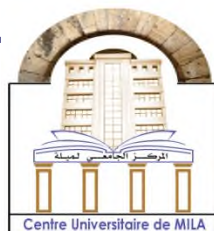


N°Ref :.....



## Centre Universitaire AbdelhafidBOUSSOUF-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement

Option : Biochimie et Microbiologie appliqué

Thème:

**Stress oxydatif induit par le Paracétamol  
(N-Acétyle-P-Aminophenol) chez un protiste d'eau  
douce (*paramécium sp*)**

Présenté par : KERROUCHE Fatima-zahra

LAOUIRA Hayet

Devant le jury composé de :

KALLAB Rabah

M.A.A

Président

BOUNAMOUS Azzedine

M.A.A

Examineur

BOULASSEL Amina

M.A.B

Promoteur

Année Universitaire: 2015/2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## Remerciements

D'abord nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce travail.

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

Nous tenons à remercier monsieur **KALLAB Rabah** d'avoir accepté de présider le jury d'examen. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance.

Nous tenons aussi particulièrement à exprimer nos vifs et sincères remerciements au monsieur **BOUNAMUOS Azzedine** pour sa disponibilité, sa grande patience, et toutes les corrections qu'il a bien apportées à ce travail et pour avoir accepté d'en être l'examineur.

Merci du fond du cœur.

Merci à tous les professeurs qui nous ont donné l'envie d'apprendre, la curiosité, intellectuelle, et le goût de la recherche et un grand remerciement à monsieur **SIDANI Saïd** pour son encouragement et son soutien.

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

Nous tenons à remercier vivement les ingénieurs du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba.

Nous exprimons aussi toute notre gratitude à monsieur le professeur **Mohamed Réda DJEBAR**, professeur à l'université de Annaba, c'est aussi avec une profonde sincérité, que nous adressons toute notre reconnaissance au Professeur **Houria BERREBAH-DJEBAR**.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.





*Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents à que je dois tout*

*A mes sœurs et mes frères qui j'adore*

*A mon frère, que je souhaite il soit*

*dans le vaste paradis de dieu, je dédie ce succès*

*Je ne t'ai jamais oublié et tu resteras toujours dans mon cœur.*

*Une pieuse pensée pour toi.*

*A mes chers amis : Fatima- Zohra, Mouna, Aicha.*

*A mes collègues et toute personne qui ma connu.*

**Hayet**



*Dédicaces*

*A mes parents à qui je dois tout*

*A mes sœurs et mes frères*

*A tous mes amies*

**Fatima-zohra**

A decorative border with a repeating geometric pattern of diamonds and lines surrounds the page.

# *Sommaire*

## *Sommaire*

<i>Listes des Figures</i> .....	VIII
<i>Listes des Tableaux</i> .....	X
<i>Liste des Abréviations</i> .....	XI

### *Introduction*

## **Partie I: Etude bibliographique**

### *Chapitre I : Les substances pharmaceutiques*

<b>1- Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement</b> .....	<b>3</b>
<b>2- Définition de substance pharmaceutique</b> .....	<b>3</b>
<b>3- Les sources et le comportement des médicaments dans l'environnement</b> .....	<b>4</b>
3-1- Les sources de pollution par les médicaments .....	4
3-2- Dégradation des médicaments dans l'environnement.....	5
<b>4- Concentration des médicaments dans les eaux superficielles</b> .....	<b>6</b>
<b>5- Effet des substances pharmaceutiques sur les écosystèmes aquatiques</b> .....	<b>8</b>
5-1- Toxicité aiguë .....	8
5-2- Toxicité chronique .....	9
<b>6- Toxicité des mélanges de médicaments</b> .....	<b>10</b>
<b>7- Généralités sur l' xénobiotique utilisée : Paracétamol</b> .....	<b>11</b>
7-1- Définition du Paracétamol.....	11
7-2- L'origine du Paracétamol .....	11

7-3- Caractéristiques du paracétamol .....	12
--	----

## ***Chapitre II : Généralité sur paramicium sp.***

<b>1- Rappel sur la biodiversité microbienne.....</b>	<b>14</b>
1-1- Rappel sur les protistes .....	14
1-2- Phylogénie des Protistes .....	15
<b>2- Paramécie.....</b>	<b>16</b>
2-1- Définition de la paramécie .....	16
2-2- Etat morphologique .....	17
2-3- Les principaux caractères biologiques de la paramécie .....	19
2-4- Justification du choix de <i>Paramecium sp.</i> Comme modèle biologique.....	21

## ***Chapitre III : Stress oxydatif.***

<b>1- Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes et de radicaux libres.....</b>	<b>22</b>
<b>2- Définition du stress oxydant.....</b>	<b>23</b>
<b>3- Méthodes de mesure / d'évaluation du stress oxydant .....</b>	<b>24</b>
<b>4- Principales ERO et mécanismes de leur production .....</b>	<b>25</b>
<b>5- Système antioxydants .....</b>	<b>27</b>
5-1- Les Antioxydants endogènes.....	28
5-2- Antioxydants exogènes ou nutritionnels ou nom enzymatique.....	30
<b>6- Dégâts cellulaires .....</b>	<b>31</b>

## **Partie II: Etude Expérimentale**

### ***Matériel et Méthodes***

<b>1- Matériel.....</b>	<b>32</b>
1-1- Matériel biologique.....	32
1-2- Matériels chimique.....	33
<b>2- Méthodes.....</b>	<b>34</b>
<b>2-1- Physiologie .....</b>	<b>34</b>
2-1-1- Préparation de culture de paramécie.....	34
2-1-2- Protocoles expérimentaux mise en place.....	36
2-1-2-1- Cinétique de croissance cellulaire.....	36
2-1-2-2- Traitement par le Paracétamol.....	36
2-1-2-3- Pourcentage de réponse.....	37
2-1-2-4- Taux de mortalité.....	38
<b>2-2- Dosage des paramètres biochimiques ou dosage des métabolites.....</b>	<b>38</b>
2-2-1- Dosage des protéines et des lipides.....	38
2-2-2- Dosage des glucides .....	39
<b>2-3- Dosage des biomarqueurs de stress oxydative .....</b>	<b>40</b>
2-3-1- Dosage du glutathion (GSH).....	41
2-3-2- L'activité catalase .....	42
2-3-2-1- Principe de dosage .....	42
2-3-2-2- Protocole expérimental.....	42
 <b><i>Résultats et discussion</i></b>	
<b>1-Résultat.....</b>	<b>45</b>

<b>1-1- Physiologie.....</b>	<b>45</b>
1-1-1- Courbe de croissance.....	45
1-1-2- Effet du paracétamol sur la cinétique de croissance .....	46
1-1-3- Effet du Paracétamol sur le pourcentage de réponse (PR).....	47
1-1-4- Evaluation du taux de mortalité .....	47
<b>1-2- Dosage des métabolites.....</b>	<b>48</b>
1-2-1- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux de protéines.....	48
1-2-2- Effet de concentrations croissantes de paracétamol sur le taux des lipides .....	49
1-2-3- Effet de concentrations croissantes de paracétamol sur le taux des glucides.....	50
<b>1-3- Dosage des biomarqueurs de stress oxydatif.....</b>	<b>51</b>
1-3-1- Effet de concentrations croissantes de paracétamol sur le taux de GSH.....	51
1-3-2- Effet de concentrations croissantes de paracétamol sur l'activité catalase..	52
<b>2- Discussion.....</b>	<b>54</b>
<b><i>Conclusion.....</i></b>	<b>59</b>
<b><i>Perspectives .....</i></b>	<b>61</b>
<b><i>Références Bibliographiques.....</i></b>	<b>62</b>
<b><i>Résumé</i></b>	

## Liste des Figures

Les figures	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	Les différentes sources de contaminations par les médicaments.	<b>5</b>
<b>Figure 02</b>	Schéma de la réaction d'acylation du para-aminophénol avec l'anhydrique acétique donne du paracétamol.	<b>12</b>
<b>Figure 03</b>	Position du genre <i>paramécium</i> dans le système « Trois domaines ».	<b>16</b>
<b>Figure 04</b>	Représentation simplifiée du cortex de la paramécie.	<b>18</b>
<b>Figure 05</b>	Structure d'une paramécie sous microscope.	<b>19</b>
<b>Figure 06</b>	cycle sexuelle et réorganisation macronucléaire : Événement cellulaire.	<b>20</b>
<b>Figure 07</b>	Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes.	<b>24</b>
<b>Figure 08</b>	Répartition des principales défenses anti oxydantes dans la cellule.	<b>27</b>
<b>Figure 09</b>	Glutathion réduit ou à-glutamyl-cystéinyl-glucine.	<b>29</b>
<b>Figure 10</b>	Dégâts de stress oxydative.	<b>31</b>
<b>Figure 11</b>	Structure d'une paramécie.	<b>33</b>
<b>Figure 12</b>	Formule chimique du paracétamol.	<b>33</b>
<b>Figure 13</b>	<i>Paramecium sp</i> observée sous microscope optique (x40).	<b>35</b>

<b>Figure 14</b>	L'autoclave.	<b>43</b>
<b>Figure 15</b>	Etuve.	<b>43</b>
<b>Figure 16</b>	La balance de précision.	<b>43</b>
<b>Figure 17</b>	Centrifugeuse.	<b>43</b>
<b>Figure 18</b>	Bain marie	<b>44</b>
<b>Figure 19</b>	Spectrophotomètre.	<b>44</b>
<b>Figure 20</b>	pH-mètre.	<b>44</b>
<b>Figure 21</b>	Cinétique de la croissance des paramécies en fonction du temps.	<b>45</b>
<b>Figure 22</b>	Cinétique de la croissance des paramécies traitées au Paracétamol.	<b>46</b>
<b>Figure 23</b>	Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de paracétamol.	<b>47</b>
<b>Figure 24</b>	Effet du Paracétamol sur le taux des protéines en fonction du temps.	<b>49</b>
<b>Figure 25</b>	Effet du Paracétamol sur le taux des lipides en fonction du temps.	<b>50</b>
<b>Figure 26</b>	Effet du Paracétamol sur le taux des glucides en fonction du temps.	<b>51</b>
<b>Figure 27</b>	Effet de Paracétamol sur le taux de GSH.	<b>52</b>
<b>Figure 28</b>	Effet de Paracétamol sur l'activité catalase.	<b>53</b>
<b>Figure 29</b>	Effet phioyologique et biochimique du Paracétamol observé.	<b>60</b>

### Liste des Tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableaux 01</b>	Niveaux de présence des médicaments dans les eaux superficielles (en $\mu\text{g/l}$ ).	<b>7</b>
<b>Tableaux 02</b>	Caractéristiques Physicochimiques du Paracétamol.	<b>34</b>
<b>Tableaux 03</b>	Evolution de taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps.	<b>48</b>

### *Liste des Abréviations*

**ADN** : Acide **D**ésoxyribonucléique.

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

**AINS** : **A**nti**I**nflam**M**atoires.

**AMPK** : **P**rotéine **K**inase **A**ctivé par le système AMP (Adénosine MonoPhosphate).

**APX** : Ascorbate –**P**eroxydase.

**ARNr** : Acide ribonucléique

**BSA** : Serum **A**lbumin **B**ovine.

**CAT** : **C**atalase.

°C : Degré **C**elsius.

**DL50** : **D**ose **L**étale.

**DO** : **D**ensité **O**ptique.

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

**EAA** : **E**spèces **a**zotées **a**ctives.

**ECOSAR**: **E**COlogical **S**tructure **A**ctivité **R**elationship.

**EDTA** : **A**cide **E**thylé**n**e**d**initrilotétra**a**cétique.

**EOA** : **E**spèces **o**xygénées **a**ctives.

**ERO** : **E**spèce **R**eactive de l'oxygène.

**g** : **g**ramme.

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

**GPx** : **G**lutathion **P**eroxydase.

**GR** : **G**lutathion **R**éductase.

**GSH** : **G**lutathion réduit.

**GSSG** : **G**lutathion disulfure.

**h** : **h**eur.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène.

**H<sub>2</sub>O** : Eau

**L** : Litre.

**min** : **min**ute.

**mg** : **milli**gramme.

**ml** : **milli**lêtre.

**NADH** : Nicotinamide adénine **d**inucléotide réduit.

**NADPH** : Nicotinamide adénine **d**inucléotide **p**hosphate réduit

**nm** : **nanom**ètre.

**nmol** : **nanomole**.

**NO** : Monoxyde d'azote/ **O**xyde **n**itrique .

**NO<sub>2</sub>**: Dioxyde d'azote.

**NOEC** : **N**o **O**bserved **E**ffet **C**oncentration.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: **O**xygène singlet.

