisé dans cette partie est l'ANOVA II à l'aide de logiciel Minitab (Version 17.01), il s'agit de l'analyse de variance à deux facteurs contrôlés et ce en fonction du temps et des concentrations.

L'ANOVA permet d'effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes.

1. L'effet de Fe_3O_4 -NPs sur les paramètres morphologiques

1.1. Observation microscopique

Après exposition des paramécies aux deux concentrations croissantes des nanoparticules de Fe_3O_4 . Observées au microscope optique, les paramécies témoins ont des formes normales allongées (figure 16 et 17) avec un déplacement selon une trajectoire bien définie. En revanche les paramécies traitées devient enkysté (figure 19 et 20) et présente une diminution de leur taille (figure 21) ces changements morphologiques sont dose-dépendantes.

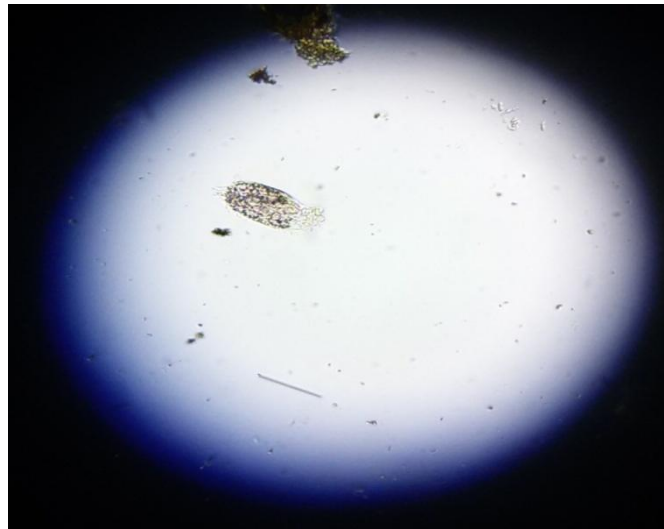


Figure 16: Observation microscopique des paramécies témoins au 7^{ème} jour. ($\times 10$)



Figure 17: Observation microscopique des paramécies témoins au 12^{ème} jour après. ($\times 10$)

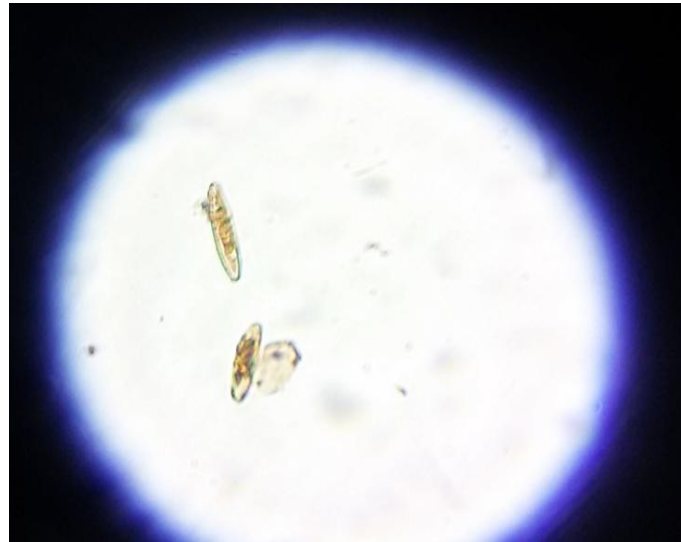


Figure 18: Observation microscopique des paramécies au 7^{ème} jour traité par 7.5×10^{-2} mg/ml de Fe_3O_4 -NPs. ($\times 10$)

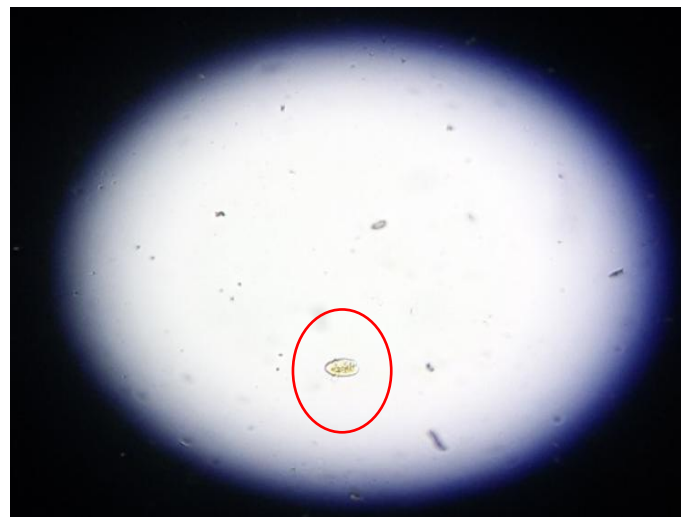


Figure 19: Observation microscopique des paramécies au 12^{ème} jour traité par 7.5×10^{-2} mg/ml de Fe_3O_4 -NPs. ($\times 10$)

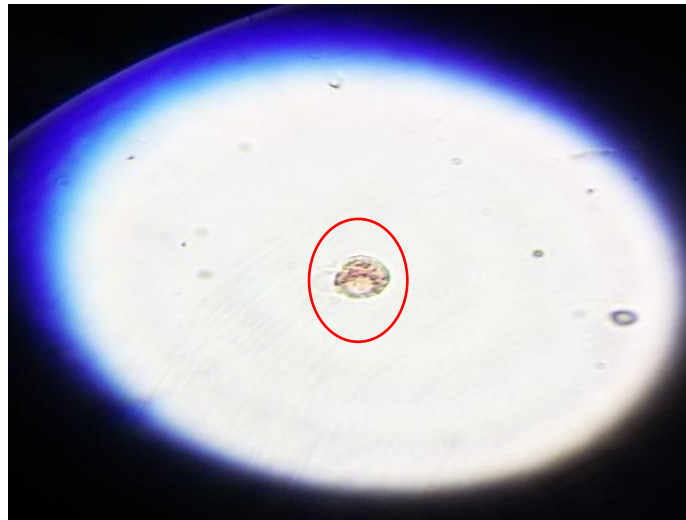


Figure 20: Observation microscopique des paramécies de la 7^{ème} jour traité par 0.1 mg/ml de Fe₃O₄-NPs. (×10)



Figure 21: Observation microscopique des paramécies du 12^{ème} jour traité par 0.1 mg/ml de Fe₃O₄-NPs. (×10)

1.2. L'effet du Fe₃O₄-NPs sur la mobilité des paramécies

L'observation microscopique montre qu'en fonction du temps et la dose, les paramécies se déforment et la mobilité et leur trajectoire est perturbée de plus, on remarque une réduction du mouvement en tourbillon crée par le battement des cils chez les paramécies en présence de concentration élevée des nanoparticules de Fe₃O₄, car il est connu que la paramécie avance en tournant autour de son axe longitudinal, selon un mouvement hélicoïdal.

1.3. L'effet du Fe₃O₄-NPs sur la croissance des paramécies

La figure (22) illustre l'effet de Fe₃O₄-NPs sur l'évolution de la croissance de la densité optique des paramécies, traduisant ainsi les variations de la croissance cellulaire.

Ainsi, nous constatons que pour les témoins, la croissance semble augmenter progressivement jusqu'à la 7^{ème} jour où la DO est de 0.42 nm pour atteindre à la fin du traitement 0.52nm.

Cependant, pour les traitées par les deux concentrations, la croissance semble être affectée.

A partir de 3^{ème} jour de traitement, nous constatons une diminution progressive de la DO qui sera plus prononcée et très hautement significative ($p \leq 0.001$) pour la plus forte concentration.

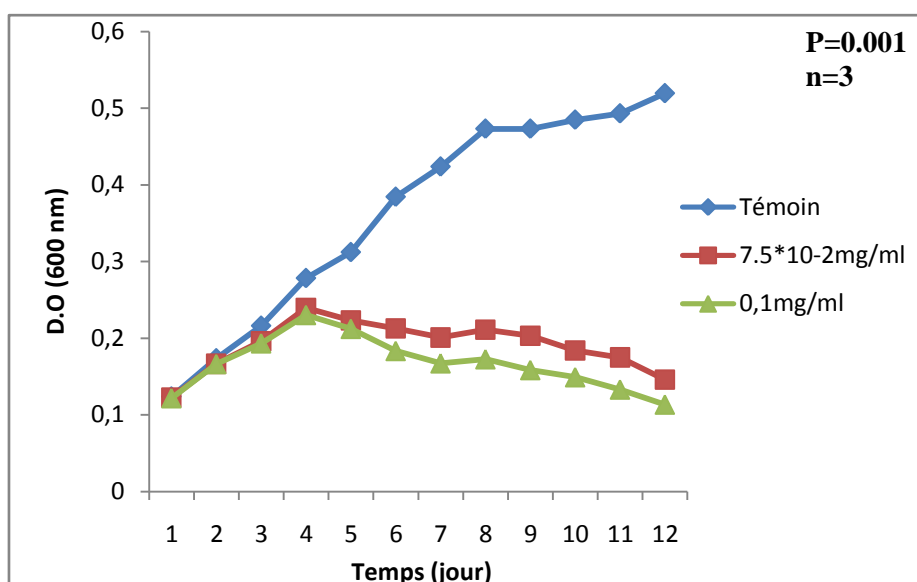


Figure 22: Cinétique de la croissance de la DO des paramécies témoins et traitées aux Fe₃O₄-NPs en fonction du temps.

1.4. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur le nombre des paramécies

La figure (23) représente l'évolution du nombre de cellules, en fonction du temps, on observe que dès la mise en contact du xénobiotique avec les cellules et jusqu'à 2^{ème} jour de traitement le nombre de cellules témoins et traitées évoluent de manière similaire.

A partir de 2^{ème} jour de traitement aux nanoparticules, nous constatons une différence dans l'évolution de la courbe de croissance; cette différence s'intensifie en fonction du temps et à partir de 4^{ème} jour de traitement, nous constatons une diminution très hautement significative et dose dépendante de la croissance ($p \leq 0.001$) des paramécies traitées par rapport

aux témoins. Cette diminution se poursuit en fonction du temps, elle est plus marquée pour la plus forte concentration d'oxyde de fer.

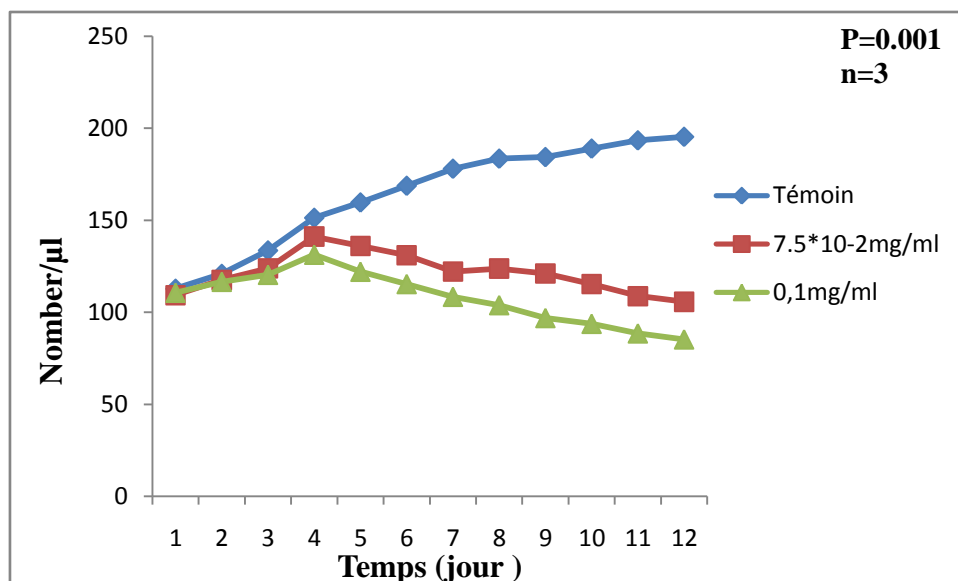


Figure 23: Effet de Fe_3O_4 -NPs sur la croissance des paramécies en fonction de temps.

1.5. L'effet de Fe_3O_4 -NPs sur la vitesse des paramécies

La figure (24) représente la vitesse des paramécies traitées par deux concentrations croissantes de nanoparticule d'oxyde de fer. Nous constatons que pour les témoins, la vitesse semble non affectée cependant, pour les traitées on remarque qu'il y a une diminution significative de la vitesse de déplacement chez les traitées par la dose 1 que chez de la dose 2 la vitesse est dose –dépendant.

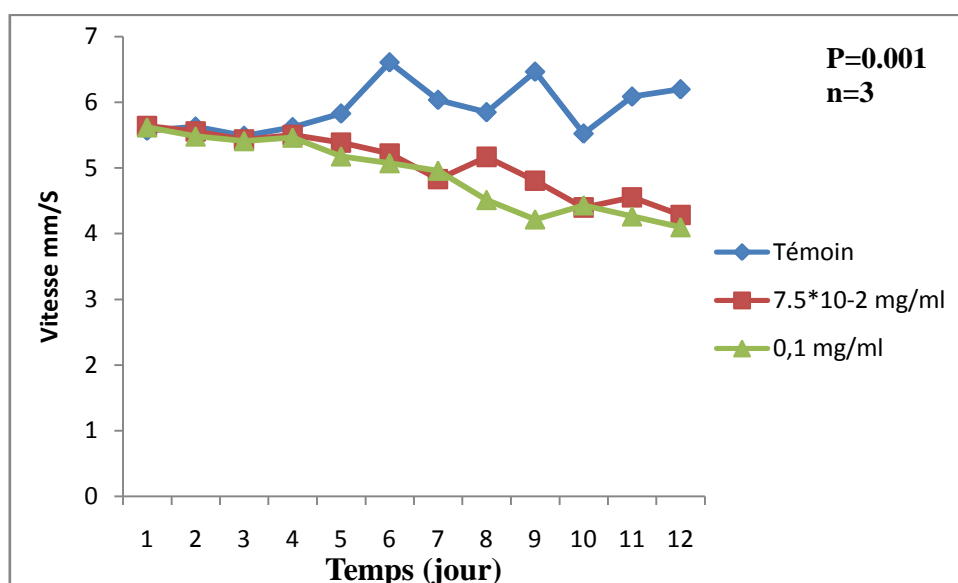


Figure 24: Effet de Fe_3O_4 -NPs sur la vitesse des paramécies en fonction du temps.

1.6. Pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse permet d'évaluer les effets de Fe_3O_4 -NPs aux différentes concentrations sur la viabilité des paramécies et confirmer ainsi les résultats obtenus concernant la cinétique de croissance du protiste.

La figure (25) illustre le pourcentage de réponse des paramécies traitées par deux concentrations croissantes des nanoparticules de Fe_3O_4 .

On remarque que le pourcentage de réponse est positif pour les deux concentrations de Fe_3O_4 -NPs testée et se pourcentage évolue d'une manière dose-dépendante et proportionnelle aux concentrations croissantes de Fe_3O_4 . Ainsi, Il est de 45,90% pour la concentration 7.5×10^{-2} mg/ml et atteint 56,34% à la concentration 0.1 mg/ml.