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Superoxyde anion.

**O<sub>3</sub>**: **O**zone.

**•OH**: Radical hydroxyl.

**OMS**: **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

**ONOO** : Peroxynitrite.

**pH** : potentiel hydrogène.

**pKa** : Constante de dissociation d'une molécule.

**PR** : Pourcentage de réponse.

**PTP** : Pore de transition de perméabilité.

**Q10** : Quinone 10.

**RL**: Radical Libre.

**RNS**: Reactive Nitrogène Species

**RONs**: Reactive Oxygen and Nitrogen Species.

**ROS**: Reactive Oxygen Species.

**RS•**: Radical thiyl.

**-SH**: Gropment thiol.

**SOD** : Superoxide dismutases.

**STEP**: Station d'épuration .

**TCA**: Acide Trichloracétique.

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

**UV** : Ultra Violet.

**Vit** : Vitamine.

**µg** : Microgramme.

**µM** : Micromole.

A decorative border with a repeating geometric pattern of diamonds and lines surrounds the page.

# *Introduction*

## **Introduction**

L'écosystème aquatique se définit par l'ensemble constitué de l'eau et des espèces qui y vivent. L'état d'équilibre résulte de toutes les interactions entre les organismes vivants entre eux d'une part, et entre les différentes espèces et leur milieu de vie d'autre part.

Néanmoins, cet équilibre devient de plus en plus menacé par la pollution, due essentiellement à l'homme et ses activités (**Štirn, 1982; Suty, 2010**).

De nombreuses substances toxiques générées par les activités humaines sont quotidiennement déversées dans l'environnement aquatique. Les pollutions d'origine chronique contribuent majoritairement à la détérioration des écosystèmes aquatiques. De plus, de nouvelles molécules chimiques sont constamment synthétisées. Ces substances étrangères aux organismes vivants (hormis certains métaux essentiels), ou xénobiotique, contaminent tous les compartiments (sédiment, colonne d'eau) et par là même de nombreuses espèces animales aquatiques.

Les espèces réactives de l'oxygènes (ROS) , des sous – produits naturels formées lors des activité métaboliques normales, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, quant ils sont sous contrôle (**Servidadio et al.,2013, Winterbourn,2015**),et sont impliquées dans la modulation de la fonction cellulaire (différenciation ,prolifération ),quant ils sont à des faible concentrations(**Murrell et al.,1990, Allen,1991**). La cellule est dotée d'un certains nombres de mécanismes de défense qui peuvent neutraliser les radicaux libre et prévenir les dommages intracellulaires, en réduisant les effets nocifs des ROS.

Mais à des concentrations plus élevées, les radicaux peuvent être néfastes. A fin de s'en protéger la cellule a mis en place des systèmes de défense.

S'ils sont dépassés ou inefficaces, un déséquilibre se produit en faveur des radicaux libre, il ya alors stress oxydative, pathologique pour les tissus et cellulaires (**Darley-USmar et Halliwell, 1996; Chaudiere et Ferrari-Iliou, 1999; Evans et Halliwell, 1999**). Les espèces produits peuvent générer un déséquilibre de balance antioxydants /oxydant rend la cellule vulnérable aux attaque des ROS et peuvent en effet altérer des macromolécules biologiques indispensable au fonctionnement cellulaire comme : lipides, protéines, glucides, ainsi que les membranes sont oxydé.

---

Ils peuvent aussi affecter la dégradation de la matrice extracellulaire. Le stress oxydatif va perturber les voies normales physiologiques et provoquer la mort cellulaire.

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

Le choix de cette espèce, est dû, à son organisation cellulaire très similaire à celle des cellules eucaryotes supérieures. Ceci nous a conduits à étudier la conséquence des fluctuations de certains paramètres physicochimiques du milieu sur le comportement de la paramécie.

Enfin les résultats obtenus à partir de ces essais nous permettront d'émettre une hypothèse sur la toxicité du Paracétamol sur un modèle alternatif et d'ouvrir par conséquent sur des perspectives.

---

A decorative border with a repeating geometric pattern of diamonds and circles surrounds the page.

*Partie I*

*Etude bibliographique*



# *Chapitre I*

## *Les substances pharmaceutiques*

## **1-Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement**

La problématique environnementale concernant les médicaments est liée au fait qu'ils soient développés pour avoir des effets sur le vivant puis rejetés même en faible quantité dans l'environnement. En effet ces molécules sont nécessairement absorbables, hydrosolubles ou liposolubles et plus ou moins persistantes dans l'organisme afin de produire un effet (**Steger-Hartmann et al., 1997**). Elles peuvent être éliminées via les urines à plus de 80 % sans transformation, ainsi plusieurs questions se posent quant à un possible impact environnemental sur la faune et la flore (**Ferrari et al., 2003**).

## **2- Définition de substance pharmaceutique**

Les substances pharmaceutiques sont des molécules possédant des propriétés curatives, préventives ou administrées en vue d'établir un diagnostic. Elles sont classées selon :

- L'effet pour lequel elles sont conçues (Antibiotiques, Analgésiques...).
- Leur structure chimique (parmi les Antibiotiques : Quinolones, Cephalosporine...).
- Leur mode d'action (anti-métabolites ou agents alkylants) (**Roig, 2008**).

Leurs propriétés physicochimiques leur confèrent des capacités de franchissement des membranes biologiques, elles sont généralement considérées comme des polluants émergents compte tenu du récent intérêt dont elles font l'objet, et sont souvent classées dans une catégorie que l'on qualifie de « micropolluants » car les concentrations retrouvées dans les milieux aquatiques sont de l'ordre du nanogramme ou du microgramme par litre (**Roig, 2008**). Les produits pharmaceutiques, qui sont conçus pour être des substances biologiquement actives, peuvent aussi être source de préoccupation par leurs interactions possibles avec les organismes non cibles dans l'environnement mais aussi pour les humains (**Klavarioti et al., 2009**). Ils sont généralement lipophiles et résistants à la biodégradation, ayant ainsi un grand potentiel d'accumulation et de persistance dans l'environnement (**Paxeus, 2004**).

En outre, les produits pharmaceutiques peuvent être stables dans l'environnement ou soumis à des transformations biotiques et/ou abiotique, et parmi les transformations abiotiques, la photo-dégradation qui est le processus d'élimination le plus important, ce qui conduit parfois à la formation de produits beaucoup plus toxiques que les composés parentaux (**Isidori et al., 2009**).

### **3- Les sources et le comportement des médicaments dans l'environnement**

#### **3-1- Les sources de pollution par les médicaments**

Les résidus de médicaments humains ont pour origine les effluents des hôpitaux et pour la médecine de ville, les réseaux d'évacuation des eaux usées contenant les excréta des patients. Ces effluents chargés de résidus sont traités dans la station d'épuration avant de rejoindre le milieu aquatique.

En revanche, les résidus vétérinaires rejoignent l'environnement sans stade d'épuration. Le cheminement des effluents issus de l'usage vétérinaire est complexe à suivre ; en effet les effluents d'élevage peuvent rejoindre les eaux souterraines par percolation des excréments animaliers (lors des pâtures) et par épandage des lisiers agricoles. Dans les effluents d'élevage industriels, **Carlson et al., (2004)** trouvent des concentrations pouvant aller jusqu'à plusieurs milligrammes de tétracyclines par gramme de lisier de porcs ou de moutons.

A partir des laboratoires de fabrication des substances pharmaceutiques, des résidus de synthèse comme des solvants sont encore rejetés (**Dunn et al., 2004**). Avec le développement des techniques analytiques, la quantification de ces substances est réalisable dans les divers compartiments environnementaux tels que les eaux usées urbaines, les boues des stations d'épuration, les effluents d'élevage, les sols amendés par ces produits, les eaux de surface, les eaux souterraines, les eaux potables et les eaux estuariennes et côtières (Figure 01).



**4- Concentration des médicaments dans les eaux superficielles**

En fonction des apports (STEP et autres), des phénomènes de dégradation (dans les stations et dans le milieu), les concentrations vont varier dans les écosystèmes aquatiques.

Les AINS à la fois fortement consommés et relativement rémanents sont systématiquement retrouvés à des taux de l'ordre du  $\mu\text{g./l}$  ( **Koplin et al., 2004**) (Tableau 01).

Aux Etats-Unis, **Kolpin et al., (2002)** ont entrepris entre 1999 et 2000 un premier inventaire de la contamination des eaux de 139 rivières de 30 états. Parmi les 95 substances diverses qui étaient recherchées, 82 ont été retrouvées dans des eaux utilisées pour l'alimentation en eau potable. En France, **Togola et al., (2006)** ont décelé la présence de carbamazépine, diclofénac et paracétamol dans les eaux de l'Hérault, fleuve côtier de la méditerranée.

Ces travaux confirment ceux d'autres auteurs tels que **Ternes (1998), Zuccato et al., (2000), Tauxe-Wuerch et al., (2005)** qui vont tous dans le sens d'une introduction probable de substances médicamenteuses dans les eaux littorales.

Tableau 01 : Niveaux de présence des médicaments dans les eaux superficielles (en µg/l).

Class thérapeutique	Moécules	Concentration (µg/l) min-max ou médiane	Références
AINS	Ibuprofène	0.08-0.22	<b>Bendz et al., (2005)</b>
		<0.002-0.146	<b>Wiegel (2003)</b>
		<0.02-5.044	<b>Ashton et al., (2004)</b>
AINS	Diclofénac	0.2-1.0	<b>Kolpin et al., (2002)</b>
		1.2	<b>Buses et al., (1998)</b>
		<0.02-0.568	<b>Ashton et al., (2004)</b>
AINS	Ketoprofène	0.01-0.07	<b>Bendz et al., (2005)</b>
		0.12	<b>Ternes (1998)</b>
Analgesique	Paracetamol	0.11	<b>Kolpin et al.,(2004)</b>
	Déxtroproxyphe	<0.02-0.682	<b>Ashton et al., (2004)</b>
	Codeine	0.2-1.0	<b>Kolpin et al., (2002)</b>
Betabloquants	Propanolol	0.01-0.215	<b>Ashton et al., (2004)</b>
Agent de contraste	Iopromide	0.09	<b>Sacher et al., (2005)</b>
	Iopamidol	0.18	<b>Sacher et al., (2005)</b>
Antibiotique	Erythmycine	<0.01-1.22	<b>Ashton et al., (2004)</b>
		0.1-1.7	<b>Kolpin et al., (2002)</b>
	Triméthoprime	0.013-0.3	<b>Kolpin et al.,(2002)</b>
		<0.01-0.042	<b>Ashton et al., (2004)</b>
	Sulfaméthoxazole	<0.05-0.239	<b>Ashton et al., (2004)</b>
	0.15 (midian)	<b>Kolpin et al., (2002)</b>	
Chlortetracycline	0.42 (midian)	<b>Kolpin et al., (2002)</b>	
Ciprofloxacine	0.02 (midian)	<b>Kolpin et al., (2002)</b>	

## 5- Effets des substances pharmaceutiques sur les écosystèmes aquatique

Les recherches en écotoxicologie se tournent actuellement vers l'étude des effets sur les écosystèmes de composés actifs à de très faibles concentrations (de l'ordre de la dizaine de ng/l). Du fait de leur activité biologique, ces molécules ont souvent les mêmes cibles moléculaires chez l'homme et sur les espèces sauvages avec les mêmes effets indésirables, introduits dans l'environnement, ces substances vont affecter par les mêmes voies les animaux ayant des tissus et organes cibles similaires. Des expérimentations toxicologiques ont été réalisées pour déterminer les cibles spécifiques des substances pharmaceutiques chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, basés sur l'hypothèse de similitude des modes d'action. Dans cet objectif, des analyses *in vitro* sur modèles cellulaires de poisson et sur modèles d'invertébrés sont développés bien que la plupart des tests écotoxicologiques ne prennent en compte que les effets aigus *in vivo* après une courte exposition et plus rarement après une exposition chronique.

### 5-1- Toxicité aiguë

Des modèles mathématiques ont été développés pour estimer ou prédire les effets écotoxicologiques. Le modèle le plus couramment utilisé est l'ECOSAR (pour ECOlogical Structure Activity Relationship), c'est un logiciel micro-informatisé utilisé pour estimer la toxicité aquatique des produits chimiques en fonction de leur structure stérique (Sanderson *et al.*, 2004b ; Cleuvers, 2005). Ces méthodes aident à l'estimation du potentiel toxique ou à la compréhension du comportement d'un composé dans l'environnement, mais ne peuvent remplacer les essais *in vivo* et *in vitro*.

Quelques études de toxicité aiguë sur les classes thérapeutiques les plus étudiées précisent les concentrations toxiques:

#### 5-1-1- Les anti-inflammatoires AINS

Les données de toxicité varient pour chaque composé. Le diclofénac semble être le composé ayant la plus haute toxicité aiguë. Cleuvers (2003) et Ferrari *et al.*, (2004) ont montré que le phytoplancton réagit plus sensiblement (EC 50 (96h) : 14.5 mg/l) que le zooplancton (EC «concentration efficace» 50 (96 h) = 22.43 mg/l).

**5-1-2- Les neurotropes**

La fluoxétine est le composé reporté le plus toxique avec une toxicité aiguë de l'ordre de EC 50 (48h, algues) = 0.024 mg/l (**Brooks et al., 2003**) et LC 50 (48h) = 2 mg/l (**Kummerer, 2004**). Pour les organismes benthiques les LC 50 à 10 jours vont de 15.2 mg/kg de sédiment pour *Chironomus tentans* à 43 mg/kg pour *Hyaella azteca* (**Brooks et al., 2003**). La fluoxétine semble affecter le phytoplancton plus fortement que les autres organismes aquatiques. Le diazépam et la carbamazépine sont classés comme potentiellement dangereux pour les organismes aquatiques car la plupart des données de toxicité aiguë sont en dessous de 100 mg/l. La toxicité aiguë de la carbamazépine a été établie à 17.2 mg/l chez *Daphnia* dont la croissance est inhibée à 12.7 mg/l (**Thaker, 2005**).

**5-1-3- Les antibiotiques**

La toxicité des antibiotiques sur les algues vertes est moins marquée que sur les cyanophytes. L'érythromycine et la clarithromycine, deux antibiotiques de la famille des macrolides présentent toutefois des valeurs de toxicité très faibles: CE50 72 h respectives de 20 µg/l et 2 µg/l sur l'algue verte *P. subcapitata* (**Isidori et al., 2005**). Dans le cas des algues vertes, les antibiotiques les plus toxiques sont donc les macrolides, suivis par la streptomycine (aminoside anti-tuberculeux) et la lincomycine (lincosanide).

**5-2 -Toxicité chronique**

A l'heure actuelle les données de toxicité chronique sont peu nombreuses. En effet l'analyse de très faibles concentrations, la mise en évidence d'effets sublétaux et la mise en place de travaux sur des temps d'exposition longs ne sont pas simples. De plus la toxicité chronique induite par une molécule peut différer du mode d'action de la toxicité aiguë.

La toxicité chronique des substances pharmaceutiques est évaluée par des tests sur des organismes de laboratoires tels les algues, le zooplancton et autres invertébrés et les poissons (**Garric et al., 2006**).

**Webb (2001)** suggère, en comparant différents niveaux trophiques que, de manière générale, les algues seraient plus sensibles aux médicaments sélectionnés que *Daphnia magna* et que les poissons sont les moins sensibles. Il note également que les classes les plus toxiques sont les antidépresseurs, les antibiotiques et les antipsychotiques avec des

différences très importantes au sein d'une même classe. La toxicité chronique de l'ibuprofène sur *D. magna* et sur les mollusques semble limitée, avec des valeurs de NOEC de l'ordre du mg/l (**Pounds et al., 2008**).

### Exemple : les antibiotiques

Leur usage intensif en médecine humaine et animale présente deux conséquences en matière d'impact environnemental : la présence de résidus actifs et la sélection de bactéries antibiorésistantes. Des bactéries antibiorésistantes (en plus de celles existant naturellement) sont diffusées à partir des zones de sélection prioritaire telles que les élevages ou les établissements de soins.

Dans les pays industrialisés, **Albrich et al., (2004)** montrent une corrélation positive entre la quantité d'antibiotiques utilisés par habitant et le pourcentage de souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la pénicilline et aux macrolides. La France apparaît en tête des pays particulièrement concernés par rapport à ses voisins européens.

Dans des eaux potables, dès 1978, **Leclerc et al., (1978)**, montrent dans le Pas-de-Calais que 100% des *Aeromonas hydrophila* et 88% des *Klebsiella pneumoniae* résistent à l'ampicilline, dans la Moselle, **Schwartzbrod et al., (1983)** constatent que 0.6 à 6% des *Salmonella* isolées sont devenues résistantes à divers antibiotiques.

Dans les eaux usées d'élevage, **Koenraad et al., (1994)** observent 30% de *Campylobacter* multirésistants. L'eau de mer n'est pas épargnée puisqu'aux Canaries, **Junco et al., (2001)** isolent 42% des *Enterobacter faecalis* résistants à la tétracycline. La clarithromycine présente une haute toxicité vis à vis de l'algue verte (**Isidori et al., 2005**).

### 6- Toxicité des mélanges de médicaments

Certains auteurs tentent d'appréhender le potentiel synergique des mélanges médicamenteux. **Renner (2002)** a montré qu'un mélange d'ibuprofène, de fluoxétine et de ciprofloxacine possède une toxicité sur les plantes, le plancton et les poissons à des concentrations 100 à 200 fois plus faibles que celles des composés seuls. Ceci suggère que les composés apparaissant à concentration inférieures à leur NOEC peuvent contribuer à l'effet total du mélange. En comparant les effets individuels et l'effet mélange, l'étude de **Cleuvers (2003)** indique qu'il n'est pas possible de prédire l'effet des mélanges de molécules.

Le mélange carbamazépine / acide clofibrrique suit les lois d'additivité, alors que le mélange diclofénac /ibuprofène dépasse les prédictions et montre une toxicité synergique.

## 7- Généralités sur l' xénobiotique utilisée : Paracétamol

### 7-1- Définition du Paracétamol

Le paracétamol (ou acetaminophene), découvert il y a plus d'un siècle, est l'antalgique le plus utilisé au monde (**Bannwarth et Pehourcq ,2003**) sans doute du fait de sa parfaite tolérance aux doses thérapeutiques. Il appartient à la famille des Antalgiques non opiacés, de palier I de la classification de l'OMS. La totalité de son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, mais il s'agirait d'une action principalement centrale (**Remy et al., 2006**).

Il semble inhiber la cyclo-oxygénase (Cox) au niveau du système nerveux central sans action périphérique, raison pour laquelle il est dénué d'effets anti-inflammatoires. (**Zou et al., 1999**).

Le paracétamol dispose d'une activité antipyrétique et analgésique, tout comme les salicylés sans avoir d'activité anti-inflammatoire ou anti-agrégante plaquettaire, ni de toxicité sur la muqueuse gastroduodénale (**BIAM 2004**). Malgré l'ancienneté de cette molécule il demeure encore certaines incertitudes concernant son mode d'action.

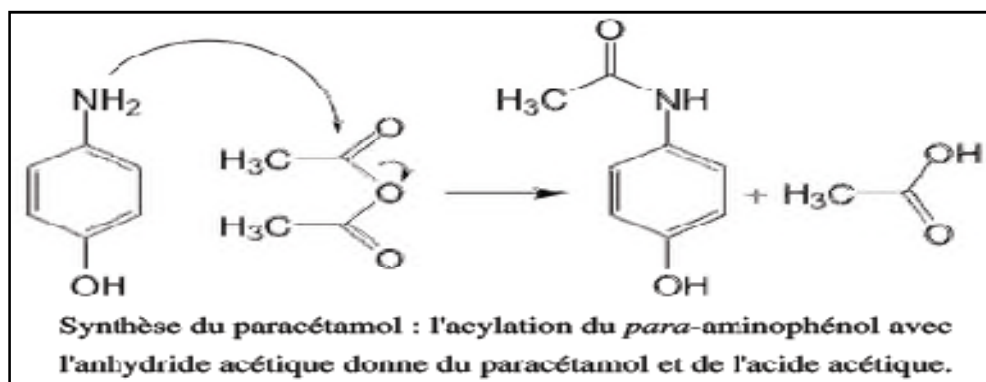
Considère lors de la classification de l'OMS comme un antalgique périphérique, l'action centrale du paracétamol est aujourd'hui démontrée (**Remy et al., 2006**) par inhibition de la synthèse de prostaglandines, issues de la cascade inflammatoire et par la modulation des messages nociceptifs (**Viel et al., 1999**).

Par ailleurs, certains proposent un mécanisme d'action sérotoninergique central par activation des neurones sérotoninergiques descendants, qui exercent au niveau spinal une action inhibitrice sur les voies de la douleur (**Bonnefont et al., 2003**).

### 7-2- L'origine du Paracétamol

Le paracétamol est d'origine synthétique. Il peut être obtenu par l'acylation (Figure 02) du para-amino-phénol en solution dans l'acide éthanoïque (acide acétique), par l'action de l'anhydride acétique à 100 °C (**Clayden et al., 2003 ; Mesplede et Saluzzo, 2004**).

Cette réaction d'acylation dépend du rapport des concentrations des réactants : à concentrations équivalentes en anhydride acétique et para-amino-phénol, le produit obtenu est exclusivement mono-acétylé, c'est-à-dire du paracétamol pur. Mais en présence d'un excès d'anhydride acétique, le produit obtenu est doublement acétylé et ne correspond pas au paracétamol. Dans ce dernier cas néanmoins, l'hydrolyse suffit pour la transformation du composé doublement acétylé en composé mono-acétylé, donc, en paracétamol.



**Figure 02 : Schéma de la réaction d'acylation du para-aminophénol avec l'anhydride acétique donne du paracétamol.**

Le paracétamol peut être aussi obtenu suivant une autre voie comprenant d'abord une acylation de l'aniline (appelée aussi phénylamine) au moyen de l'anhydride acétique (ou anhydride éthanoïque), suivie d'une hydroxylation de l'acétanilide obtenu sous l'action de l'acide ascorbique (Le Marec, 2005).

### 7-3- Caractéristiques du paracétamol

#### 7-3-1- Caractéristiques structurales

Le paracétamol est un dérivé phénolique. Sa structure comporte donc un cycle benzénique substitué par un groupement hydroxyle et un groupement acétamide en position *para*. Le paracétamol ne comporte pas de carbone asymétrique et n'a pas de stéréo- isomères (Clayden et al., 2003).

#### 7-3-2- Caractéristiques physico-chimiques

Le paracétamol est un acide organique faible ( $pK_a = 9,5$ ) très liposoluble, qui se présente sous forme de poudre cristalline, blanche, inodore et de saveur amère (Ellis, 2002 ; Serrie et Thurel, 2002).

Le paracétamol est soluble dans l'eau froide et peut atteindre la limite de 14,3g/l, alors que dans l'eau chaude les 50g/l, et dans l'éthanol les 140g/l (**Ellis, 2002**).Sa masse molaire est de 151,17 g/mol.



*Chapitre II*  
*Généralités sur paramécium sp*

## 1- Rappel sur la biodiversité microbienne

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

- Le domaine Bacteria comprend un règne : le règne des Eubactéries (les vraies bactéries).
- Le domaine Archea (du grec *arkhaios*, ancien) comprend aussi un règne: le règne des Archaeobactéries (les bactéries anciennes).
- Le domaine Eucarya comprend plus de quatre règnes qui incluent: les champignons, les algues, les protozoaires.
- Les Archaeobactéries, les Bactéries et les Eucaryotes d'aujourd'hui sont tous le produit de milliards d'années de sélection naturelle et tous hautement adaptés à l'environnement actuel et aucun d'entre eux n'est « primitif ».

### 1-1- Rappel sur les protistes

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

Les protistes furent classés en trois embranchements principaux **par Ernst Haeckel en 1866** selon leur mode d'alimentation:

**a)** les **protozoaires**, qui ressemblent à des animaux, sont **hétérotrophes** (dépend des autres organismes pour se nourrir).

**b)** les **algues**, qui ressemblent à des plantes, sont autotrophes (fabriquent leur propre nourriture).

**c)** les **myxomycètes** et les **champignons aquatiques**, qui sont apparentés aux champignons, sont hétérotrophes.

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

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

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

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

\*Les **Holotriches** (paramécie).