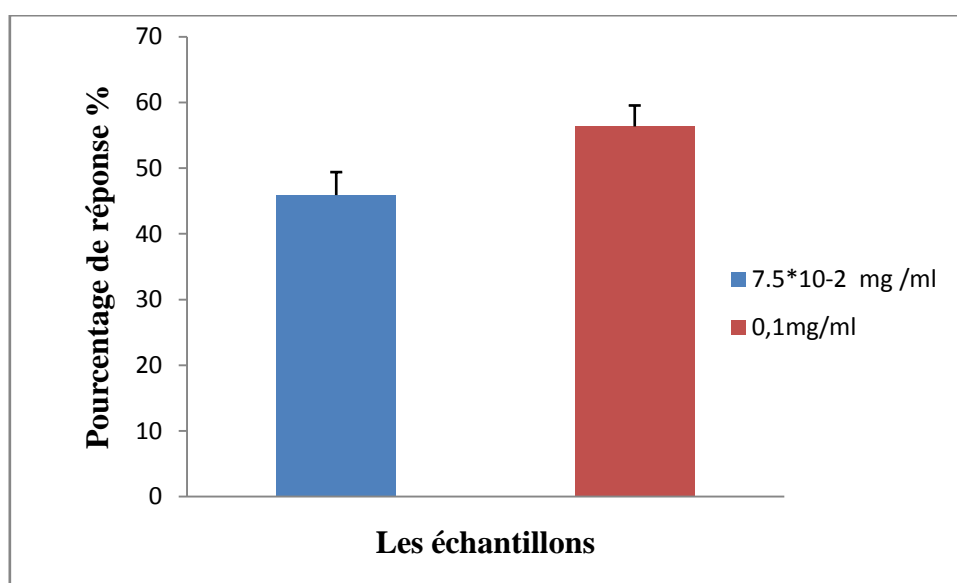


Figure 25: Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs.

1.7. Le nombre de génération

Le graphe du nombre de génération offre des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet toxique de Fe_3O_4 -NPs.

La figure (26) représente les variations du nombre des paramécies en fonction du temps, nous constatons une diminution progressive et très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport au témoin, ce taux de diminution est de manière significative pour la concentration de 7.5×10^{-2} mg/ml que celle de 0.1 mg/ml.

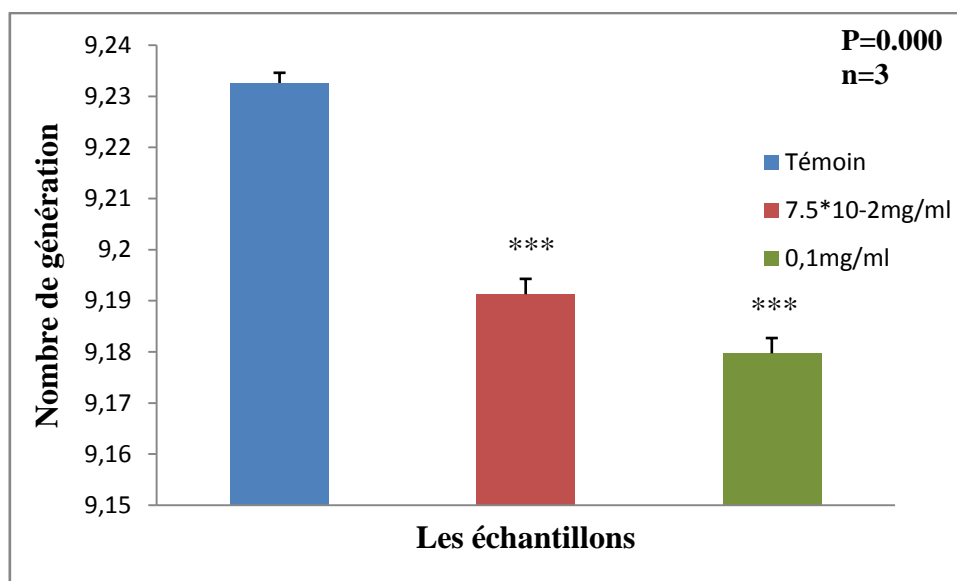


Figure 26: Effet de Fe_3O_4 -NPs sur le nombre de génération des paramécies.

1.8. Temps de génération

La figure (27) représente les variations du temps de génération des paramécies en fonction du temps, nous constatons une augmentation progressive et très significative du temps de génération des paramécies traitées par rapport aux témoins. On constate que le temps de génération augmente en fonction des concentrations (effet dose –dépendante).

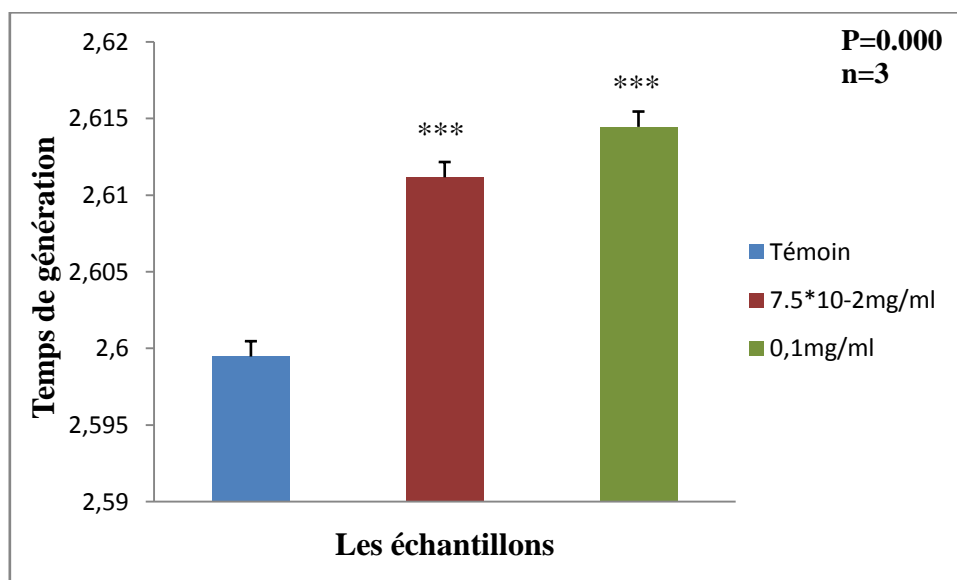


Figure 27: Effet de Fe_3O_4 -NPs sur le temps de génération des paramécies.

2. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur les métabolites des paramécies

2.1. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux des protéines

Les variations du taux de protéines totales chez les paramécies témoins et traitées sont représentées dans la figure (28).

Nous constatons que chez les traités, le taux de protéines totales augmente de manière dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport aux témoins particulièrement la plus forte concentration. En effet ce taux passe de 0.066 $\mu\text{g/ml}$ chez les cellules témoins à 0.076 $\mu\text{g/ml}$ pour la concentration de 7.5×10^{-2} mg/ml et atteindre 0.11 $\mu\text{g/ml}$ après le 7^{ème} jour de traitement et l'évolution de taux de protéine dans le 12^{ème} jour de traitement et semblable l'augmentation de taux de protéine est dose-dépendante.

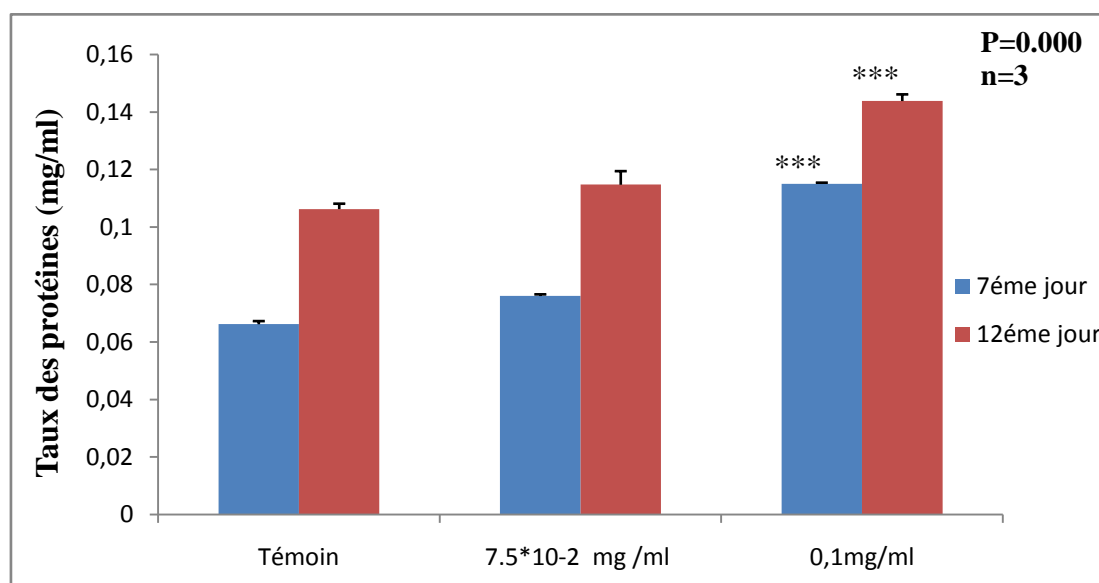


Figure 28: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux de protéines totales en fonction du temps.

2.2. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux des lipides

La figure (29) illustre les variations de taux de lipides en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes des nanoparticules. Nous remarquons que ce taux diminue de manière dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$) dès 7^{ème} jour de traitement pour les deux concentrations.

Cet effet persiste jusqu'à le 12^{ème} jour de traitement, avec une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) pour les concentrations de 0.1 mg/ml. En effet le taux de lipides passe de 32 $\mu\text{g/ml}$ pour les témoins de 7^{ème} jour après traitement et cette quantité augmente pour atteindre 39.41 $\mu\text{g/ml}$ pour les témoins de 12^{ème} jour.

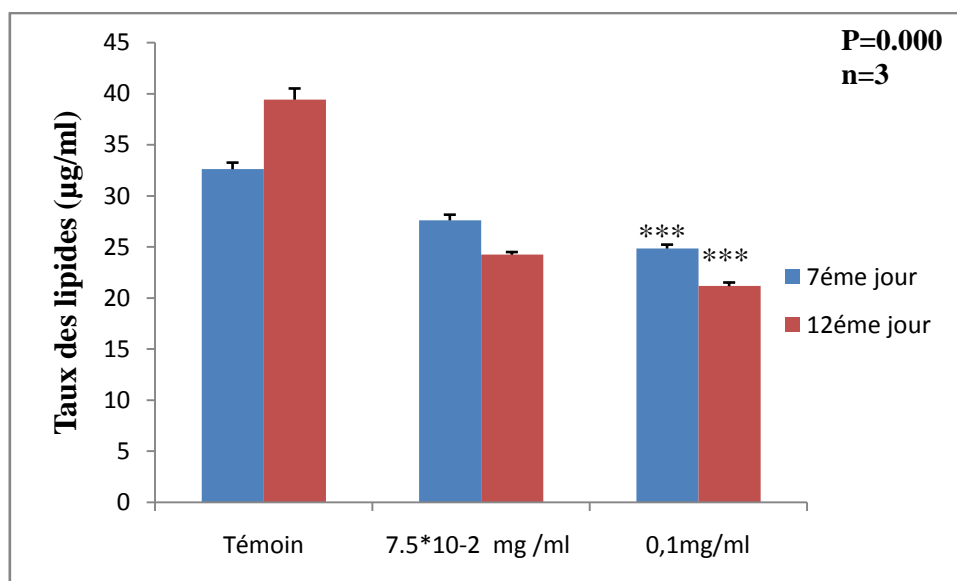


Figure 29: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux de lipides en fonction du temps.

2.3. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux des glucides

La figure (30) représente les variations du taux de glucides observées chez les paramécies témoins et traitées avec deux concentrations croissantes des nanoparticules de Fe₃O₄. Nous constatons que ce taux diminue de manière très hautement significative pour les concentrations de 7.5×10^{-2} mg/ml et 0.1 mg/ml. En effet, ce taux est de 33.13 µg/ml chez les cellules témoins est diminuée pour atteindre 28.28 µg/ml pour les traités avec la concentration de 7.5×10^{-2} mg/ml et 25.84 µg/ml pour les traités avec la concentration de 0.1 mg/ml dans la 7ème jour après traitement, cet effet se poursuit jusqu'à la 12^{ème} jour de traitement, avec une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) et dose-dépendante du taux de glucides chez les paramécies traitées par les différentes concentrations d'oxyde de fer par rapport aux témoins.

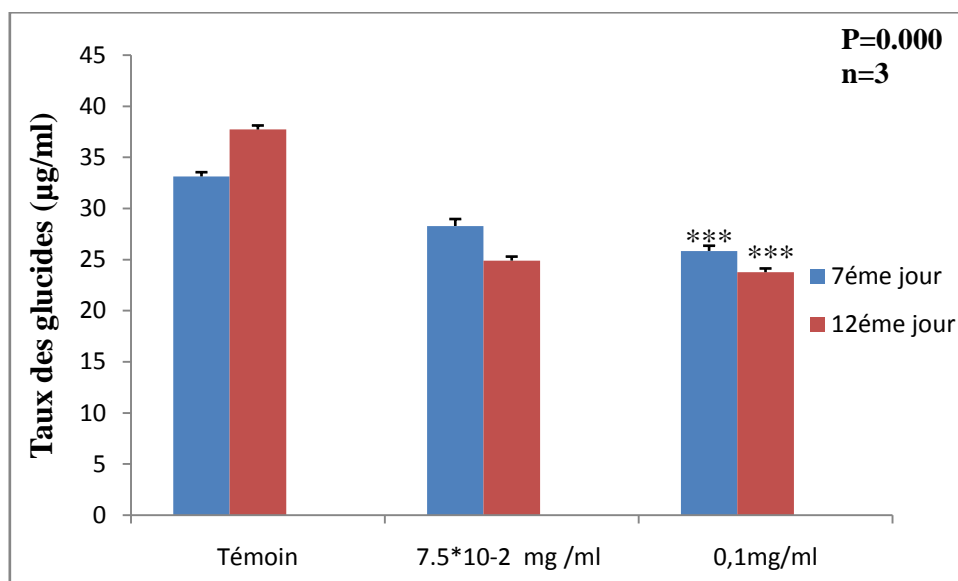


Figure 30: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux des glucides en fonction du temps.

3. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur les biomarqueurs non enzymatiques

3.1. Effet de Fe₃O₄-NPs sur l'évolution du taux de MDA

La figure (31) représente les variations du taux de MDA observées chez les paramécies traitées avec deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs. Nous remarquons que ce taux tend à augmenter d'une manière très hautement significative ($p \leq 0.001$) et ce pour les deux concentrations testées.

En effet ce taux passe de 2,03µM/mg de protéines chez les traités par la plus forte concentration d'oxyde de fer après 7^{ème} jours de traitement à 2,49µM/ mg de protéines après 12 jours de traitement. En revanche, le taux de MDA reste constant chez les témoins avec une valeur ne dépassant pas 1,36 µM.