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

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

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

## **1-2- Phylogénie des Protistes**

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

Pour la classification phylogénétique moderne, le règne des protistes n'est plus pertinent.

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

Au total les scientifiques reconnaissent aujourd'hui une soixantaine de lignées. De plus, en phylogénétique moderne (figure03), végétal et animal deviennent des termes obsolètes (Cavalier Smith *et al.*, 2003).

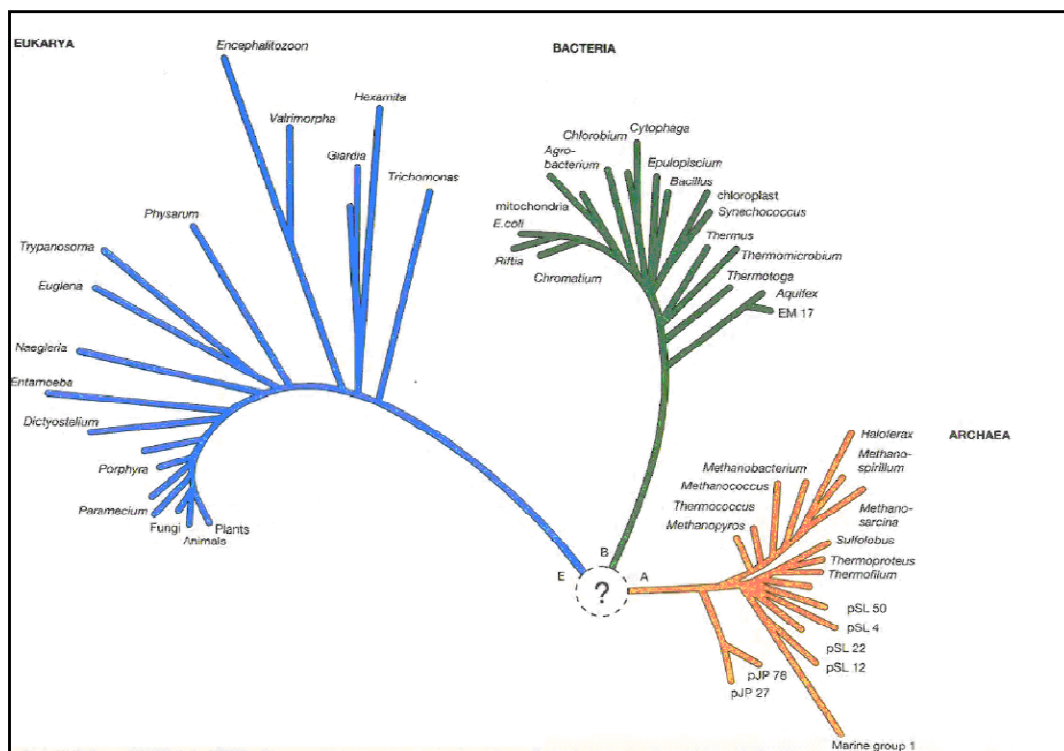


Figure 03 : Position du genre *Paramecium* dans le système « Trois domaines » (Woese *et al.*, 2000).

## 2- Paramécie

### 2-1- Définition de la paramécie

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

Le genre *Paramecium* inclut environ 15 espèces, actuellement enregistrées, mais moins de 10 peuvent être considérés comme *Paramecium* vrai.

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

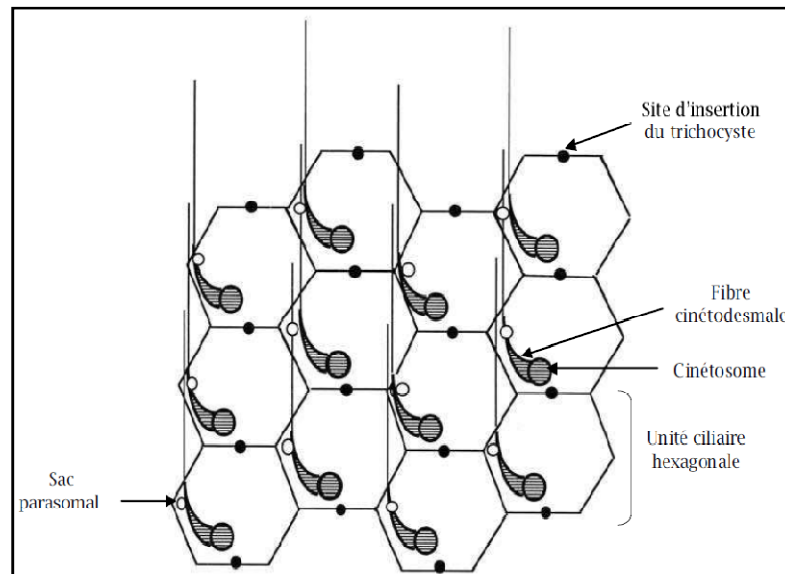
**Kahl (1935)** a ajouté la description de : *P. traunsteineri*, *P. nephridjatam*, *P. chilodonides*, *P. glaucum*, *P. putrjnum*, *P. chlorelligerum*, *P. pyriforme* et *P. pseudoputrinum*.

**Wichterman (1953)** a fait une étude critique détaillée des 16 espèces, mais 2 espèces enregistrées avant par **Kahl (1935)** (*P. glaucum* et *P. pyriforme*) non pas été étudiées pendant que 2 autres espèces (*P. duboscquj* et *P. ficarium*) ont été mentionnées.

## 2-2- Etat morphologique

### 2-2-1- Le cortex

Le cortex de la paramécie est composée d'unités corticales répétées longitudinalement le long de la surface plusieurs milliers de fois. La rangée longitudinale des unités est appelé cinétie. Le terme cinétosomes est utilisé généralement à la place du "corps basal" ou "granules basaux". Une seule unité corticale consiste à un cil (attaché à un cinétosome) ; à un système de fibres, notamment les fibres cinétodesmales et enfin un sac parasomal (**Beale and Preer, 2008**). (figure04).



**Figure 04 : Représentation simplifiée du cortex de la paramécie (Beale and Preer, 2008). Chaque colonne constitue une cinétie qui s'étend sur le long du corps de la cellule. (Ici il y a des colonnes à trois unités).**

### 2-2-2- Les noyaux

Comme la plupart des ciliés, la paramécie présente la particularité d'avoir un appareil nucléaire en deux parties : un (ou plusieurs) petit noyau, le micronucleus, et un gros noyau, le macronucleus. Le premier assure les fonctions sexuelles indispensables pour engendrer des variations génétiques alors que le second dirige les fonctions trophiques.

Donc la paramécie (figure 05) possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires :

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

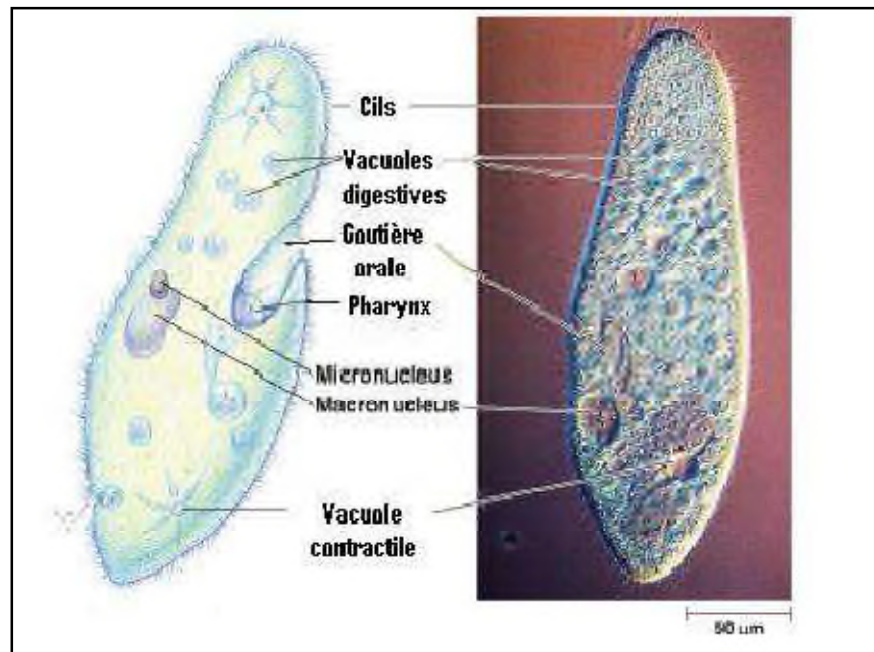


Figure 05: Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

## 2-3- Les principaux caractères biologiques de la paramécie

### 2-3-1- biologie

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

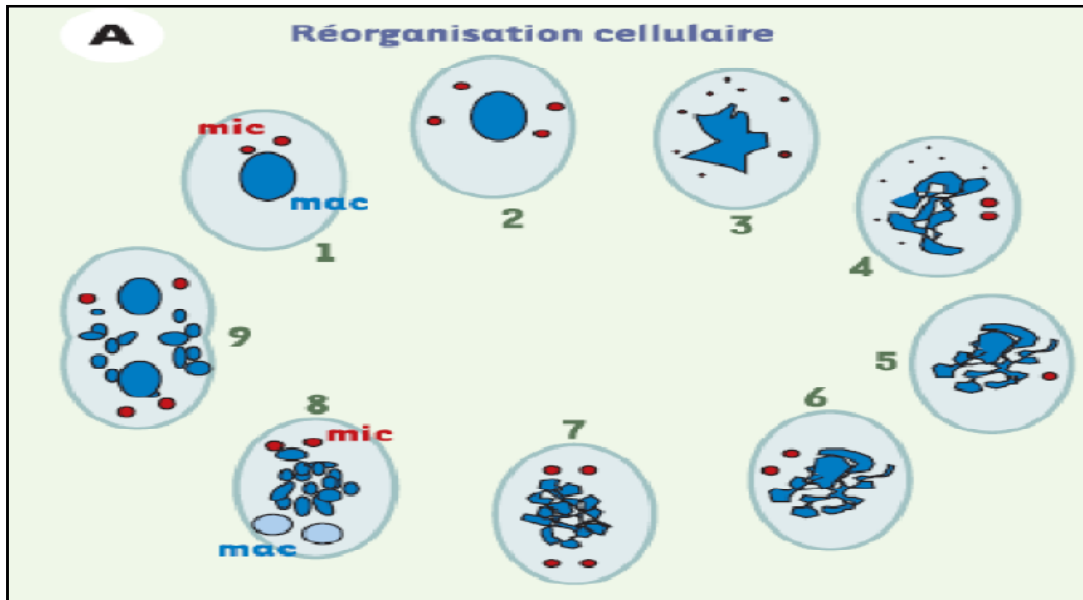
Pour survivre, la paramécie effectue des échanges de matière par diffusion avec le milieu extérieur. La digestion se fait dans la cellule, grâce à un système de vacuoles spécialisées (Benbouzid Hadad 2012).

### 2-3-2- Reproduction

Les paramécies se reproduisent (figure 06) par :

- **Division cellulaire** : les micronucleus se divisent par mitose, le macronucleus se divisent simplement en deux micronucleus fils.

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



**Figure 06 : cycle sexuelle et réorganisation macronucléaire : Événement cellulaire**  
(Meyre *et al.*, 2005).

### 2-3-3- Alimentation

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

### 2-3-4- Respiration

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un

rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (**Wehner et Gehring, 1995**).

### **2-3-5- Mouvement**

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

### **2-4- Justification du choix de *Paramecium sp.* Comme modèle biologique**

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

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

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



*Chapitre III*  
*Stress oxydatif*

## 1- Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes et de radicaux libres

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (**Finaud et al., 2006b, Mac Laren 2007**). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple :  $\cdot\text{OH}$ ) (**Mac Laren 2007, Sayre et al., 2005, Goto et al., 2008**).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

1. Addition d'un électron libre à un non radical ( $\text{NR} + e \rightarrow \text{R}\cdot$ ).
2. Perte d'un électron par un non radical ( $\text{NR} - e \rightarrow \text{R}\cdot$ ).
3. Scission homolytique d'une liaison covalente ( $\text{A} : \text{B} \rightarrow \text{A}\cdot + \text{B}\cdot$ ).

La réactivité des RL dépendra des éléments en présence : si un radical rencontre un autre radical, le produit sera un non radical ( $\text{A}\cdot + \text{B}\cdot \rightarrow \text{AB}$ ). Si un radical rencontre un non radical, un nouveau radical sera formé ( $\text{A}\cdot + \text{B} \rightarrow \text{A} + \text{B}\cdot$ ) et donnera l'origine à une chaîne qui continuera jusqu'à ce que le radical rencontre un autre radical ou un antioxydant (**Wolinsky 1998, Clarkson et al., 2000**).