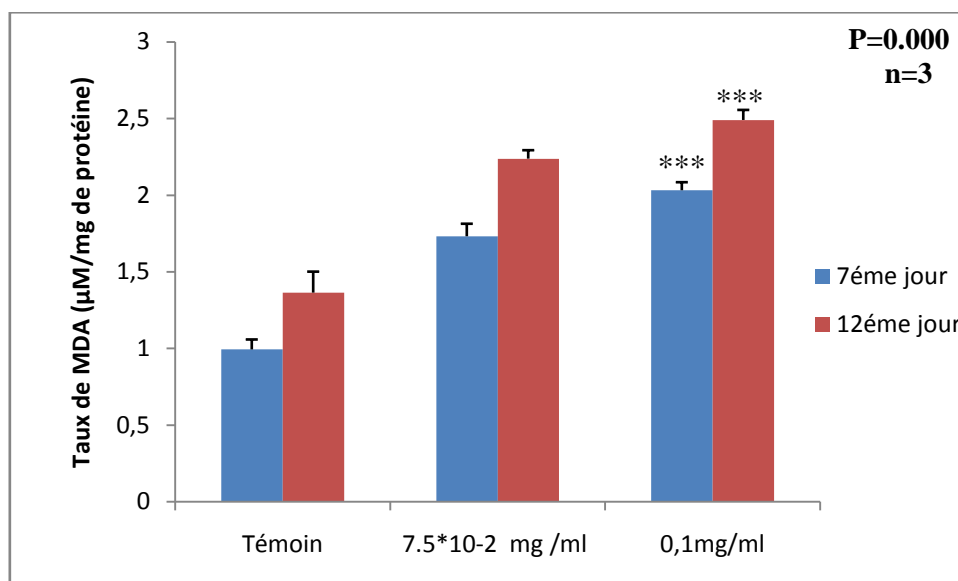


Figure 31: Effet de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur taux de MDA en fonction du temps.

3.2. L'effet de Fe_3O_4 -NPs sur le taux de GSH

La figure (32) illustre l'effet de Fe_3O_4 -NPs sur l'évolution du taux de GSH chez les paramécies témoins et traitées en fonction du temps.

Nous remarquons que le taux de GSH tend à diminuer de manière hautement significative ($p \leq 0.001$) dès 12 jours de traitement et ce par rapport aux témoins, cette diminution est dose-dépendante. Ainsi, à 12 jours de traitement, le taux de GSH, ne dépasse pas $8,4785\text{E}-08 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines pour la plus forte concentration alors qu'il est de $1,0804\text{E}-07 \mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine après 7 jours de traitement, En revanche, le taux de GSH reste constant chez les témoins.

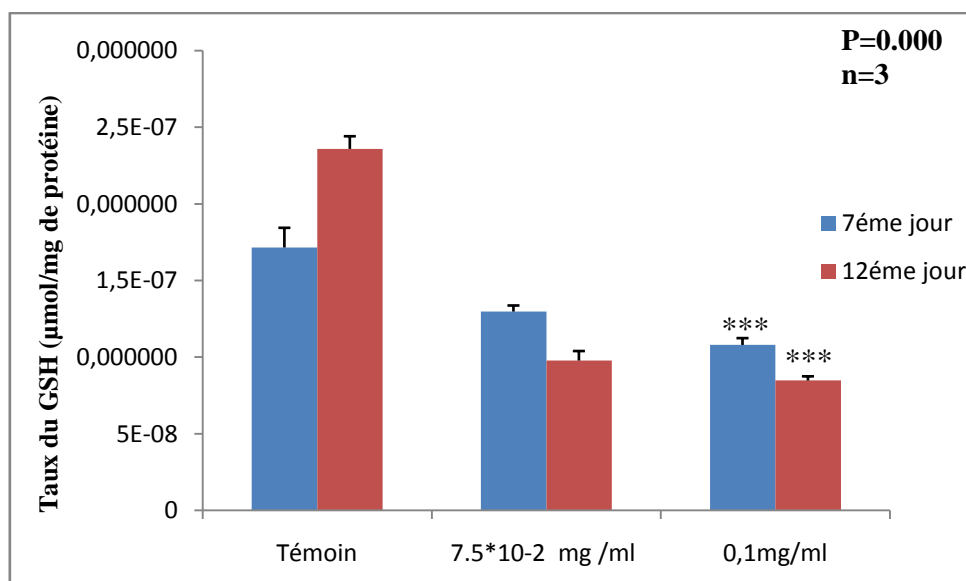


Figure 32: Effet de concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur l'évolution du taux de GSH en fonction du temps.

4. L'effet de Fe₃O₄-NPs sur les biomarqueurs enzymatiques

4.1. Effet de Fe₃O₄-NPs sur les variations de l'activité CAT

Le suivi de l'activité Catalase chez les paramécies traitées avec les nanoparticules de Fe₃O₄ est représenté dans la figure (33). Nos résultats montrent que cette activité augmente chez les traitées par les deux concentrations croissantes du xénobiotique. Cette augmentation est très hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les paramécies traitées avec la plus forte concentration de Fe₃O₄ et ce par rapport aux témoins après 7^{ème} jours de traitement.

En effet pour les paramécies traitées avec la concentration de $7,5 \times 10^{-2}$ mg/ml, ce taux varie de $0,00013014 \mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$ après le 7^{ème} jour de traitement, à $0,000151 \mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines, après 12^{ème} jours de traitement. Cependant chez les témoins, l'activité Catalase ne subit aucune variation significative et ne dépasse pas $0,00012335 \mu\text{M} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines.

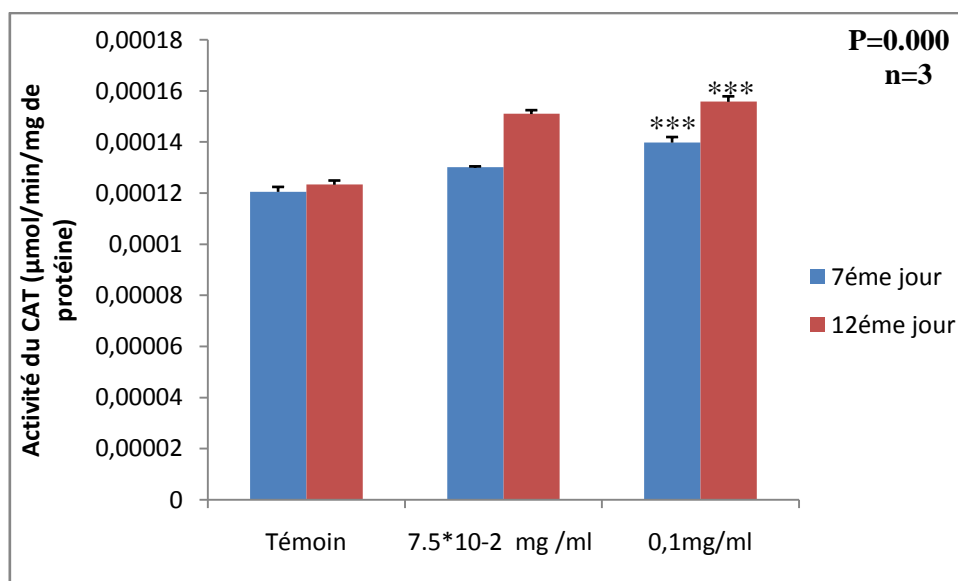


Figure 33: Effet de concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur l'activité Catalase chez les paramécies en fonction du temps.

4.2. Effet de Fe_3O_4 -NPs sur les variations de l'activité de GST

L'évolution de l'activité de la glutathion-S-transférase chez les cellules témoins et traitées par de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs est illustrée dans la figure (34).

Nous constatons une augmentation hautement significative de l'activité de GST ($P \leq 0,001$) cette augmentation est progressive et atteint son maximum après 12^{ème} jours de traitement particulièrement pour les traités avec la plus forte concentration d'oxyde de fer où l'activité GST est d'environ $9,2938\text{E}-07 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines alors que celle des traitées avec la plus faible concentration est de $7,2708\text{E}-07 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines et celle des témoins ne dépasse pas $4,9116\text{E}-07 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ toujours après 12 jours de traitement .

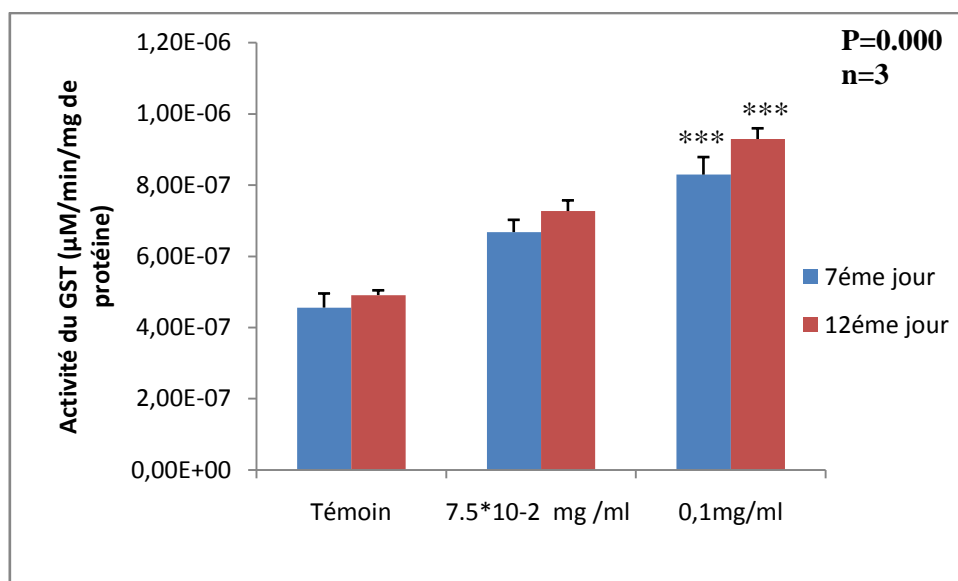


Figure 34: Effet de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur l'activité GST des paramécies en fonction du temps.

4.3. Effet de Fe_3O_4 -NPs sur l'évolution de l'activité GPx

La figure (35) illustre l'évolution de l'activité Glutathion peroxydase GPx chez les paramécies témoins et traitées avec de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs. Nous remarquons une augmentation très hautement significative ($P \leq 0,001$) et progressive de cette activité pour le 7^{ème} et le 12^{ème} jour de traitement et particulièrement pour les plus fortes concentrations de Fe_3O_4 par rapport au témoin.

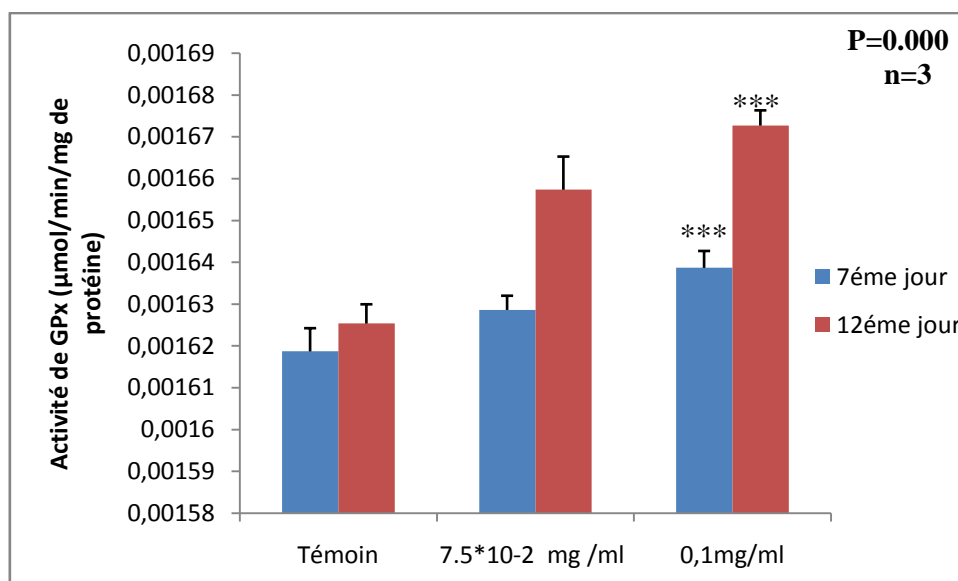


Figure 35: Effet de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur l'activité GPx des paramécies en fonction du temps.

4.4. Taux de cytochrome c chez les paramécies témoins et traités par Fe_3O_4 -NPs

La figure (36) représente l'évolution du taux de cytochrome en fonction de temps et sous l'effet de deux concentrations croissantes des nanoparticules de Fe_3O_4 . Nous remarquons que la concentration de cytochrome tend à augmenter de manière dose dépendante et très hautement significative ($P \leq 0,001$) par rapport aux témoins pour les deux concentrations.

En effet ce taux passe de 0.158 mg/ml de cytochrome chez les traités par la plus forte concentration d'oxyde de fer après 7 jours de traitement à 0,159 mg/ml de cytochrome après 12 jours de traitement.

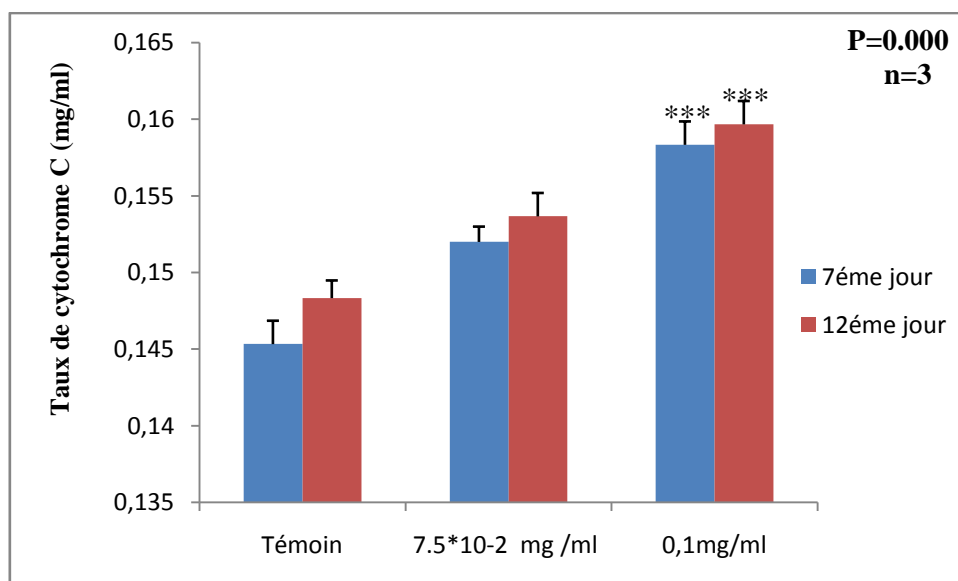


Figure 36: Effet de deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur la concentration du cytochrome C en fonction du temps.

5. L'effet sur les paramètres mitochondriaux

5.1. Variation du volume des mitochondries traitées par Fe₃O₄-NPs

La figure (37) illustre les changements de volumes des mitochondries en présence de deux concentrations croissantes des nanoparticules de Fe₃O₄ et en fonction du temps.

Ces valeurs de l'absorbance traduisant ainsi une augmentation du volume des mitochondries traitées avec l'oxyde de fer par rapport aux témoins. Ainsi pour la plus forte concentration de xénobiotique, nous notons une DO d'environ 0.05 chez les traités avec la plus forte concentration d'oxyde de fer alors qu'elle ne dépasse pas 0.0015 pour les témoins.

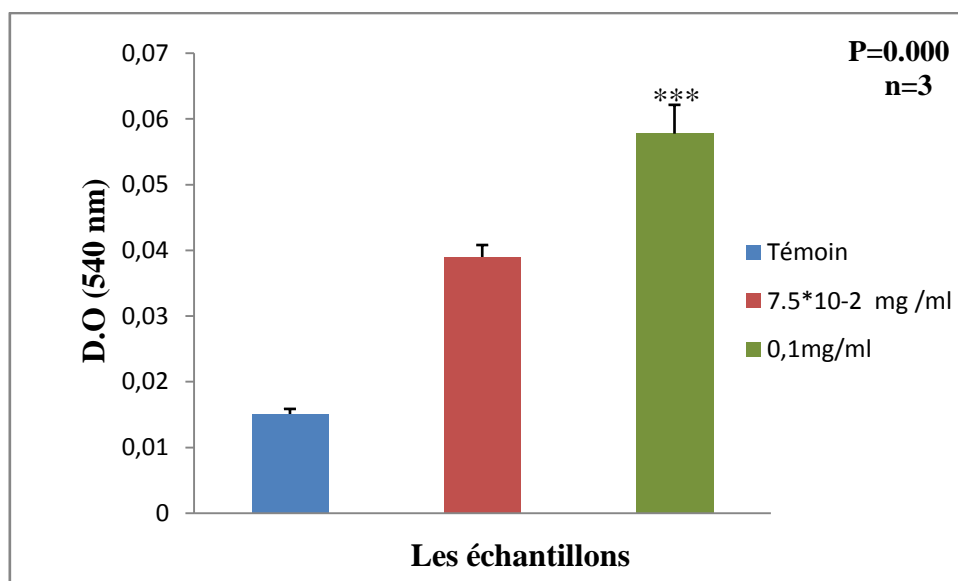


Figure 37: Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs en fonction du temps.

5.2. Variation de la perméabilité mitochondrial lors de l'injection du Ca²⁺

La figure (38) illustre l'effet de Fe₃O₄-NPs sur l'évolution du volume des mitochondries des paramécies.

Ainsi, nous constatons que pour les témoins, la densité optique évolue d'une manière régulière et continue jusqu'à la 30^{ème} seconde où la DO est de 0.032nm pour atteindre à la 80^{ème} de 0.018nm.

Cependant, pour les traitées par les deux concentrations du Fe₃O₄-NPs, le gonflement des mitochondries semble être affectée. Nous constatons une augmentation progressive et très hautement significative ($P \leq 0,001$) de la DO qui passe dans la 30^{ème} seconde après l'injection de Ca²⁺ 0.084 nm pour la plus forte concentration à 0.07nm dans la 80^{ème} seconde.

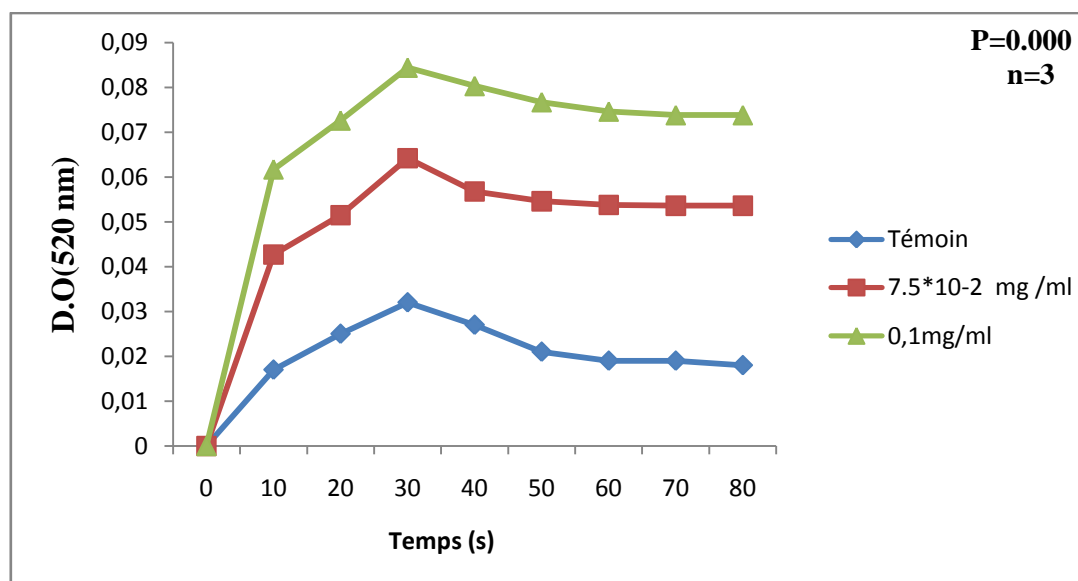


Figure 38: Effets de Fe_3O_4 -NPs sur le volume des mitochondries des paramécies après l'addition de Ca^{2+} .

5.3. Variation de quantité d'oxygène consommé chez les paramécies témoins et traités par Fe_3O_4 -NPs

La figure (39) illustre les effets des deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur la respiration mitochondriale des paramécies. Nous remarquerons que les cellules témoins consomment l'oxygène d'une manière régulière et continue, chez les cellules traitées par contre, la consommation d'oxygène est diminuée d'une manière très hautement significative ($P \leq 0,001$) cette diminution semble dose-dépendante.

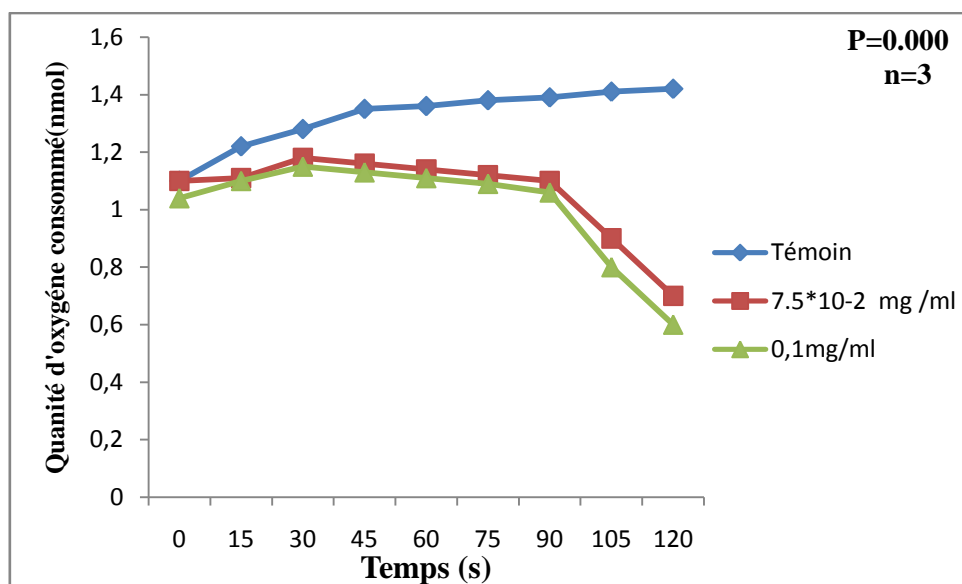


Figure 39: Effets Fe₃O₄-NPs sur la respiration mitochondrial des paramécies.

Discussion

Les bioindicateurs de la pollution environnementale sont sensibles aux variations physicochimiques de leurs milieux (Bride et *al.*, 1993) et également sensible vis-à-vis aux différents xénobiotiques (Ismart et *al.*, 2002), tels que les éléments traces métalliques (Gomot, 1997), ou encore les pesticides (Coeurdassier et *al.*, 2002 ; Vidal 2001 et Rouabhi 2005). Ainsi, toutes les études sur les bioindicateurs, convergent vers l'idée que le *Paramecium* est un excellent modèle biologique pour toutes les études écotoxicologiques, toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des xénobiotiques (Benbouzid et *al.*, 2012 ; Grara 2011). L'avantage majeur d'utiliser des protozoaires est bien sûr le fait que ce sont des eucaryotes unicellulaires. Ils possèdent donc des systèmes biologiques comparables à ceux des animaux supérieurs, tels que un noyau, une mitochondrie, un cytosquelette, etc. Et leurs réponses vis à vis des produits toxiques peuvent être similaires à celles des organismes pluricellulaires. (Fent et *al.*, 2006) et toute modification de leur milieu pourrait affecter leurs comportements, ce qui a conduit à les utiliser comme modèles cellulaires pour l'étude de l'impact des xénobiotiques ainsi que l'évaluation des risques pour la santé (Sauvant et *al.*, 1999).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la toxicité de NPs d'oxyde de fer (Fe_3O_4) sur un modèle biologique alternatif *Paramecium sp* que nous avons choisi et cela à travers l'évaluation de la cinétique de croissance des paramécies; le nombre ainsi que le temps de génération et d'autres paramètres morpho-physiologiques et aussi à travers le suivi de l'évolution de certains biomarqueurs spécifiques.

1. Les paramètres morphologiques

Les modifications du comportement ainsi que la diminution des taux de survie, de croissance et de reproduction peuvent conduire une modification de la dynamique d'une population, voire à la disparition de l'espèce dans l'habitat pollué (Caswell, 2001).

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).

Nos résultats montrent que dès la mise en contact du xénobiotique avec les cellules et les deux premiers jours de traitement, le nombre de cellules témoins et traitées évoluent de manière similaire. Ceci pourrait être dû soit à l'adsorption du Fe_3O_4 -NPs sur la membrane cellulaire et à la présence de cuticule chez les paramécies, qui les rendent résistantes mais qui reste néanmoins perméable (Beaumont et Cassier, 1998).

A partir du 4^{ème} jour le Fe_3O_4 -NPs inhibe la croissance des protistes de manière dose-dépendante. Ainsi la diminution du nombre des paramécies particulièrement traitée à la plus forte concentration de Fe_3O_4 -NPs, ceci constitue le premier indice d'une toxicité de ces nanoparticules. Ce résultat a été confirmé par celle de dosage du cytochrome « c » qui subit une augmentation hautement significative, ce dernier responsable à la mort cellulaire. Parallèlement, l'observation microscopique des micro-organismes lors de l'étude du paramètre de la croissance cellulaire met en évidence une perte de la mobilité accompagnée des mouvements désordonnés des protistes ciliés et une nage vers l'arrière appelée «Backward swimming », ceci nous amène à confirmer l'influx des Fe_3O_4 -NPs à l'intérieur des cellules car ces nanoparticules sont biocompatibles, malgré la présence de la membrane cellulaire qui pourrait constituer une barrière contre l'entrée massive des xénobiotiques mais qui reste néanmoins perméable. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Fukushima *et al.* 1979) qui montrent que la paramécie est un micro-organisme très proche des organismes supérieurs, que sa croissance est sensible à divers xénobiotiques dont les métaux lourds ce qui en fait un excellent bioindicateur de la pollution (Fenske *et al.*, 2001). Aussi, (Bernal et Ruvalcaba, 1995), ont mis en évidence une réduction du mouvement en tourbillon créée par le battement des cils chez les paramécies en présence de concentrations élevées de plomb, car il est connu que la paramécie avance en tournant autour de son axe longitudinal, selon un mouvement hélicoïdal. Elle peut changer de direction et faire marche arrière (Cudmore *et al.* 1977). Les cils, par leurs battements, apportent à la cellule un échantillon de ce qui se trouve devant elle et assurent ainsi le transport des particules alimentaires jusqu'au cytopharynx (Beaumont et Cassier, 1998), une diminution de la mobilité conduirait donc à la mort du microorganisme. Ce résultat a été confirmé par celle de l'évolution de gonflement mitochondriale qui subit une augmentation dans le volume des mitochondries des paramécies particulièrement traitée par la plus forte concentration qui est un signe à des dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à une réduction de la production d'énergie.

Nos résultats montrent que le pourcentage de réponse des paramécies est dose - dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes, nos résultats rejoignent ceux de (Sbartai 2005) qui confirme cet effet dose-dépendant chez des paramécies traitées au Cadmium. (Sbartai et *al.*, 2009) ont rapporté de mêmes résultats. Le pourcentage de réponse forme une indication sur la toxicité des xénobiotiques en général.

Le nombre ainsi que le temps de génération ont permis de déterminer la cytotoxicité des xénobiotiques testés vis-à-vis des cellules (Dias *et al.*, 2003). Il en est de même concernant la croissance cellulaire (Suarez *et al.*, 2010), qui confirme l'effet dose-dépendant de Fe₃O₄- NPs en fonction du temps d'exposition, et ont permis de conclure que la Fe₃O₄- NPs semble plus toxique. Nos résultats confirment ceux de (Benbouzid 2012) qui a démontré que les molécule PA-B employé à des doses de 2 µM, 4 µM et 8 µM a d'effet sur le nombre et le temps génération de la population des paramécies après 24h d'exposition.

2. Les paramètres biochimiques

Les protistes sont capables de synthétiser une multitude de protéines et d'enzymes spécifiques à la détoxification leur permettant de maintenir à un niveau suffisamment bas les concentrations intracellulaires de polluant. De nombreuses études confirment le rôle des protéines du stress chez les microorganismes (Piccini et *al.*, 1994; Masaya et *al.*, 2002; Redouan- Salah 2004).

Dans ce travail nous nous sommes intéressés au métabolisme de base des paramécies car la cascade d'événements ayant lieu au niveau des cellules en présence ou en absence de xénobiotiques peuvent constituer une réponse biologique en amont pouvant être considérée à juste titre comme un biomarqueur d'une cytotoxicité. Ainsi, (Rouabhi et *al.*, 2006 ; Redouane-Salah, 2004) ont mis en évidence une corrélation entre la perturbation du taux de protéines totales et la toxicité des pesticides chez la paramécie.

Plus récemment (Benbouzid, 2012) a montré que chez les paramécies traitées par des pesticides le taux de protéines, lipides, et glucides étaient fortement perturbés, l'auteur explique ce phénomène par d'une part l'induction de la synthèse des protéines en rapport avec le phénomène de bioactivation/biotransformation, et d'autre part par la peroxydation lipidique générée par les ROS cette hypothèse est confirmée par l'évolution des activités enzymatiques que nous avons suivies dans cette partie de notre travail. Partant du principe que tout type de stress chimique peut provoquer une libération de radicaux libres (Arousseau, 2002), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement.

Tous les composants cellulaires peuvent être touchés : lipides, protéines, et donc les membranes dans leur ensemble (Radi et *al.*, 1991; Haliwell et Chirico, 1993), et glucides (Jaeschke, 1995 ;Meneghini, 1997). Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux de tous les métabolites (augmentation du taux de protéines totales et diminution de celui des lipides et glucides) confirmant ainsi la toxicité de Fe₃O₄- NPs testés particulièrement à la plus forte concentration (dose -dépendante).

La diminution du taux de lipides suggère une altération de la membrane cellulaire sachant que cette dernière est composée de 50% de lipides (phospholipides). Ce résultat a été confirmé par celle de dosage du MDA qui subit une augmentation hautement significatif, et cela a été démontré 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.

De plus, les glucides sont une source primaire et immédiates d'énergie (Alberts et *al.*, 1986), dans les conditions de stress, les réserves de glucides sont épuisées pour satisfaire les demandes énergétiques. Ces résultats rejoignent ceux d'El-Wakil et Radwan (1991) qui suggèrent que l'épuisement du contenu de glycogène dans le tissu de l'escargot d'eau douce *Bellamya dissimillis*, exposé à différents pesticides serait la conséquence de l'utilisation directe du glycogène pour la génération d'énergie. Ceci pourrait être extrapolé aux protistes d'où cette diminution du taux de glucides aux plus fortes concentrations de xénobiotiques observés dans notre travail.