Plus récemment les espèces azotées actives (EAA ou RNS Reactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO). Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires ou non radicalaires (**Mac Laren 2007**), que nous désignons par l'abréviation ERO.

Les principales espèces réactives oxydantes sont dérivées de l'oxygène et de l'azote, et peuvent être produites par le métabolisme cellulaire normal tout comme pathologique ou par exposition environnementale (ex : tabagisme, ozone, alimentation, température corporelle...) (**Altan et al., 2003, Vergani et al., 2004, Kirschvink et al., 2008, Bloomer et al., 2008**).

## **2- Définition du 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 élimination (Sayre *et al.*, 2005, Bloomer *et al.*, 2008, Browne *et al.*, 2008, Power *et al.*, 2010).

Ce 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). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren 2007).

Des concentrations tissulaires normales d'antioxydants suppriment les processus oxydatifs et protègent les tissus. Par contre, lorsque cette première ligne de défense antioxydante n'est plus suffisante, des mécanismes secondaires sont recrutés pour réparer les dommages subits et préparer les tissus contre les futures attaques oxydantes. Ces mécanismes inclut les gènes et les protéines induits par le stress tels que les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*) et les enzymes de réparations oxydantes comme les glycosylases d'ADN qui sont activées une fois les dommages subits (Stubbs *et al.*, 2004) (figure07).

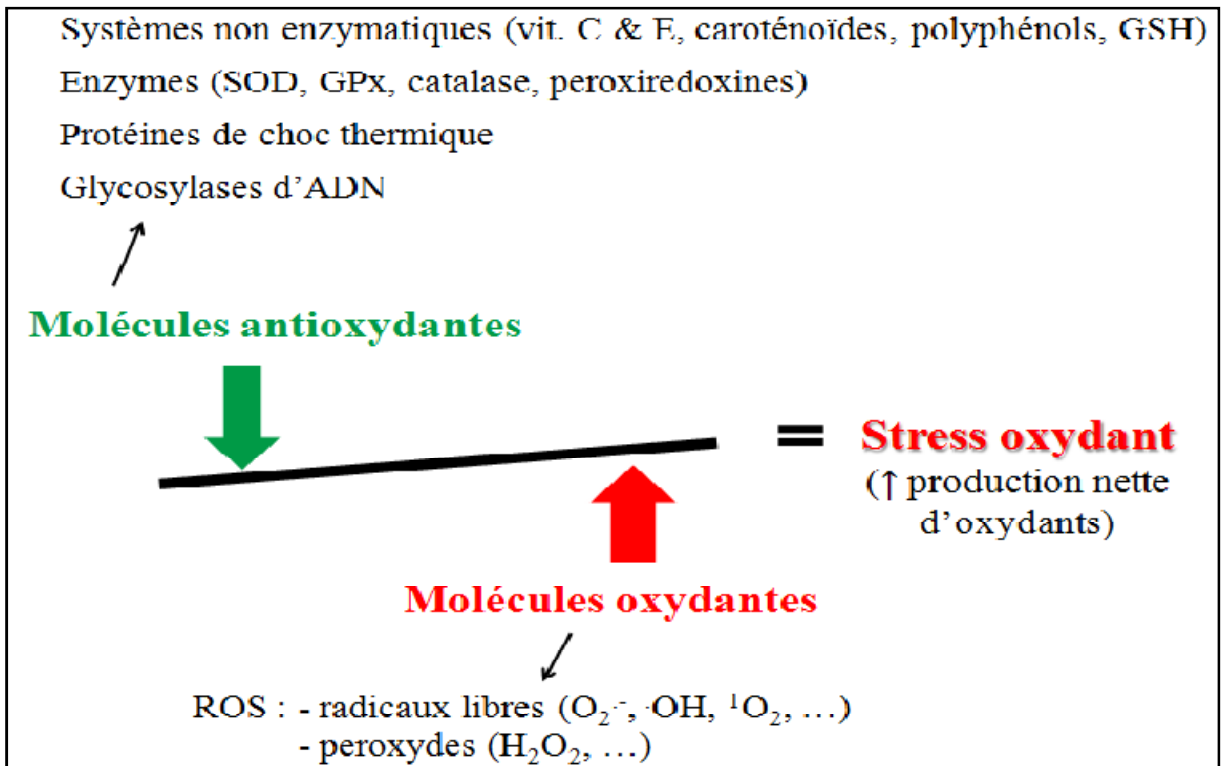


Figure 07: Composantes de la balance entre les molécules anti- et pro-oxydantes.

GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $O_2^{\cdot-}$  : superoxyde anion,  $\cdot OH$  : radical hydroxyl,  $^1O_2$  : oxygène singlet, SOD : superoxide dismutases.

### 3- Méthodes de mesure / d'évaluation du stress oxydant

De par leur courte durée de vie et leur haute réactivité, les ROS sont difficilement mesurables. Des méthodes directes existent mesurant les réactions impliquées en temps réel mais elles sont difficiles et onéreuses (Les tecLarsson, C.A., *et al.*, 2011) hniques indirectes sont plus souvent utilisées et mesurent des biomarqueurs ou des produits finaux des processus médiés par les ROS, donnant ainsi une estimation de l'importance du stress oxydant. Ces biomarqueurs incluent les enzymes superoxyde dismutases, catalase, glutathion réductase, glutathion peroxydase, les concentrations de glutathion et des vitamines antioxydantes, la peroxydation des lipides, et la concentration en nitrite et de protéines glycosylées de manière non enzymatique. La mesure de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines sont les indicateurs les plus courants du dommage oxydatif.

Les ROS sont cytotoxiques et peuvent causer des dommages à la membrane cellulaire, à la liaison des récepteurs à la membrane cellulaire, des dysfonctions enzymatiques, et peuvent altérer des cascades de signalisation (ex. insuline, etc.) et activer des processus tels que l'inflammation.

#### 4- Principales ERO et mécanismes de leur production

Dans les mitochondries qui produisent en particulier des radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ) et des  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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 (Wolinsky 1998, Kehrer 2000). 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  $\text{O}_2^-$  (Clarkson *et al.*, 2000, Finaud *et al.*, 2006b, Mac Laren 2007).

##### 4-1- Le radical superoxyde ( $\text{O}_2^-$ )

Il est principalement formé lors de la chaîne de transport des électrons, au niveau des complexes I et III de la membrane interne des mitochondries, sous l'influence du coenzyme Q10 réduit, de l'enzyme NADH-déshydrogénase et en présence d'oxygène (Sayre *et al.*, 2008).

Le radical superoxyde est également formé sous l'influence de métalloenzymes endommagées ou altérées par mutation génétique, et peut être produit par des NADPH oxydases au niveau des membranes des cellules du système immunitaire où il contribue à l'action bactéricide

##### 4-2- Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Au niveau de la mitochondrie, sous l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD), le radical superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) est réduit en peroxyde d'hydrogène. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  bien que n'étant pas un radical libre joue un rôle important dans le stress oxydant.

Il est non ionisé et de faible charge ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes mitochondriales et cellulaires, ceci en fait un vecteur important de diffusion du

radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), dont il est précurseur par réaction de Fenton/Haber-Weiss (Clarkson *et al.*, 2000, van Helden *et al.*, 2009).

Son rôle facilitateur en fait un des agents les plus actifs des dommages causés par oxydation aux macromolécules (Niess *et al.*, 1996, Spiteller *et al.*, 2006, Duarte *et al.*, 2007, Hempel *et al.*, 2009).

#### **4-3- Le radical Hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ )**

Le radical hydroxyle est extrêmement puissant et réagit indifféremment avec toutes les macromolécules, auxquelles il a un accès facilité par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Duarte *et al.*, 2007). Il est produit à partir du  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou de l'oxyde nitrique, la réaction de Fenton/Haber-Weiss et les myéloperoxydases des cellules du système immunitaire en sont les sources principales. Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs du système biologique, toutefois, sa courte  $\frac{1}{2}$  vie d'approximativement  $10^{-9}$  secondes en réduit considérablement la potentialité (Clarkson *et al.*, 2000, Finaud *et al.*, 2006b, Vasconcelos *et al.*, 2007, Goto *et al.*, 2008).

#### **4-4- Le Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique ( $\cdot\text{NO}$ ou NO)**

La grande production et distribution de l'oxyde nitrique, combinées à sa facile réaction avec les ERO, lui assurent un rôle central dans la régulation du stress oxydant (Alvarez *et al.*, 2003, Hellsten *et al.*, 2007).

Sa rapide réaction avec le radical superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) produit le très réactif peroxyde d'azote ( $\text{ONOO}^-$ ) qui est capable d'oxyder les macromolécules particulièrement lors d'états pathologiques (Tsai *et al.*, 2001, Marnett *et al.*, 2003, Lamprecht *et al.*, 2004, Goto *et al.*, 2008).

#### **4-5- Autres ERO**

Le singulet oxygène est une molécule d'oxygène excitée par l'ajout d'un électron sous l'effet de la lumière, l'ozone est formé par réaction photochimique entre un hydrocarbure et le NO, ils ont été démontrés capables de causer des dommages oxydatifs (Goto *et al.*, 2008).

## 5- Système antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002 ; Mates *et al.*, 1999 ; Packer *et al.*, 1997 ; Powers & Lennon, 1999).

La plupart des antioxydants peuvent être divisés en 2 groupes, hydrophobes ou hydrophiles. Les hydrophobes constitués par les vitamines A, E, les flavonoïdes, l'ubiquinol (Coenzyme Q10), la bilirubine, la mélatonine. Les hydrophiles comme les glutathions, l'acide urique, la vitamine C, les thiols, les protéoglycans, l'acide hyaluronique qui protège contre l'oxydation des lipides, des protéines, des sucres, et de l'ADN dans les milieux liquides (Halliwell 1991, Wolinsky 1998, Koolman *et al.*, 1999, Benitez *et al.*, 2002, Vergani *et al.*, 2004, Kirschvink *et al.*, 2008, Browne *et al.*, 2008).

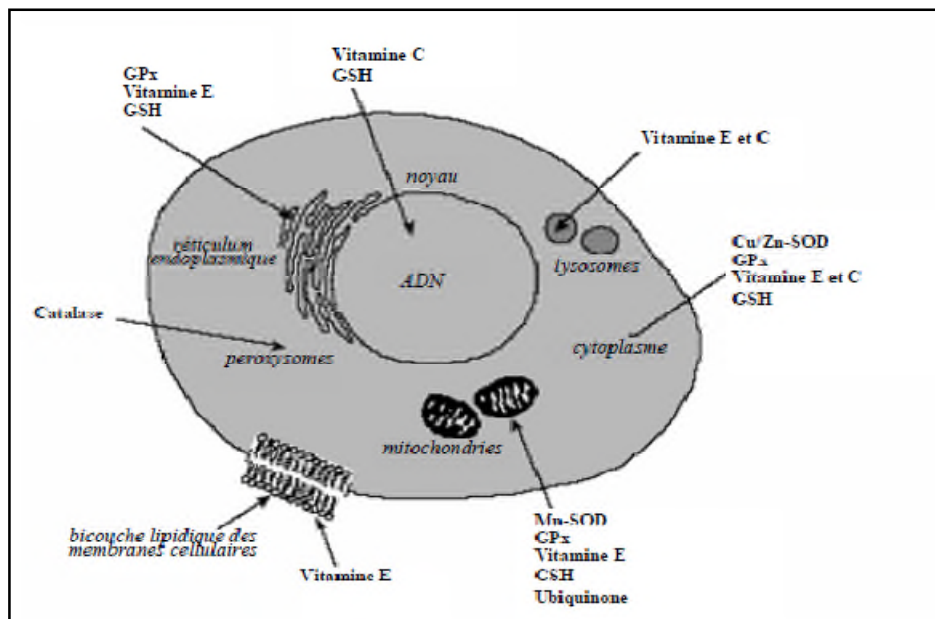


Figure 08: Répartition des principales défenses anti oxydantes dans la cellule.

(Mn-SOD) :superoxyde dismutase ,(Cu/Zn-SOD) :superoxyde dismutase cytosolique,(GPx) : Glutathion peroxydase,(GSH) :glutathion réduit.

## 5-1- Les antioxydants endogènes

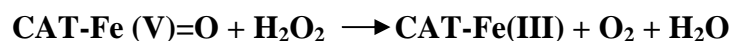
### 5-1-1- Les antioxydants endogènes enzymatiques

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

L'activité des enzymes antioxydants dépend de cofacteurs minéraux, qui sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe), et sont qualifiés d'antioxydants non enzymatiques indirects (Elosua *et al.*, 2003, Morris *et al.*, 2003, Lyn Patrick 2006, Bleys *et al.*, 2006).

#### Exemple : L'activité catalase

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



### 5-1-2- Antioxydant endogène non enzymatique

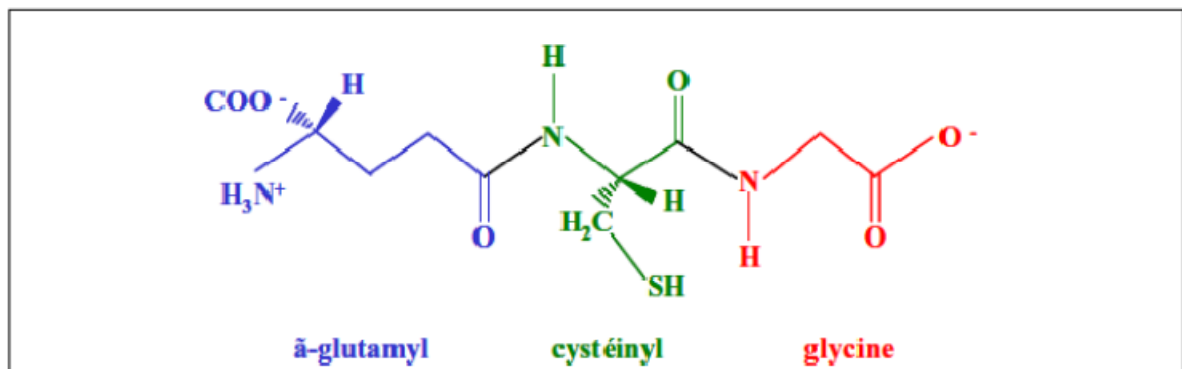
Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la Mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

**Exemple 1: Le glutathion réduit (GSH)**

Le GSH est formé à base d'un tripeptide (Glu-Cys-Gly ou acide glutamique cystéineglycocolé). Sous l'action de la Gpx il désintoxique les ERO ( $H_2O_2$ , peroxy-nitrites, peroxydes lipidiques, ...) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Hellsten *et al.*, 2007, Pittaluga *et al.*, 2006, Douris *et al.*, 2009).

Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. Il peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic,...) (Meister 1994, Hargreaves *et al.*, 2002b).

Sous sa forme GSH, GSSG et de son ratio GSH/GSSG, le glutathion est utilisé comme marqueur du système antioxydant et du stress oxydant, analysé par spectrophotométrie (Margaritis *et al.*, 2003, Wilber *et al.*, 2004, Vergani *et al.*, 2004, De Moffarts *et al.*, 2007).



**Figure 09 : Glutathion réduit ou à-glutamyl-cystéinyl-glycine( d'après Armstrong,1991).**

**Exemple 2 : L'acide urique**

L'acide urique comme produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses, ou lors d'une exposition à l'hypoxie (altitude, apnée, ischémie-reperfusion) (Baillie *et al.*, 2007). Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma in vivo, où il pourrait contribuer à 35-60% de la capacité antioxydant totale (Johnson *et al.*, 2009). L'acide urique peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne qui augmente également dans les muscles en cas d'effort (Hellsten *et al.*, 2001), puis est régénéré par la vitamine C (Vasconcelos *et al.*, 2007).

## 5-2- Antioxydants exogènes ou nutritionnels ou nom enzymatique

### 5-2-1- Vitamines

#### 5-2-1-1- Vitamine E

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

#### 5-2-1-2- Vitamine A

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

La vitamine A agit sur les ERO en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (Bleys *et al.*, 2006, Fisher-Wellman *et al.*, 2009).

#### 5-2-1-3- Vitamine C

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

## 6- Dégâts cellulaires

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides (Hulbertl, 2005 ; Pamplona *et al.*, 2000), une oxydation des protéines (Levine, 2002 ; Peng *et al.*, 2000), des mutations de l'ADN (Richter *et al.*, 1988). Ces altérations peuvent conduire

à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) (Figure 10).

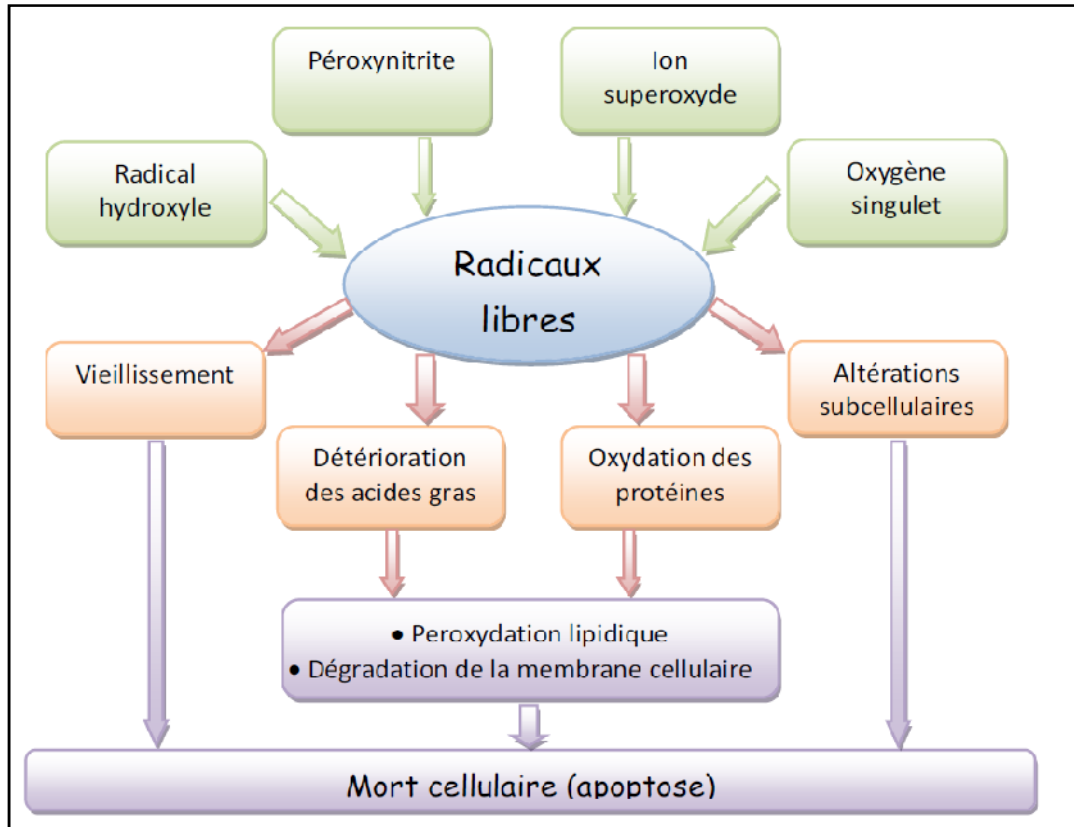


Figure 10 : Dégâts de stress oxydatif.



*Partie II*  
*Etude expérimentale*



# *Matériels et Méthodes*

## 1- Matériels

### 1-1- Matériels biologique

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

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

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

Règne : *Protista*

Embranchement : *Ciliophora*

Classe : *Oligohymenophora*

Ordre : *Peniculida*

Famille : *Parameciidae*

Genre : *Paramecium*

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

Phylum : *Protozoa*

Subphylum : *Ciliophora*

Classe : *Ciliate*

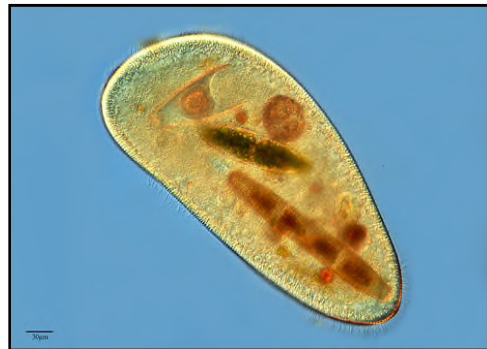
Sous-classe : *Holotrichia*

Ordre : *Hymenostomatida*

Sous-ordre : *Peniculina*

Famille : *Parameciidae*

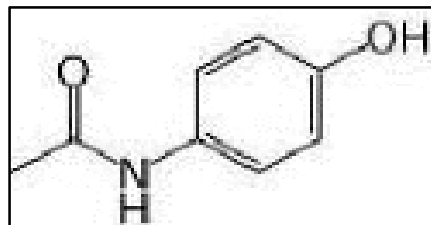
*Paramecium caudatum*, espèce la plus courante et la mieux connue, de plus elle est largement utilisée comme matériel de recherche (Beaumont et Cassier, 1998).



**Figure 11 : Structure d'une paramécie.**

### 1-2- Matériels chimique

L' xénobiotique utilisés dans notre étude correspond à une molécule chimique de Type : N-(4-hydroxyphényl)-acétamide. Le paracétamol, de formule brute  $C_8H_9NO_2$ , est la dénomination commune internationale (DCI) de la substance active de plusieurs spécialités pharmaceutiques de la classe des antalgiques-antipyrétiques dont la structure moléculaire est la suivante (Figure12).



**Figure 12 : Formule chimique du paracétamol (Lechat, 1978).**

Les caractéristiques physicochimiques du Paracétamol sont regroupées dans le tableau (02).

**Tableau 02 : Caractéristiques Physicochimiques du Paracétamol (Mac Kellar, 1991).**

Formule brute	Masse molaire	PKa	Solubilité	DL50
$C_8H_9NO_2$	151,1626 g/mol	9.5	Soluble dans l'acétone, l'éthanol, le méthanol. Beaucoup plus soluble dans l'eau chaude	2 400 mg/kg Rat oral. 800 mg/kg Souris 825 mg/kg (Chien)

Cette molécule chimique de synthèse a été testées aux concentrations de: 0.4, 0.6, 0.8, 1.2et 1.4mg. Ces concentrations ont été retenues après plusieurs tests toxicologiques.

## 2- Méthodes

### 2-1- Physiologie

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

#### ❖ Objectif du travail

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets du Paracétamol sur un modèle cellulaire alternatif *Paramecium sp*, d'abord en raison de la forte similitude entre le métabolisme des paramécies et les cellules de mammifères ensuite du fait que ces cellules peuvent rendre compte d'éventuelles alterations du milieu aussi minimes soient-elle.

#### 2-1-1- Préparation de culture de paramécies

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

**a- Une culture mixte****➤ Identification de *paramecium sp***

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

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

L'observation microscopique (figure 13) nous a permis de :

- La présence de deux micronucleus.
- Une forme générale fine et allongée.

Ces observation : La taille, la forme générale, ainsi que le nombre de micronucleus, nous permettent de conclure qu'il s'agit bien de *Paramecium sp*.



**Figure 13 : *Paramecium sp* observée sous microscope optique (x40).**

**b- Une culture pure**

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

Nous avons préparé le milieu de culture selon la méthode de **Beisson et al .,(2010)**. En utilisant l'autoclave (Figure 14).

## **2-1-2- Protocoles expérimentaux mis en place**

### **2-1-2-1- Cinétique de croissance cellulaire**

Pour suivre pendant plusieurs jours la descendance d'une paramécie et réaliser sa courbe de croissance nous sommes suivies la technique décrite par **Beisson *et al.*, (2010)**.

Il s'agit d'une méthode de comptages manuelle des cellules vivantes présentes dans chaque échantillon en fonction du temps.

Les cellules sont repiquées pour maintenir une bonne culture, la culture de *Paramecie sp* est placée dans des tubes à essai à une température de 28°C (dans l'étuve, figure 15). Chaque tube contient 10 ml du milieu de culture, auxquels on ajoute 10ml paramécies.