3. L'effet sur les bioindicateurs de stress oxydatif

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, entraînant la mort des organismes sans que ces derniers ne puissent réagir particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées, ce stress peut être moins intense, permettant alors à l'organisme de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic et *al.*, 1997).

Dans ce travail nous avons utilisé l'approche enzymatique sur le *Paramecium sp.*, pour définir le degré de toxicité induit par les nanoparticules de Fe₃O₄.

Les biomarqueurs sont des variations biochimiques, physiologiques, histologiques ou morphologiques, mesurées chez des êtres vivants exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans l'environnement (Huggett et *al.*, 1992). Il en est ainsi

du système GSH/GST intervenant dans les réactions de conjugaison des électrophiles (Huggett *et al.*, 1992 ; Lagadic *et al.*, 1997 ; Kammenga *et al.*, 2000).

Dans notre étude nous avons enregistré une réduction du taux de GSH pour les deux concentrations de Fe₃O₄-NPs testés en fonction du temps parallèlement à une induction de l'activité GST.

Ces deux paramètres rendent compte de la prise en charge des deux concentrations de Fe₃O₄-NPs par les Enzymes de la Phase II de la métabolisation où les métabolites formés lors de la phase I sont Conjugués au GSH grâce à la GST le complexe conjugué est soluble et peut être éliminé facilement. Nos résultats sont en accord avec ceux de (Azzouz, 2012), qui a étudié la toxicité d'un insecticide, à base d'azoxystrobin et de cyproconazole sur *Paramecium tetraurelia*, où encore (Benbouzid *et al.* ; 2012), qui ont testé des phosphoramidate sur *paramecium aurelia*. ainsi et ceux de (Regoli et Principato 1995; Doyotte *et al.*, 1997; Cossu *et al.*, 1997) qui ont rapporté une réduction du GSH chez des bivalves en corrélation avec la présence dans le milieu de PCB et de HAP.

D'après (Hayes et McLellan, 1999), le glutathion joue un rôle important dans les mécanismes de détoxification de la cellule et constitue la première ligne de défense antioxydante. (Sbartai *et al* 2008 ; Grara *et al.*; 2009) confirment ce rôle de la GSH dans le système de détoxification.

L'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH, sont dus au fait que Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur 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). Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xenobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (Vidal, 2001).

Tous ces travaux viennent appuyer nos résultats et confirme le rôle de la GST qui constitue une seconde ligne de défense efficace de nombreuses substances hautement toxiques issues des interactions des espèces réactives de l'oxygène avec les macromolécules cellulaires en défendant la cellule des effets délétères du stress oxydant (Martin, 2003).

Le dosage de l'activité Catalase dont l'induction ou l'inhibition témoigne de l'état du stress oxydant par excellence, car la catalase est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et rapide à la contamination par les xénobiotiques a permis de montrer qu'après traitement des paramécies avec les nanoparticules de Fe_3O_4 , l'activité de cet enzyme à été fortement induite, nos résultats corroborent ceux de (Banerjee, 1999) et (Lopez, 2007) qui ont clairement démontrés que les pesticides induisaient l'activité des enzymes antioxydantes, il en est de même pour l'étude de (Mountassif et al., 2007) qui ont mis en évidence une augmentation de l'activité CAT chez *Tetrahymena pyriformis* soumis à une pollution métallique, le traitement de *Paramecium aurelia*, avec des phényl phosphoramidates a mis en évidence une induction de l'activité CAT (Benbouzid, 2012), il en est de même pour le travail de (Azzouz, 2012) qui à mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*, traités avec le pesticide Amistar Xtra et le Glyphosate, nos travaux confirment ceux cités ci-dessus puisque nous avons également mis en évidence une augmentation dose -dépendante de l'activité Catalase chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes des nanoparticules de Fe_3O_4 confirmant ainsi la toxicité de ce xénobiotique particulièrement au plus forte concentration.

En effet, l'activité catalase consiste en une transformation du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (O_2). Or la production de H_2O_2 est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme notamment nos xénobiotique 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).

La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, l'activité enzymatique de GPX est d'excellent indicateur d'un stress oxydant.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une implication de ce système de détoxification à travers une augmentation dose dépendante de l'activité GPx Selon (Schmidt et al., 2007), La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives à partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV. Ces électrons s'associent à l'oxygène pour constituer des superoxydes puis secondairement du Peroxyde d'hydrogène. Le GSH, la SOD et la GPX et la CAT se chargent de piéger ces d'espèces oxygénées réactives au sein de la mitochondrie. En effet l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale engendre une hyperproduction d'espèces oxygénées réactives, (Fromenty 2010 ; Chagra et al., 2009). Ce résultat a été confirmé par celle de volume des mitochondries

qui subit une augmentation hautement significatif du volume des mitochondries traitées avec l'oxyde de fer par rapport aux témoins.

Le MDA est l'aldéhyde actif principal de la peroxydation des acides gras poly insaturés des membranes, c'est également un sous produit de la biosynthèse de la prostaglandine (Coeurdassier, 2001), Notre intérêt s'est porté sur l'évolution du taux de MDA, car ces molécules lorsqu'elles sont abondantes dans le milieu intracellulaire rendent compte d'une toxicité spécifiques aux radicaux libres. En effet, selon (Bebianno et *al.*, 2005) et (Al-Mutairi et *al.*, 2007), l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane (Pampanin et *al.*, 2005).

Ainsi la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002) et l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique constitue le marqueur biochimique le plus commun du stress oxydatif. (Chen et *al.*, 2005).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence des nanoparticules de Fe_3O_4 et cette augmentation est dose-dépendante. Nos résultats confirment ceux de (Recknagel et Turocy, 1977) qui a démontré que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, sont très toxiques pour les cellules de *Paramecium multimicronucleatum*, (Sbartai 2013; Djekoun et *al.*; 2012) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez respectivement *Paramecium sp* et *Sacharomyces cerevisiae*. Il en est de même concernant les travaux de (Grara, 2011) sur les gastéropodes *Helix aspersa* ou encore (Zaouani, 2010) qui a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez des rats traités par des pesticides et aussi (Djekoun, 2012 ; Sbartai, 2013) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA respectivement chez *Sacharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp*. L'étude de (Mountassif et *al.*, 2007) a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez *tetrahymena pyriformis* traité avec un polluants métallique, comme c'est le cas pour l'étude de (Viarengo et *al.*, 1990) a mis en évidence un taux élevé en MDA chez *Mytilus galloprovincialis*, traités avec des métaux lourds (cuivre). (Chandran et *al.*, 2005) ont mis en évidence une augmentation significative du taux du (MDA) chez le gastéropode *Achatina fulica* après exposition au Cd et Zn.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux des auteurs cités précédemment, puisque le traitement des paramécies avec les nanoparticules de Fe_3O_4 a provoqué une augmentation dose dépendante de ce biomarqueur de stress, confirmant ainsi une peroxydation lipidique potentielle due au xénobiotique étudié.

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de (Talantikit, 2014) et (Alloun, 2010) qui ont démontré que ces NPs ne sont pas toxiques vis-à-vis les bactéries et au niveau cellulaire (effet cytotoxique).

4. Les paramètres mitochondriaux

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'effet de deux concentrations des nanoparticules de Fe_3O_4 à l'échelle subcellulaire. En effet nous avons suivi les modifications physiologiques et morphologiques induites par ces nanoparticules chez des mitochondries isolées à partir des paramécies.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation dose-dépendante du volume des mitochondries traitées avec l'oxyde de fer, ce gonflement peut être expliqué par la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées car certains xénobiotiques sont capables d'entraîner une ouverture des PTPM, (Labbe *et al.*, 2008; Berson *et al.*, 2006). La Troglitazone et l'Alpidem, peuvent également induire une ouverture de ces pores (Pessayre *et al.*, 2010). Les mécanismes précis par lesquels certaines molécules induisent l'ouverture des PTPM ne sont pas encore connus (Djebar, 2000), mais il est possible que deux types d'évènements puissent jouer un rôle important:

- La production par la chaîne respiratoire, ou d'autres sources subcellulaires, d'ERO qui vont oxyder et altérer des protéines impliquées dans le PTPM;
- La production par l'intermédiaire de cytochromes P450 d'un ou de plusieurs métabolites réactifs, capables également d'altérer de façon irréversible des protéines du PTPM (Labbe *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2005).

En effet, ce métabolite réactif se fixe de façon covalente à plusieurs protéines mitochondriales, ce qui pourrait non seulement faciliter l'ouverture des PTPM mais également entraîner d'autres dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à une réduction de la production d'énergie (Masubuchi *et al.*, 2005 ; Ruepp *et al.*, 2002). Quel que soit le mécanisme impliqué, la conséquence principale de l'ouverture des PTPM est la mort cellulaire par apoptose, ou par nécrose, en fonction du nombre de mitochondries impliquées. (Chagra *et al.*, 2009) ont observé un gonflement mitochondrial suite au traitement par le Cadmium chez les mitochondries isolées de pommes de terre. (Boulassel, 2013) ont mis en évidence un gonflement mitochondrial chez les mitochondries des paramécies traitées avec le Paracétamol et l'Ibuprofène.

Nos résultats sont en parfait accord avec ces travaux puisque nous avons également mis en évidence un gonflement mitochondrial chez les mitochondries traitées avec les nanoparticules de Fe_3O_4 .

Les microorganismes sont avides d'oxygène, c'est l'élément indispensable pour leur vie, ainsi au moment de l'élimination des xénobiotiques, les électrons produits lors de la détoxification de l'organisme par les mono-oxygénase à cytochromes P450 (CYP450), vont réagir avec l'oxygène (Guengerich, 1991).

L'oxygène peut également réagir avec les électrons qui échappent à la chaîne respiratoire (Cadenas *et al.*, 1977). La combinaison directe de l'oxygène apporté aux cellules avec ces électrons implique la formation d'un anion superoxyde qui est à l'origine des phénomènes radicalaires, ce dernier peut alors dismuter soit spontanément, soit de façon enzymatique pour donner de l'eau oxygénée (H_2O_2), qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle OH^\bullet , le plus réactif des radicaux oxygénés libres (ROS).

Dans notre travail, les résultats ont indiqué une perturbation du métabolisme respiratoire chez les paramécies traitées par les deux concentrations des nanoparticules de Fe_3O_4 étudié par rapport aux cellules témoins. La perturbation de l'activité respiratoire obtenue montre que les deux concentrations des nanoparticules de Fe_3O_4 sont génératrices de stress oxydatif à l'origine de libération de ROS qui sont connus comme éléments perturbateurs du métabolisme respiratoire (Kiss *et al.*, 2003; Kuciel et Mazurkiewicz, 2004) d'où la perturbation de la consommation d' O_2 observée dans notre travail. (Kon *et al.*, 2004) expliquent que le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale pourrait être un des mécanismes fondamentaux impliqués dans les altérations de la chaîne respiratoire en condition d'intoxication. Ce résultat confirmant ainsi l'augmentation du volume des mitochondries traitées avec Fe_3O_4 .

Nos résultats vont dans le sens que ceux (Rouabhi *et al.*, 2006) qui a étudié l'effet de Diflubenzuron et le Flucycloxuron sur la morphologie et la physiologie de *Paramecium sp* ainsi que ceux de (Sbartai *et al.*, 2012) et (Benbouzid *et al.*, 2012) qui ont mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire respectivement chez *Paramecium sp* et *Paramecium aurelia*. Soumises à un stress induit par le bifénazate et des phosphoramdiates. Il en est de même pour l'étude de (Djekoun *et al.*, 2012) qui ont mis en évidence une perturbation du métabolisme respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae* traité par le cadmium.

Conclusion

Conclusion

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

Les nanoparticules testées sur nos cellules sont des molécules se situent à une échelle moléculaire comprise entre celle d'une molécule d'ADN de 2.5 nm de large et celle d'un globule rouge humain de 800 nm de diamètre. Cette taille leur permet d'interagir facilement avec les composants biologiques. En effet très peu de données sont disponibles actuellement sur l'impact des nanoparticules de Fe_3O_4 sur l'environnement. Un effort substantiel est à produire de façon à accroître les connaissances scientifiques dans ce domaine.

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'isolement d'une seule cellule afin de réaliser une culture pure de *Paramecium sp.* ce qui nous a permis par la suite d'identifier nos paramécies.

Cette étude montre l'intérêt de *Paramecium sp* comme espèce modèle cellulaire pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules particulièrement le Fe_3O_4 . Ainsi, au terme de notre travail, nous avons déterminé la cytotoxicité des xénobiotiques testés vis-à-vis de notre modèle biologique. Cette toxicité se manifeste par la perte de linéarité de la trajectoire et une perturbation de la mobilité et aussi la morphologie des paramécies.

D'un autre côté, la présence des nanoparticules de Fe_3O_4 induit également une inhibition dose-dépendante de la croissance cellulaire, une diminution du nombre de génération et une augmentation du temps de génération, et ce après 2^{ème} jours de traitement, mettant ainsi en évidence une cytotoxicité des xénobiotiques testés.

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

Une perturbation du métabolisme respiratoire confirmant ainsi l'effet de ces molécules sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Tous ces résultats convergent vers un comportement de ce modèle cellulaire très proche de celui d'organismes supérieurs. Ceci conforte nos travaux et confirme leur intérêt en tant que modèles biologiques pour les bio-essais.

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

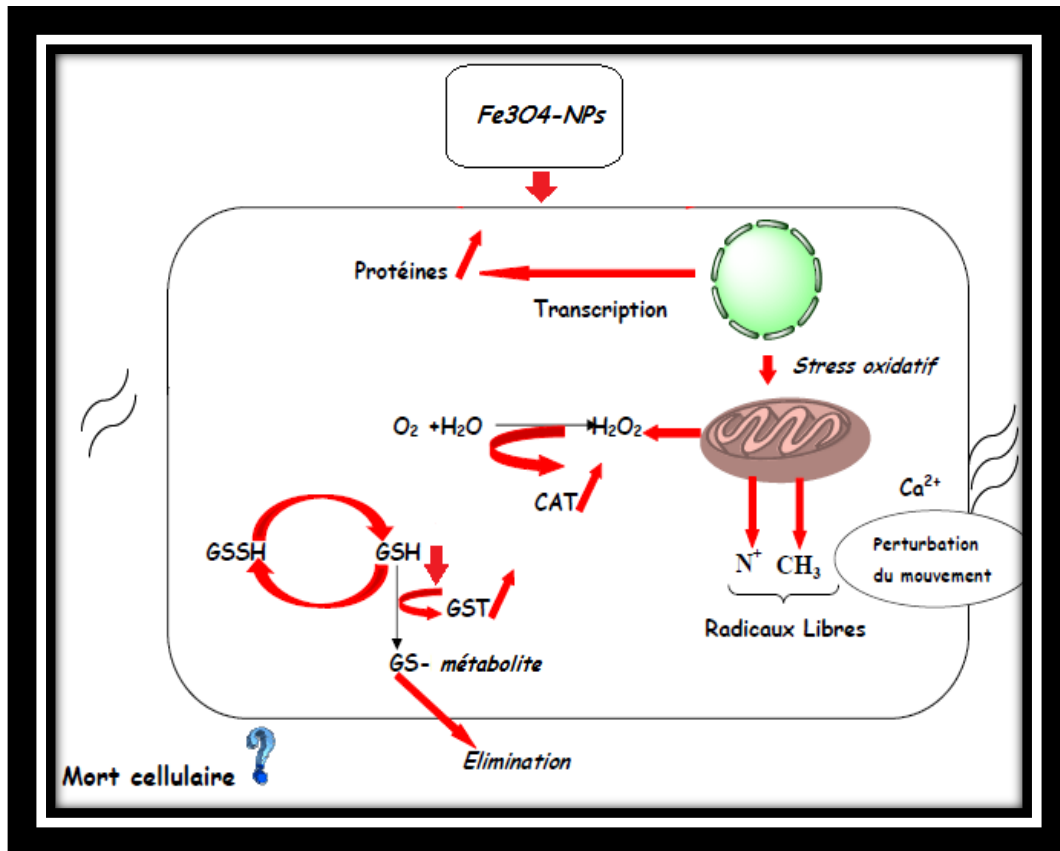


Figure : Mécanisme d'action des nanoparticules de Fe₃O₄.

Perspectives

En vue de compléter notre travail il serait judicieux:

- Elargir les tests de cytotoxicité sur des cellules animales en culture;
- Etudier le devenir de ces toxiques, leurs différentes formes de stockage (spéciation), afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la concentration et de la biotransformation de ces éléments au niveau cellulaire;
- Etablir un lien entre la biocompatibilité des nanoparticules, leur propriété d'adsorbé les molécules et leur toxicité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Albert B., Bray D., Lewis D., Raff M., Roberts K., Watson J., 1986.** Biologie moléculaire de la cellule .Edition Flammarion. p256.
- **Alloun K., 2011.** Etude de la cytotoxicité des nanoparticules d'oxydes de fer. Mémoire. Université Paris Descartes. Pp 5-7-11-20.
- **Al-Mutairi D.A., Craik I., Batinic-Haberle L.T., Benov., 2007.** Inductions of oxidative cell damage by photo- treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. 41: Free radical research. p89.
- **Aruoja V., Dubourguier H. C., Kasemets K., Kahru A. 2009.** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science of the Total Environment, 407(4) : 1461-1468. doi: 10.1016/j.scitotenv.
- **Aurousseau B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux : Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Prod.Anim,15(1). p67.
- **Azzouz Z., 2012.** Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Thèse doctoral. Université d'Annaba. p114.

B

- **Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K., 1999** Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxydation and free radical scavengers, Toxicol. Lett: 107. p33.
- **Beaumont C., 1998.** Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie. 3^{ème} édition. Paris. p125.
- **Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Cosson R.P., Fiala-Medoni A., 2005** Antioxidant systems and lipid peroxidation in Bathy-modiolusazoricus from Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent fields. Aquat Toxicol: 75. p354.
- **Beisson J., Be´termier M., Bre M., Cohen J., Duharcourt S., Duret L., Kung C., Benbouzib H., 2012.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliés. Thèse de doctorat. Université d'Annaba. p 87.
- **Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M., Djebbar M.R., 2012.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp* with special emphasis on respiratory metabolism

- growth, and generation time. Toxicological & Environmental Chemistry, DOI:10.1080/02772248. p 655.
- **Bernal J., Ruvalacaba S.,1995.** Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. Toxicology: 108. p165.
 - **Berson A., Cazanave S., Descatoire, V., Tinel, M., Grodet, A., Wolf, C., 2006.** The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2- phenoxy methane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. J Pharmacol Exp Ther;318:444-54.
 - **Boulassel A., Djebar, M.R., Rouabhi R., Djebar H., 2013.** Physiological and biochemical changes observed in alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia* treated with paracetamol. Inter.J.Biosci.9: 1-10.
 - **Bradford M., 1976.** Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry: 72. p248.
 - **Brown R.J., Galloway T.S., Lowe D., Browne M.A., Dissanayake A., Jones M.B. Bazzi R., Roux S.,** Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde de fer enrobées d'or, Institut UTINAM – Equipe « Nanoparticules, Contaminants, Membranes ».

C

- **Cadenas E., Boveris A., Ragan C.I., Stoppani A.O.M., 1977.** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reduction from beef heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 180. p248.
- **Cakmak I., Horst W.J., 1991.** Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), Physiol. Plant 83: 463-468.
- **Caswell H., 2001.** Matrix population Models: construction, analysis, and interpretation, second edition, Sinauer Associates (Eds.), Sunderland, Massachusetts. USA. P722.
- **Chafai, A.H., 2012.** Zoologie- les protozoaires. Université de Vertuelle de Tunis. P 4-6.
- **Chapman P.M., 2001.** Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. Hydrobiologia: 463. p149.

- **Chen H.J., WU C.F., Huang J.L., 2005.** Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS : correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicol.Lett* .1555 :403.
- **Coeurdassier M., 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques .Thèse de doctorat. Université de France. p 281.
- **Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A., Vasseur P., 1997.** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 38. p122.
- **Cudmore L., David C., Newton A., 1977.** A Natural History of the Cell. The Center of Life.

D

- **Daou T., 2007.,** Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques ; Thèse présentée pour obtenir le grade de Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg, Université de Louis Pasteur.Strasbourg. Pp 23-30.
- **Depledge M.H., 2004.** Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology* :66. p 267.
- **Desagher S., Martinou J.C, 2000.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377.
- **Dias N., Mortara R.A., Lima N., 2003.** Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. *Toxicology in vitro*. P09.
- **Dickinson D. A., Forman H. J., 2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology* : 64. p26.
- **Djebar H., Djebar M.R., 2000.** Bioénergétique, Les mitochondries végétales. *Revue des sciences et technologie ; Synthèse2000*. Université d'Annaba. Edition Végérol : 103.
- **Djekoun M., Djebar M.R., Zaoui L., Bensoltane S., Djebar H., 2012.** Biochemical, Enzymatic and Energy Alteration observed in *saccharomyces cerevisiae* subjected to oxidative stress.*AEJTS* :2 (1). p 36.

- **Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babut M., Vasseur P., 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol* : 39 p110.
- **Duchateau G., Florkin M., 1959.** Cent manipulations biochimiques simples. Edition Masson. USA. p112.

E

- **El-Wakil H.B., Radwan M.A., 1991.** Biochemical studies on the terrestrial snail *Eobania vermiculata* (Muller) treated with some pesticides. *J.Environ.sci.Health*. p26.

F

- **Fenske,C., Gunther B., 2001.** Electro-fishing in the lab: A new method to detect actual effects of heavy metals and organic pollutants in invertebrate indicator organisms. *Int.J.Hyg. Environ.Health*, 204:157. p163.
- **Fent K., Weston A., Caminada D., 2006.** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*: 76. p 122.
- **Flohe L., Gunzler W., 1984.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114. p121.
- **Fromenty B., 2010.** Drug-induced mitochondrial and metabolic toxicity: Mechanisms and deleterious consequences for the liver. *Réanimation*: 19(6). p 567.
- **Fukushima S., Shiota C., Ogawa H., Sasagawa S.,1979.** Effects of heavy metals *Paramecium Tetraurelia*. Effects on cell division.*Jap.J.Hyg*: 34(5). p510.

G

- **Gautier J., 2013.,** Nanoparticules d'oxydes de fer PEGylées pour la délivrance de la doxorubicine : développement et évaluation de leur potentiel théragnostique ; Thèse de Doctorat, Université François.
- **Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J., 1972.** Studies on insect adipokinetic hormones. *Gen. Comp.Endocrinol*: 18. p 545.
- **Gomot A., 1997.** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* : 33. p216.
- **Gomot A., 1997.** Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle.Méd* :181. p59.

- **Grara N., 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gasteropode *Helix aspersa*): Cas des métaux .Thèse de doctorat de Université d'Annaba. P 91.
- **Grara N., Berrebbeh H., Rouabhi R., Atailia A., Djebbar M.R., 2009.** Impact of pollution by industrial metallic Dust on Bio-Accmulator Organism *Helix aspersa*. Global Veterinaria : 3(4). p276.
- **Guengerich F.P.,1991.** Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. Minireview. J. Biol Chem: 266, 10019-10022.
- **Gupta A.K., Gupta M., 2005.,** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. Jun :26(18). P 21.

H

- **Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry: 249(22). p7139.
- **Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A., Jimenez A, D., Ruiz L. I., Rojo T., Mahmoudi M, 2012.** Antibacterial properties of nanoparticles, Trends in Biotechnology, 30(10). doi: 10.1016/j.tibtech.
- **Halliwell B., Chirico S., 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am. J. Clin. Nutr 57(suppl). p715.
- **Hayes J.D., McLellan L.I., 1999.** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radic Res: 31(4). P 300.
- **Huggett R.J., Kimerie P.M., Mehrle J.R., Bergman, H.L., 1992.** Biomaekers. ,Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla., Lewis Publishers. p347.

I

- **Ismert M., Oster T., Bagrel D., 2002.** Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. Chemosphere: 46. p273.

J

- **Jaeschke H., 1995.** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. p 209.
- **Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., 2009.,** Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. Journal of Nanoparticle Research : 11 (1). p77.

K

- **Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Kohler H.R., Simonsen V., Triebkorn R. Weeks J.M., 2000.** Biomarkers in terrestrial for ecotoxicological soil risk assesment. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Vol: 164. G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/New York/NY 10010. Springer-Verlag. P 93.
- **Kebbaj M. S., 2007.** Physiological , morphological and metabolic changes in Tetrahymena pyriformis for the in vivo cytotoxicity assesment cytotoxicity assesment of metallic pollution:Impact on D-B-hydroxybutyrate dehydrogenase. Ecological Indicators. 7.p 882.
- **Kiss S.A., Varga I.S., Galbacs Z., Maria T.H. Csikkel S.A., 2003.** Effect of age an magnesium supply on the free radical and antioxydant content of plants. Acta Biologica Szegediensis, Vol:47 (1-4). Pp. 130.
- **Kon K., Kim J.S., Jaeschke H., et al., 2004.** Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. Hepatology. 40(5):1170. P09.
- **Kuciel R., Mazurkiewicz A., 2004.** Formation and Detoxification of reactive oxygen species. Biochemistry and Molecular Biology Education, Vol:323. Pp 183-186.

L

- **Labbe G., Pessayre D., Fromenty B., 2008.** Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction, mechanisms and detection during preclinical safety studies. Fundam Clin Pharmacol :22. P 53.

- **Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Aspects fondamentaux. Paris. p09.
- **Lagadic L., Caquet T., Amirad J.C., Ramade F., 1997.** Biomarqueurs en Ecotoxicologie, Aspects fondamentaux. Edition Masson. p165.
- **Laren M.D., 2007.** Advances in sports and exercise science series.Nutritionand Sport. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- **Laurent S., Mahmoudi M., 2011.** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics: 2(4).
- **Lavergne M., 1985.** Etude des effets du Diapézan et du Médazépan sur un protiste cilié. Mémoire de D.E.A. Université de Paris VII. p46.
- **Lee S.J., Jin Y., Yoon H.Y., Choi B.O., Kim H.C., Oh YK., et al., 2005.** Ciclopirox protects mitochondria from hydrogen peroxide toxicity. Br J Pharmacol:145. p76.
- **Liu Y., Fiskum G., Schubert D., 2002.** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J Neurochem : 80(5). p787.
- **Lópeza O., 2007.** Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. Toxicology Letters.171:3. p146.
- **Loschen G., Flohe L., Chance B., 1971.** Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. FEBS Lett: 1;18(2). P 264.

M

- **Malinsky S., Meyer E., Preer J.R. et al.; 2010,** *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. Cold Spring Harb. Protoc, pdb.emo:140.
- **Marnett L.J., 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage.Toxicology. p181.
- **Marti F., 2003.** Un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse d'état en Immunologie: VANIN-1, centre d'immunologie de Marseille, Université de la Méditerranée.
- **Masubuchi Y., Suda C., Horie T., 2005.** Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. J Hepatol: 42. P06.
- **Matthias P., 2010.** Structuration de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en films et étude de leurs propriétés magnétiques et de magnéto-transport. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg. P15.

- **Mauvernay B., 2007.** Nanocomposites d'oxydes de fer en couches minces .études de leur élaboration et de leurs propriétés en vue de leur utilisation comme matériaux sensibles pour la détection thermique. Thèse de doctorat. Université de Toulouse III. P13.
- **Melanie A., 2007.** Nanoparticules d'oxydes métalliques : relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques. France. P12.
- **Meneghini R., 1997.** Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic. Biol. Med:23. p783.
- **Mezni M., 2013.** Synthèse et caractérisation des nanoparticules métalliques vers la nanomédecine. France. p 16.
- **Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacaman M. J. 2005.** The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology :16(10). P 234.
- **Mountassif D., Kabine M., Manar R., Bourhim N., Zaroual Z., Latruffe N., El Moore M. N., 2006.** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? Environment International. 32(8), 967-976. doi: 10.1016/j.envint.

N

- **Nhiem T., Aparna M., Mallik D., Sinha A., Suprabha N., 2010.** Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus. International Journal of Nanomedicine. doi: 10.3410/f.718180355.793487092. Pp277–283.

O

- **Oberdörste G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N.; Warheit D.; Yang H.; Group R. F. R. S. I. N. T. S. W., 2005.** Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and Fibre Toxicology: 2 (1). P08.

P

- **Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C., 2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytillus galloprovincialis*) in Venice. Lagon (Italy). Mar. Pollut. Pp1548-1557.

- **Penna C., et al., 2009.** Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* ;104(4). Pp 390-402.
- **Perez R. M., Abalde A.J., Herrero L.C., 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). p2061-2066.
- **Pessayre D., Mansouri A., Berson A., Fromenty B., 2010.** Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol* ;196:311. p65.
- **Picot A., 2012.** Les nanoparticules et leur impact sur la santé et l'environnement. Paris. P03.
- **Poupon J., Feltin M.N., Framery S., 2011.** Évaluation biologique des dispositifs médicaux contenant des nanomatériaux. Afssaps. Rapport NanoDM. p10.
- **Prucek R., Tucek J., Kilianova M., Panacek A., Kvittek L., Filip J., Zboril R. 2011.** The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(21), 4704-4713. doi:10.1016/j.biomaterials.

R

- **Radi F., Beckman J.S., Busch K.N., Freeman B.A., 1991.** Peroxynitrite oxidation of sulhydryls .the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide .*J.Biol.Chem*:266. p42.
- **Reckngel R.O., Tucory Y., 1977.** Fatal susceptibility of free-swimming *paramecium* to peroxidizing rat liver microsomes. *Exp.Mol.Pathol*: 27:93. P 105.
- **Redouane S.S., 2004.** Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d'El-Hadjar de Annaba sur un model cellulaire marin: *Tetraselmis suecica*. *Sciences et Technologies*. Pp 121-124.
- **Regoli F., Principato G., 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*: 31. P 164.
- **Rouabhi R., 2005.** Impact de deux pesticides le Diflubenzuron et le Flucycloxon sur trois modèles cellulaires alternatifs : *Paramecium sp*, *Tetrahymena pyriformis*, *Tetraselmis suecica* et sur le développement embryonnaire de la poule domestique (*Gallus domesticus*). Thèse de doctorat. Université d' Annaba. Algérie. p 87.