L'opération est effectuée sous microscope optique sur une lame striée au grossissement x 10, selon le protocole suivant :

T<sub>0h</sub> → Observation microscopique + comptage de cellules

T<sub>24h</sub> → Observation microscopique + comptage de cellules

T<sub>48h</sub> → Observation microscopique + comptage de cellules

T<sub>72h</sub> → Observation microscopique + comptage de cellules

T<sub>96h</sub> → Observation microscopique + comptage de cellules

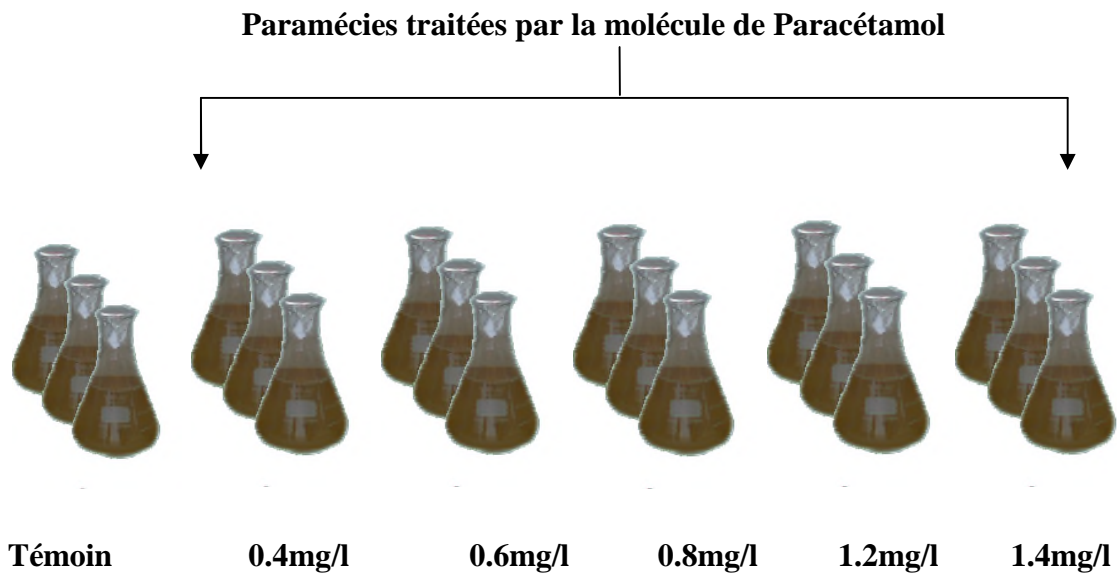
### **2-1-2-2- Traitement par le Paracétamol**

On utilise quatre concentrations croissantes de Paracétamol (0.4, 0.6, 0.8, 1.2 et 1.4) mg mesuré par la balance de précision (figure 16), les concentrations retenues pour le traitement sont le résultat de plusieurs tests, le suivi de la croissance par le dénombrement quotidien des paramécies se poursuit jusqu'au troisième jour (72h), (observation microscopique).

Nous avons réalisé des tests sur des aliquotes de 20ml de culture de paramécie sachant que chaque test est répété trois fois. Les cultures sont disposées dans des erlen

meyer stériles et bouchés, à une température de 28°C. La densité cellulaire est de 87 cellules/ $\mu$ l correspondant à la phase exponentielle de la courbe de croissance de *Paramecium sp* atteinte au bout de 3 jours.

#### ❖ Protocole expérimental



#### 2-1-2-3- Pourcentage de réponse

Le pourcentage de réponse est paramètre pour suivre les effets de différentes concentrations de Paracétamol sur les cellules de *paramécies sp*, sachant que les valeurs positives de pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (**Wong et al., 1999**).

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

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

Où :

$N_C$  : Nombre des cellules témoins.

$N_E$  : Nombre final des cellules traitées.

#### 2-1-2-4- Taux de mortalité

Le suivi du taux de mortalité est effectué par dénombrement quotidien des paramécies jusqu'au troisième jour (72h). Ce taux est calculé selon la méthode d'**Abbot**. (1925) selon la formule suivante :

$$\frac{x - y}{y} \times 100$$

X = Nombres de cellules vivantes témoins.

y = Nombre de cellules vivantes traitées.

#### 2-2- Dosage des paramètres biochimiques ou dosage des métabolites

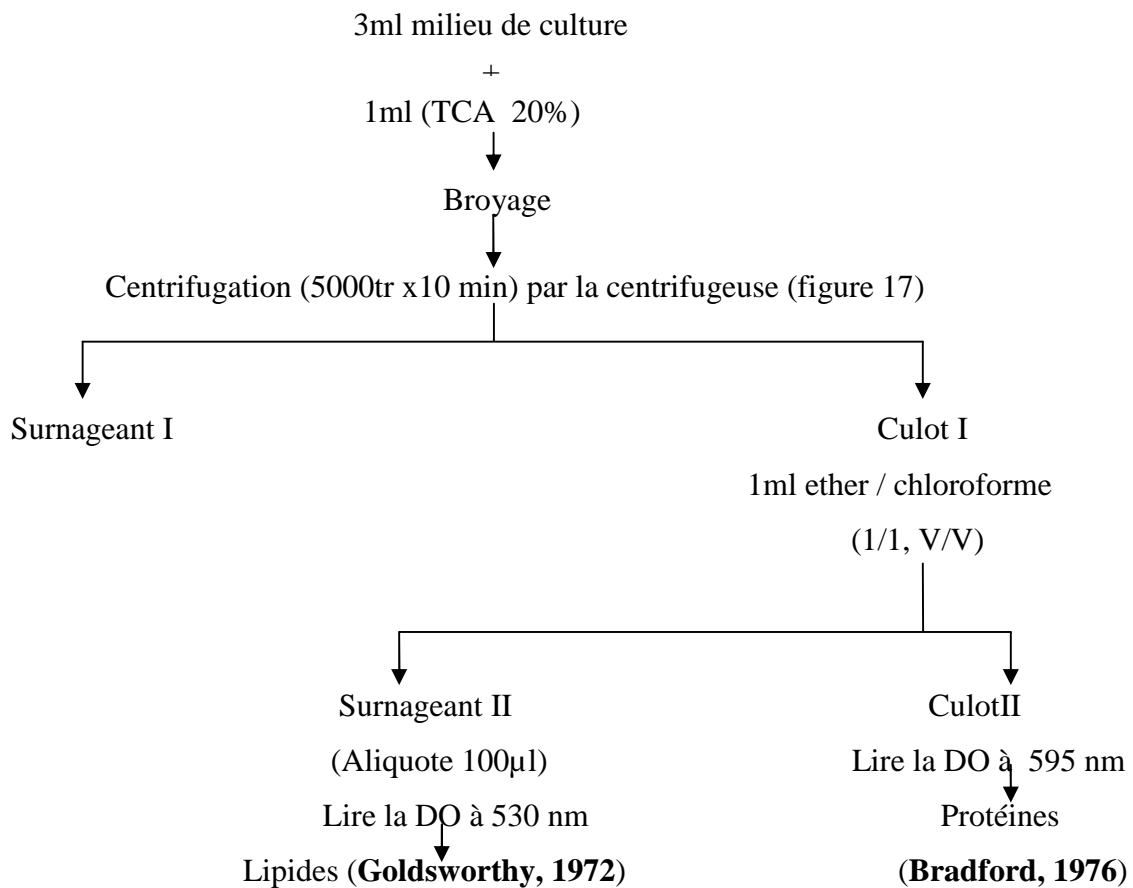
La réalisation des différents dosages (protéines, lipides et glucides) nécessite le prélèvement d'un nombre relativement identique de cellules de paramécies. Ce pendant, Le traitement se fait au quatrième jour de la culture (fin de la phase exponentielle) pour éviter toute influence sur la croissance. Le début du dosage, pour chaque paramètre, a lieu trois heures après le traitement par le paracétamol.

##### ❖ Objectif du travail

Nous nous sommes intéressés à étudier les principaux métabolites cellulaires (protéines, lipides et glucides) afin de mieux comprendre l'effet du paracétamol sur les paramécies.

#### 2-2-1- Dosage des protéines et des lipides

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



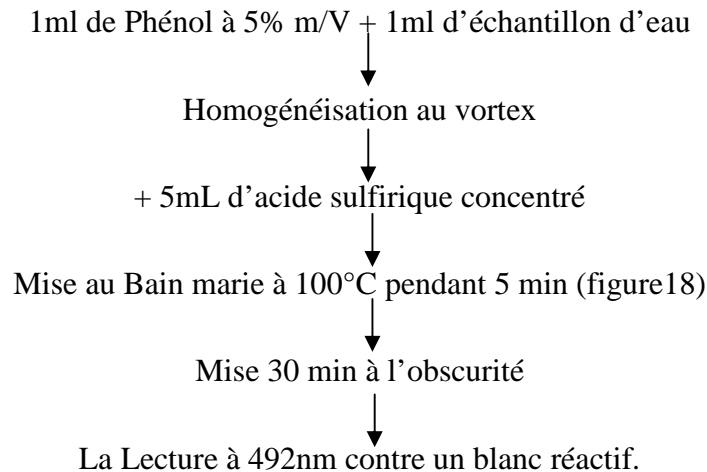
### 2-2-2- Dosage des glucides

La concentration en carbohydrates dans les aliquote de cultures est déterminée selon la méthode de Dubois qui utilise le phénol et l'acide sulfurique concentré (**Perrine Pasquier, 2011**).

Lorsque les sucres sont mis en contact avec du phénol et de l'acide sulfurique concentré, une couleur jaune orange apparait. Cette coloration est stable et fonction de la concentration en carbohydrates (**Perrine Pasquier, 2011**).

Nous avons préparés une solution mère de glucose de 100 mg/l. A partir de laquelle des solutions filles de concentration connue : 80 mg/l, 60 mg/l, 40mg/l ,20 mg /l ,10 mg/l sont préparés.

Le protocole opératoire de dosage des glucides est le suivant :



**Protocole de dosage des glucides (Anthony, 2004).**

### 2-3- Dosage des biomarqueurs de stress oxydative

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

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

#### ❖ Objectif du travail

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

Pour cela, nous nous somme intéressés aux :

- Le glutathion qui est le composé réducteur soufré le plus abondant dans le compartiment intracellulaire (Pompella et al., 2003).

- La catalase qui est une enzyme présente chez tous les organismes aérobies.

### 2-3-1- Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckberker& Cory (1988)**, dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesure a une longueur d'onde de 412 nm.

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

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

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

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

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

*0,8* : Le volume de l'homogénat.

*0,5* : Le volume du surnageant.

*Mg* : quantité de protéine.

## 2-3-2- L'activité catalase

### 2-3-2-1- Principe de dosage

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

### 2-3-2-2- Protocole expérimental

La mesure de l'activité catalase (CAT) est réalisée suivant la méthode de la décroissance de l'absorbance enregistrée pendant trois minutes (Spectrophotomètre, figure 19) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire  $\varepsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ .

Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 $\mu\text{l}$  de l'extrait enzymatique brut, 50 $\mu\text{l}$  de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,3% et 2850 $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

L'activité catalase est calculée par la formule suivante :

$$X \text{ (}\mu\text{mol /mn /mg prot)} = \frac{(\Delta \text{DO} \times 10)}{\varepsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéine}}$$