- **Rouabhi R., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2006.** Toxicity evaluation of Flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium sp.* Afr.J. Biotechnol : 5(1). P03.
- **Ruepp SU., Tonge R.P., Shaw J., Wallis N., Pognan F., 2002.** Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. Toxicology Sci: 65:135. p50.

S

- **Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J., 2007.** The present and future of nanotechnology in human health care. Nanomedicine: 3(1), 20-31. doi: 10.1016/j.nano.
- **Saini H.K., Machackova J., Dhalla N.S., 2004.** Role of reactive oxygen species in ischemic preconditioning of subcellular organelles in the heart. Antioxid Redox Signal : Apr;6(2).p 39.
- **Sauvant M.P., Pepin D. Piccini E., 1999.** Tetrahymena pyriformis. A tool for toxicological studies.Chemosphere: 38(7). p163.
- **Sauvant M.P., Pepin D., Piccini E., 1999.** Tetrahymena pyriformis.A tool for toxicological studies.Chemosphere : 38(7). P 1631.
- **Sbartai I., Berrebbah H., Sbartai H., Djebbar M.R., 2012.**Evaluation of the toxicity of hydrazine (Bifenazate) and oxadiazine (indoxacarb) observed in a unicellular eukaryotes:*Paramecium sp.* Advanced in Environmental Biology:6 (8):2249-2258.
- **Sbartai H., Rouabhi R., Sbartai I., Berrebbah H., Djebbar M.R., 2008.** Induction of anti-oxydative enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). African Journal of Plant Science: 8. Pp 72-76.
- **Sbartai I., 2005.** Modifications physiologiques et biochimiques observées chez un modèle cellulaire : *Paramecium sp* soumis à un traitement au cadmium. Thèse de Magistère. Université Badji Mokhtar. Annaba.. p 86.
- **Sbartai I., 2013.**Toxicité d'un Hydrazine carboxylate(Bifenazate) et d'un Oxidiazine(Indoxacarbe) observée chez un modèle cellulaire d'eau douce *Paramecium sp.* Thèse de doctorat. Université d'Annaba. p 132.
- **Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Smaghe G. Djebbar M.R., 2009.** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifenazate with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. American-Eurasian J. Toxicol. Sci: 1. p13-18.

- **Schmidt L.E., Larsen F.S., 2007.** Meld score as a predictor of liver failure and death in patients with acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology*: 45:789. p96.
- **Szalay B., Tatrai E., Nyiro G., Vezér T., Dura G., 2012.** Potential toxic effects of iron oxide nanoparticles in *in vivo* and *in vitro* experiments. *Journal of Applied Toxicology*: 32(6), 446-453. doi: 10.1002/jat. P 1779.

T

- **Talantikit M., 2014.** Effets antibactériens des nanoparticules de cuivre, oxyde de cuivre et oxyde de fer, mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme génie biomédical. Montréal. Canada. Pp 13-22-40-57.
- **Teja A. S.; Koh P. Y., 2009.** Synthesis properties and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*: 55(1-2), doi: 10.1016/j.pcrysgrow.08.003. Pp22-25.
- **Tsang A., Hausenloy DJ. ; Mocanu MM ; et al., 2004.** Post conditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res.*; 95(3). Pp230-232.

V

- **Viarengo A., 1994.** Heavy metal cytotoxicity in marine organisms: effects on Ca^{+2} homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. *Adv. Comp. Environ. Physiol*: 20, p85-87.
- **Viarengo A., Nott J., 1993.** Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. Toxicol* : 104. p355.
- **Viarengo A.; Canesi L.; Pertica M.; Poli G.; Moore M.N., Orunesu M., 1990.** Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comparative Biochemistry and Physiology*: 97C (1). p37-42.
- **Vidal M.L., 2001.** Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea*(Muller) Purification et caractérisation des Glutathion S-Transférases .Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux . France. p15-17.
- **Vlahogianni T., Dassenkis M., Scoullou 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. *Marine Pollution Bulletin*: 54, 1361-1371.p24.

W

- **Wahajuddin; Arora., 2012.** Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*: 7, 3445-3471. doi: 10.2147/IJN.S30320. p 12.
- **Weckberker G.; Cory G., 1988.** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cacer letters* : 40. p257.
- **Wichertman N.R., 1953.** The Biology of *Paramecium*. *Blakiseon* (Pa). p527.
- **Wong C.K.; Cheung; Ming-Ho Yo., 1999.** Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environmental pollution*: 105. p175.
- **Wu W., He Q., Jiang C., 2008.** Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*: 3(11), 397-415.doi: 10.1007/s11671-008-9174-9. P08.

Z

- **Zaouani M., 2010.** Contribution à l'évaluation de la toxicité aigue et subchronique d'un produit phytosanitaire (Proclaim) chez le rat wistar. Thèse de Doctorat. Université Annaba. p47-48.
- **Zeyons O., 2008.** Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. France. p 330.

Annexes

Les annexes

Tableau 01: Matériel chimique

Matériel chimique	
Rouge neutre	Acide sulfosalicylique
Ethanol a 95 %	Acide orthophosphorique
Eau de pluie	BBC (Bleu Brillant de Coomassie)
BSA (albumine sérum de bœuf)	Acide Sulphosphovanylique diamine
Eau distillée	EDTA (acide Ethylènetétracétyque)
Glucose	Tompon phosphate salin
TCA (trichloroacétique)	Chloroforme
Anthrone	Ethère
Acide sulfurique	
DTNB (acide dithio nitrobenzoïque)	

Tableau 02: Instrument et appareillage

Instrument et appareillage	
Cristallisoir	Agitateur magnétique
Erlenmeyers	Tubes à essai
Pipettes graduée : 20ml	Tube eppendorfs
Pipettes pasteurs	Pissettes
Balance de précision	Becher
Plaque chauffante	Fiole Jaugée
Microscope optique	Centrifugeuse
Lame et lamelle	Spectrophotomètre
Chronomètre	Cuves pour le spectrophotomètre(en plastique et quartz)
Ph mètre	Bain marie
Micropipette : 50µl, 200µl, 1000µl	Tubes secs
Flacons	Oculaire graduée
Papier aluminium	Poire

Tableau 03 : Effet de Fe₃O₄-NPs sur la croissance des paramécies en fonction de temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10⁻²mg/ml	0,1mg/ml
Jours			
1^{ère} jour	112,8	109,266666	110,6
2^{ème} jour	120,866666	117,466667	116,533333
3^{ème} jour	133,6	123,8	120,333334
4^{ème} jour	151,333333	141,133333	131,266667
5^{ème} jour	159,666667	136	122
6^{ème} jour	168,733333	130,933333	115,333333
7^{ème} jour	178	122,066667	108,4
8^{ème} jour	183,466666	123,733333	103,866666
9^{ème} jour	184,333333	121,066667	96,8666666
10^{ème} jour	188,933333	115,333333	93,7333333
11^{ème} jour	193,4	108,733333	88,5333333
12^{ème} jour	195,333333	105,666667	85,2666666

Tableau 04: Cinétique de la croissance de la DO des paramécies témoins et traitées aux Fe₃O₄-NPs en fonction de temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Jours			
Avant traitement	0,1207	0,1202	0,1191
Après traitement	0,12163333	0,12016667	0,11956667
1^{ère} heure	0,1219	0,12143333	0,12076667
2^{ème} heure	0,12223333	0,1182	0,12096667
3^{ème} heure	0,1226	0,11963333	0,1214
4^{ème} heure	0,12296667	0,12066667	0,12083333
5^{ème} heure	0,12343333	0,12193333	0,12133333
6^{ème} heure	0,1239	0,12253333	0,12176667
2^{ème} jour	0,17376667	0,1666	0,16636667
3^{ème} jour	0,21626667	0,19603333	0,1934
4^{ème} jour	0,27843333	0,2394	0,2304
5^{ème} jour	0,31226667	0,22306667	0,2123
6^{ème} jour	0,38446667	0,21283333	0,18343333
7^{ème} jour	0,42386667	0,2008	0,1673
8^{ème} jour	0,47323333	0,2111	0,17263333
9^{ème} jour	0,47323333	0,2031	0,1585
10^{ème} jour	0,48496667	0,1839	0,1492
11^{ème} jour	0,49316667	0,17486667	0,1331
12^{ème} jour	0,5195	0,14573333	0,1135

Tableau 05: Effet de Fe₃O₄-NPs sur la vitesse des paramécies en fonction de temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Jours			
1 ^{ère} jour	5,56768559	5,63624882	5,61907079
2 ^{ème} jour	5,62913907	5,55555556	5,48065651
3 ^{ème} jour	5,48977394	5,42965781	5,40968701
4 ^{ème} jour	5,62060889	5,49828179	5,46301088
5 ^{ème} jour	5,82857144	5,38542768	5,17766497
6 ^{ème} jour	6,60621762	5,22006142	5,07399578
7 ^{ème} jour	6,03550294	4,82954544	4,95867768
8 ^{ème} jour	5,84862386	5,16717325	4,51327435
9 ^{ème} jour	6,46387834	4,8048048	4,21792622
10 ^{ème} jour	5,52359032	4,39963336	4,43213296
11 ^{ème} jour	6,08591887	4,55357143	4,26421405
12 ^{ème} jour	6,19684083	4,2857149	4,09906069

Tableau 06: Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs.

Echantillon	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Paramètre		
PR%	45,9044369 ± 3,5	56,3481229 ± 3,2

Tableau 07: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le nombre de génération des paramécies.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Paramètre			
N° de génération	9,23261771±0,002	9,19129584±0,003	9,17971989±0,003

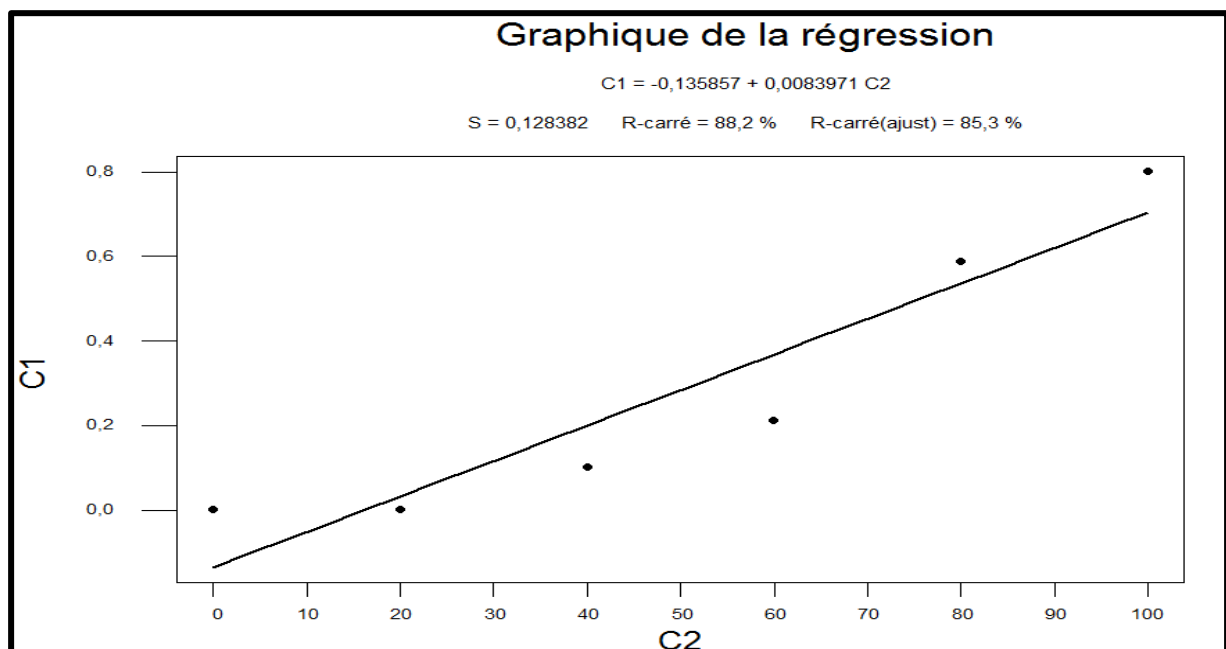
Tableau 08: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le temps de génération des paramécies.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Paramètre			
Temps de génération	2,59947944±0,001	2,61116608±0,001	2,61445886±0,001

Dosage des protéines

Tableau 09: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des protéines

Solutions	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère de l'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

**Figure 01:** Courbe d'étalonnage pour dosage les protéines

L'équation : $Y = -0.135857 + 0.0083971X$

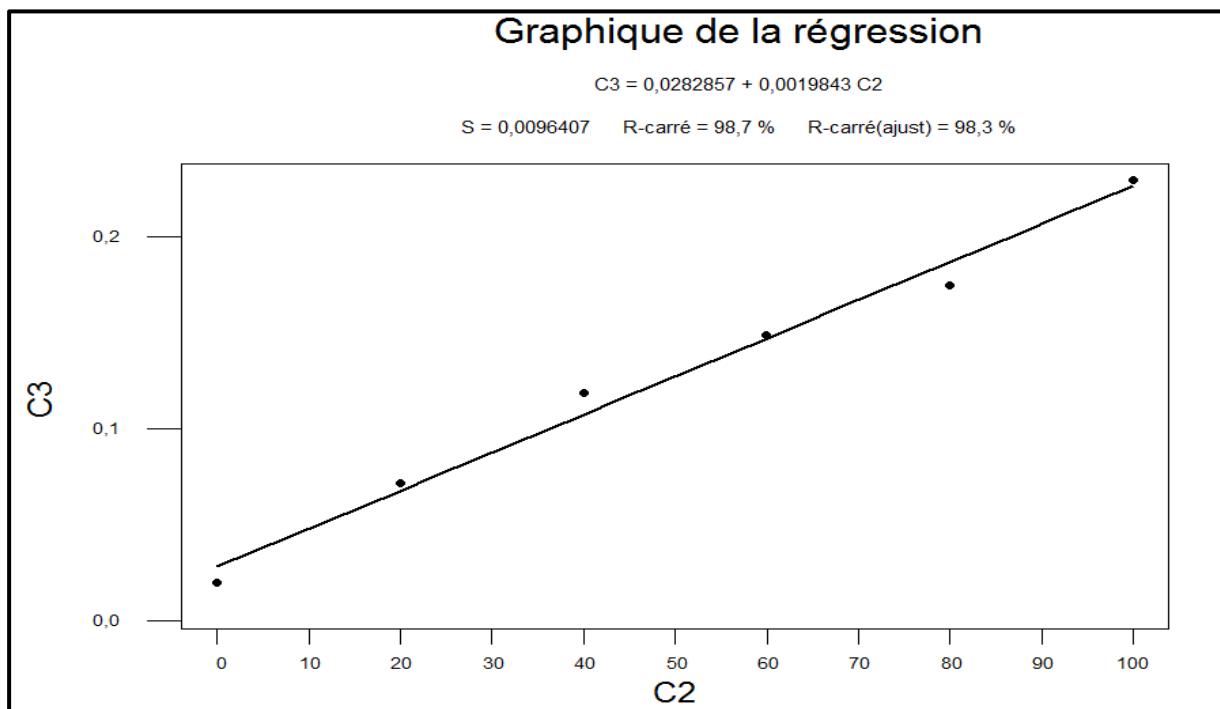
Tableau 10: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux de protéines totales en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg /ml	0,1mg/ml
7 ^{ème} jour	0,06620667±0,0011	0,07602±0,07602	0,11500667±0,115
12 ^{ème} jour	0,10626±0,0018	0,11474±0,0047	0,14386±0,0023

Dosage des lipides

Tableau 11: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des lipides

	Tubes					
Solutions	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipide (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther/chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif SPV(ml)	4	4	4	4	4	4

**Figure 02 :** Courbe d'étalonnage pour dosage les lipides.

L'équation : $Y=0.0282857+0.0019843X$

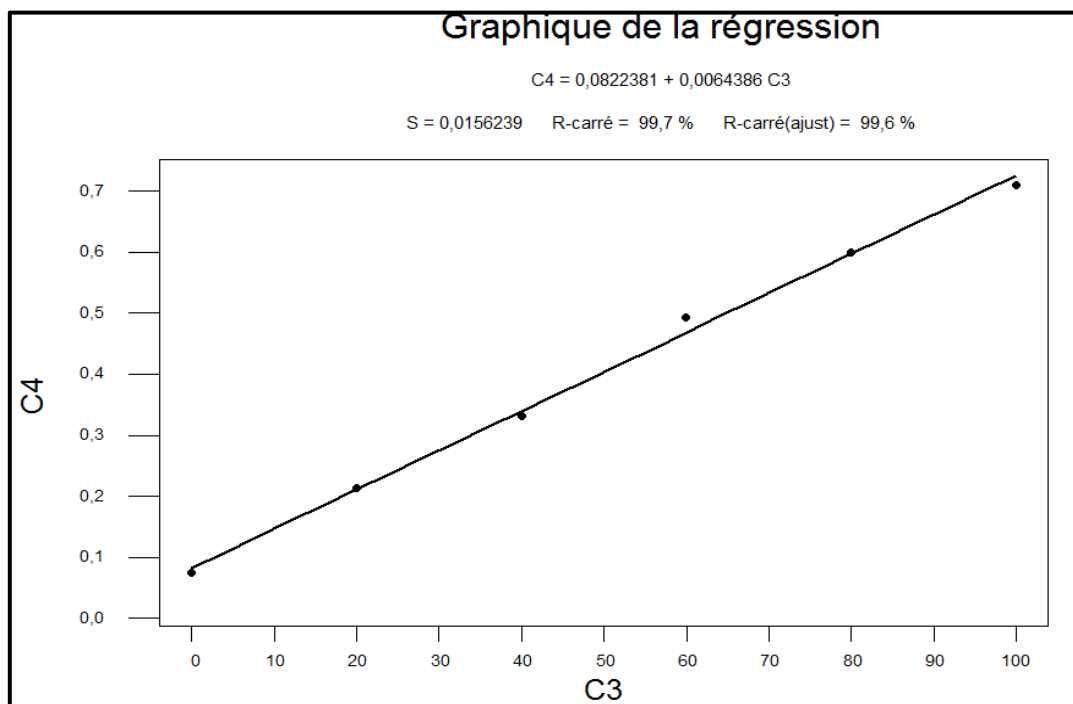
Tableau 12: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux de lipides en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7 ^{ème} jour	32,6112681±0,651038	27,6053047±0,561684	24,8503449±0,388914
12 ^{ème} jour	39,4146749±1,098218	24,2455976±0,267724	21,1714657±0,359504

Dosage des glucides

Tableau 13: Réalisation de la courbe d'étalonnage pour dosage des Glucides

Solutions	Tubes					
	1	2	3	4	5	6
Solution mère Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillé (µl) (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

**Figure 03:** Courbe d'étalonnage pour dosage les glucides.

L'équation : $Y=0.0822381+0.0064386X$

Tableau 14: Effet de Fe₃O₄-NPs sur le taux des glucides en fonction du temps.

Echantillo	Témoin	7.5*10-2 mg /ml	0,1mg/ml
n			
Jours			
7^{ème} jour	33,1340926±0,4170064	28,2883186±0,68082	25,8499004±0,50635
12^{ème} jour	37,7261882±0,39745903	24,9024894±0,39216386	23,7687026±0,36453612

Tableau 15: Effet de concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur l'activité Catalase chez les paramécies en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5*10-2 mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7^{ème} jour	0,00012056±1,9287E-06	0,00013014±3,8807E-07	0,00013983±2,177E-06
12^{ème} jour	0,00012335±1,6508E-06	0,000151±1,5218E-06	0,00015578±2,1591E-06

Tableau 16: Effet de concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur l'évolution du taux de GSH en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5*10-2 mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7^{ème} jour	1,7157E-07±1,2863E-08	1,298E-07±3,9661E-09	1,0804E-07±4,4534E-09
12^{ème} jour	2,359E-07±8,2489E-09	9,7872E-08±6,191E-09	8,4785E-08±2,7916E-09

Tableau 17 : Effet de deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur l'activité GST des *Paramécies sp* en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7 ^{ème} jour	4,5686E-07±3,9703E-08	6,6804E-07±3,443E-08	8,2933E-07±4,9305E-08
12 ^{ème} jour	4,9116E-07±1,3395E-08	7,2708E-07±3,004E-08	9,2938E-07±3,6647E-08

Tableau 18: Effet de deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur l'activité GPx des paramécies en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7 ^{ème} jour			0,00163868±4,0415E-
	0,0016187±5,5515E-06	0,00162862±3,3994E-06	06
12 ^{ème} jour	0,00162536±4,6122E-06	0,00165736±7,9417E-06	0,0016727±3,6538E-06

Tableau 19: Effet de deux concentrations croissantes de Fe₃O₄-NPs sur taux de MDA en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7 ^{ème} jour	0,99389835±0,06491009	1,73191064±0,08168429	2,03211596±0,05239624
12 ^{ème} jour	1,36430717±0,13685984	2,23815785±0,0551439	2,49031159±0,06567979

Dosage du cytochrome

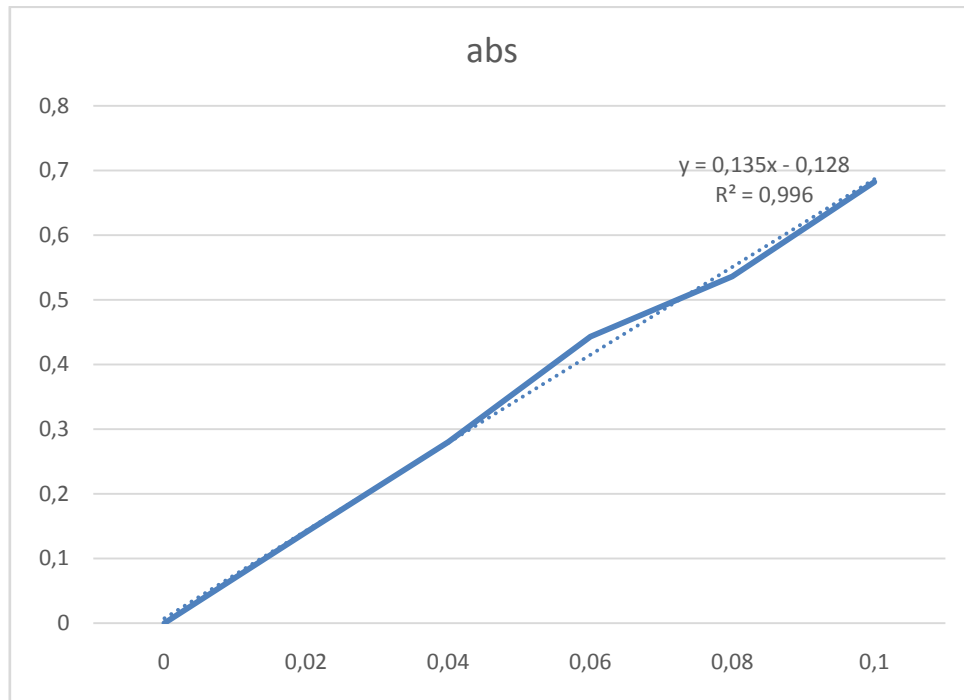


Figure 04 : Courbe d'étalonnage pour dosage les glucides.

L'équation : $Y=0.135X-0.128$

Tableau 20: Effet de deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs sur la concentration du cytochrome C en fonction du temps.

Echantillon	Témoin	7.5×10^{-2} mg /ml	0,1mg/ml
Jours			
7 ^{ème} jour	0,14533333±0,00152753	0,152±0,001	0,15833333±0,00152
12 ^{ème} jour	0,14833333±0,0011547	0,15366667±0,00152753	0,15966667±0,00152

Tableau 21: Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des deux concentrations croissantes de Fe_3O_4 -NPs en fonction du temps.

	Témoin	7.5×10^{-2} mg /ml	0,1mg/ml
Densité Optique	0,0151±0,00077889	0,039±0,00182	0,05776667±0,0043

Tableau 22: Effets de Fe₃O₄-NPs sur le volume des mitochondries des paramécies après l'injection du Ca²⁺.

Echantillon	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
Densité Optique			
0	0	0	0
10	0,017	0,0427	0,0617
20	0,025	0,0515	0,0726
30	0,032	0,0642	0,0844
40	0,027	0,0568	0,0803
50	0,021	0,0546	0,0767
60	0,019	0,0538	0,0746
70	0,019	0,0536	0,0738
80	0,018	0,0536	0,0738

Tableau 23: Effets Fe₃O₄-NPs sur la respiration mitochondrial.

	Témoin	7.5×10 ⁻² mg/ml	0,1mg/ml
0	1,1	1,1	1,04
15	1,22	1,11	1,1
30	1,28	1,18	1,15
45	1,35	1,16	1,13
60	1,36	1,14	1,11
75	1,38	1,12	1,09
90	1,39	1,1	1,06
105	1,41	0,9	0,8
120	1,42	0,7	0,6

Les statistiques

Le nombre des paramécies

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
1	2	23407	11703,4	38,39	0,000
Error	32	9756	304,9		
Total	34	33162			

L'absorbance

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
1	2	0,2224	0,111194	17,11	0,000
Error	32	0,2080	0,006500		
Total	34	0,4304			

La vitesse

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
1	2	3,150	1,5749	9,97	0,001
Error	24	3,793	0,1580		
Total	26	6,943			

Le nombre de génération

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
1	2	521679	260839	27,24	0,000
Error	33	315957	9574		
Total	35	837636			

Le temps de génération

ANOVA à un facteur contrôlé : C1 en fonction de C2

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
1	2	521679	260839	27,24	0,000
Error	33	315957	9574		
Total	35	837636			

Les métabolites des paramécies

Le taux des protéines

ANOVA à deux facteurs contrôlés : Protéine en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	1	0,005731	0,005731	96,62	0,000
C3	1	0,005683	0,005683	95,81	0,000
Error	15	0,000890	0,000059		
Lack-of-Fit	3	0,000780	0,000260	28,58	0,000
Pure Error	12	0,000109	0,000009		
Total	17	0,012304			

Le taux des lipides

ANOVA à deux facteurs contrôlés : lipide en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,028	0,028	0,00	0,000
C1	2	558,615	279,307	34,44	0,000
Error	14	113,527	8,109		
Lack-of-Fit	2	106,635	53,317	92,82	0,000
Pure Error	12	6,893	0,574		
Total	17	672,170			

Le taux des glucides

ANOVA à deux facteurs contrôlés : glucide en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,383	0,383	0,09	0,767
C1	2	388,089	194,045	46,08	0,000
Error	14	58,956	4,211		
Lack-of-Fit	2	54,941	27,471	82,09	0,000
Pure Error	12	4,015	0,335		
Total	17	447,429			

Les paramètres de stress oxydatif

L'activité CAT

ANOVA à deux facteurs contrôlés : CAT en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,000000	0,000000	34,64	0,000
C1	2	0,000000	0,000000	47,16	0,000
Error	14	0,000000	0,000000		
Lack-of-Fit	2	0,000000	0,000000	28,62	0,000
Pure Error	12	0,000000	0,000000		
Total	17	0,000000			

Le taux de GSH

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GSH en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,000000	0,000000	0,06	0,807
C1	2	0,000000	0,000000	29,48	0,000
Error	14	0,000000	0,000000		
Lack-of-Fit	2	0,000000	0,000000	53,98	0,000
Pure Error	12	0,000000	0,000000		
Total	17	0,000000			

Le taux de GST

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GST en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,000000	0,000000	10,01	0,007
C1	2	0,000000	0,000000	132,35	0,000
Error	14	0,000000	0,000000		
Lack-of-Fit	2	0,000000	0,000000	0,87	0,000
Pure Error	12	0,000000	0,000000		
Total	17	0,000000			

Le taux de GPx

ANOVA à deux facteurs contrôlés : GPx en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,000000	0,000000	286,72	0,000
C1	2	0,000000	0,000000	19,76	0,000
Error	14	0,000000	0,000000		
Lack-of-Fit	2	0,000000	0,000000	9,76	0,003
Pure Error	12	0,000000	0,000000		
Total	17	0,000000			

Le taux de MDA

ANOVA à deux facteurs contrôlés : MDA en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C3	1	0,89091	0,89091	93,51	0,000
C1	2	3,79353	1,89676	199,09	0,000
Error	14	0,13338	0,00953		
Lack-of-Fit	2	0,01423	0,00712	0,72	0,508
Pure Error	12	0,11915	0,00993		
Total	17	4,81783			

Le taux de cytochrome

ANOVA à deux facteurs contrôlés : cytochrome en fonction de [C]; TPS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C9	1	0,000975	0,000975	9,82	0,007
C7	2	0,024047	0,012023	121,12	0,000
Error	14	0,001390	0,000099		
Lack-of-Fit	2	0,000126	0,000063	0,60	0,564
Pure Error	12	0,001263	0,000105		
Total	17	0,026411			

L'effet sur l'activité mitochondriale

Volume des mitochondries

ANOVA à un facteur contrôlé : la Volume des mitochondries en fonction de [C]

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C9	2	0,002744	0,001372	118,39	0,000
Error	6	0,000070	0,000012		
Total	8	0,002813			

Variation du la perméabilité mitochondrial

ANOVA à un facteur contrôlé : la perméabilité mitochondrial en fonction de [C]

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	2	0,011173	0,005586	157,61	0,000
Error	21	0,000744	0,000035		
Total	23	0,011917			

Quantité d'oxygène consommé

ANOVA à un facteur contrôlé : Quantité d'oxygène consommé en fonction de [C]

$\alpha = 0,05$

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	2	0,5168	0,25840	11,11	0,000
Error	24	0,5583	0,02326		
Total	26	1,0751			

Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Amarouch Amel

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 4015700

Année universitaire : 2015/2016

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie - Xenobiotique et Risques Toxicologiques

Intitulé du mémoire : Nanotoxicité de Fe_3O_4 (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium* sp.

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 31.05.2016

Signature de l'étudiant(e) :





Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : Abid Amour

Régulièrement inscrit(e) en **Master** au département : de Biologie Appliquée

N° de carte d'étudiant : 4045678

Année universitaire : 2015-2016

Domaine : Science de la matière et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Toxicologie : Xénobiotiques et risque toxicologique

Intitulé du mémoire : Nanotoxicité de Fe₃O₄ NP sur les parois

de Streptococcus sp. d'un modèle biologique alternatif le

Paramecium sp.

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 31.08.2016

Signature de l'étudiant(e) :