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

**X** :  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommées par minute et par mg de protéines

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



**Figure 14 : L'autoclave.**



**Figure 15 : Etuve.**



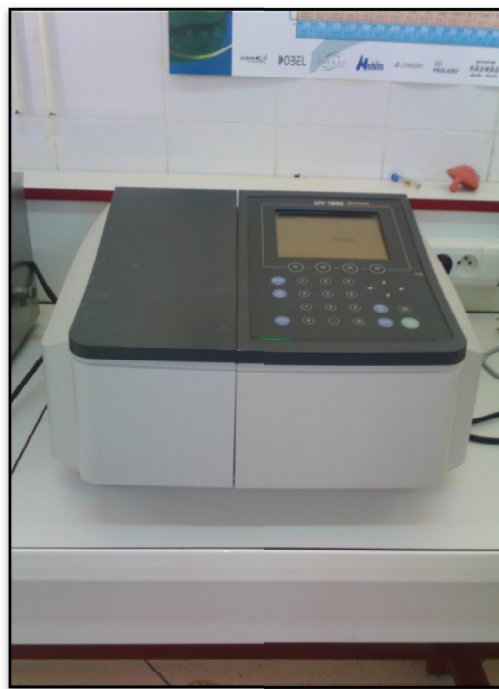
**Figure 16 : Balance de précision.**



**Figure 17 : Centrifugeuse.**



**Figure 18 : Bain marin.**



**Figure 19 : Spectrophotomètre.**



**Figure 20 : pH-mètre.**



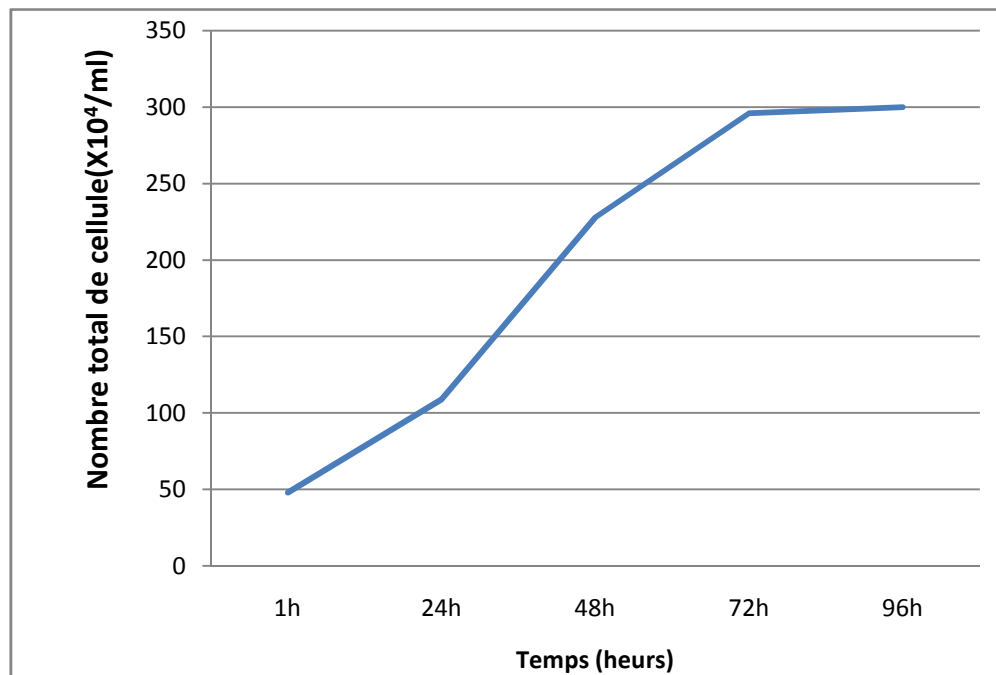
# *Résultats et discussion*

## 1- Résultats

### 1-1- Physiologie

#### 1-1-1- Courbe de croissance

La courbe de croissance obtenue nous permet d'avoir des données quantitatives, La figure (21) représente l'évolution du nombre de cellules, en fonction du temps, traduisant ainsi les variations de la croissance cellulaire.

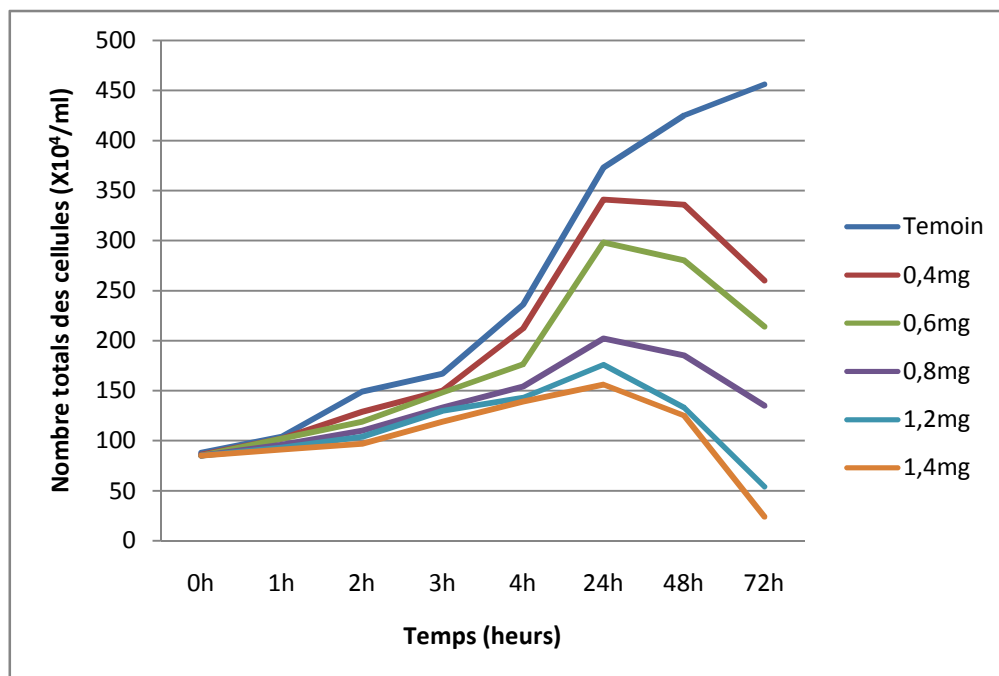


**Figure 21: Cinétique de la croissance des paramécies en fonction du temps.**

Nous constatons une croissance normale des paramécies dont le nombre est de  $50 \times 10^4$  cellules à  $T_0$  correspond à phase de latence, puis une phase très rapide qui dure presque 2 jours, caractérisée par une augmentation exponentielle du nombre de cellules pour atteindre à la fin de cette phase un nombre de  $299 \times 10^4$  cellules, cette phase est suivie par une troisième phase stationnaire dont le nombre de paramécie atteint  $300 \times 10^4$  cellules où le nombre de cellules demeure constant.

### 1-1-2- Effet du Paracétamol sur la cinétique de croissance

La figure (22) illustre l'évolution du nombre de paramécies en fonction du temps en présence de concentrations croissantes du xénobiotique.



**Figure 22 : Cinétique de la croissance des paramécies traitées au Paracétamol.**

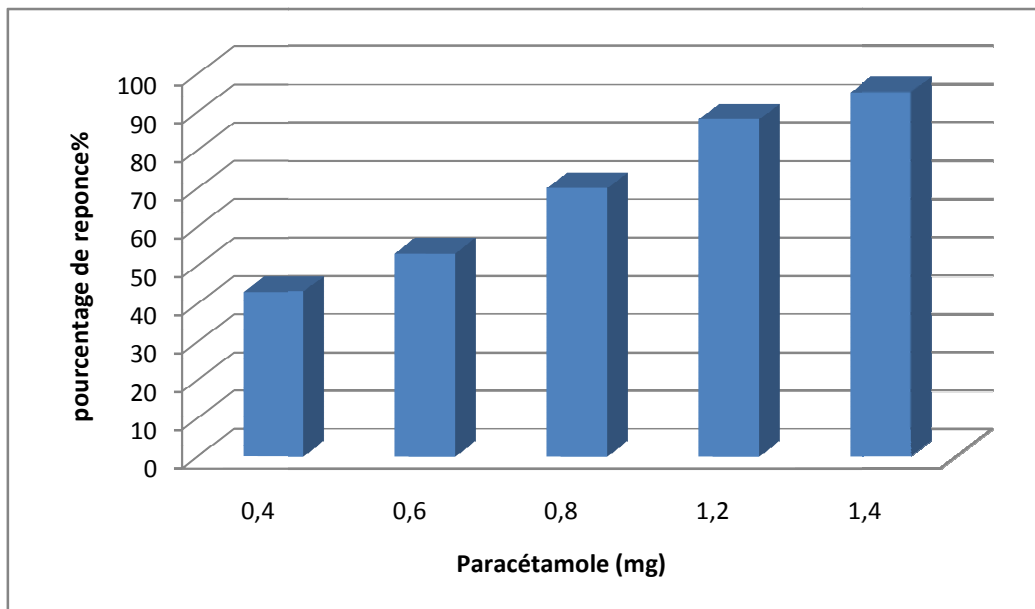
On observe que dès la mise en contact du xénobiotique avec les cellules et jusqu' à 1h de traitement le nombre de cellules témoins et traitées évoluent de manière similaire.

Entre 1h à 24h de traitement au Paracétamol, nous constatons une différence dans l'évolution de la courbe de croissance, une diminution de croissance est remarquable en fonction du temps surtout pour les forte concentrations (0.8, 1.2 et 1.4mg).

Au delà 24h de traitement, cette diminution est bien confirmé, pour le nombre de cellules traité par les plus forte concentrations (0.8, 1.2 et 1.4mg), après 48h de traitement la croissance subit une inhibition totale. Alors que pour les faibles concentrations la diminution de nombre des cellules n'est observée qu'après 48h.

### 1-1-3- Effet du Paracétamol sur le pourcentage de réponse (PR)

La figure(23) montre que l'évolution de pourcentage de réponse chez les paramécies est dose-dépendant.



**Figure 23: Pourcentage de réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol.**

Nous remarquons que le pourcentage de réponse est positif pour toutes les concentrations de Paracétamol testées, ce pourcentage est respectivement **40%, 50%, 67%, 85%, 91%** pour les concentrations croissantes de Paracétamol, ces valeurs positives confirment l'inhibition de croissance chez les paramécies traités.

### 1-1-4- Evaluation du taux de mortalité

Le tableau (03) montre l'évolution de taux de mortalité des paramécies en présence de concentrations croissantes de Paracétamol.

**Tableau 03 : Evolution de taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps.**

Paracétamol (mg) \ Temps (heurs)	0.4	0.6	0.8	1.2	1.4
1	1.92%	1.92%	7.69%	10.57%	12.5%
4	10.16%	25.42%	34.74%	39.40%	41.10%
24	8.57%	20.10%	45.04%	35.53%	58.17%
48	20.94%	34.11%	56.47%	68.70%	70.58%
72	42.98%	53.07%	69.73%	88.15%	94.73%

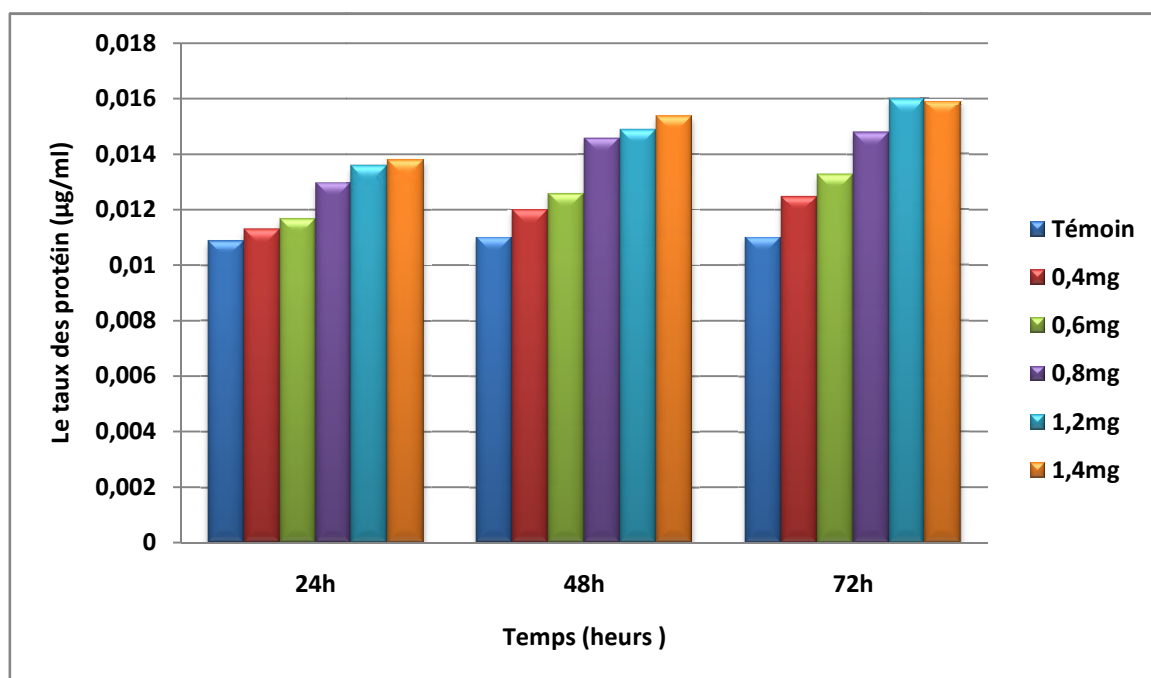
Nous remarquons qu'après 1h de traitement, le taux de mortalité des paramécies est très faible et atteint 1.92% pour les traitées avec la concentration de 0.4mg alors que il augmente pour atteindre 12.5% pour les traité avec la plus forte concentration de 1.4mg.

Après 72h de traitement le taux de mortalité est hautement augmenté, il est proche de 94.73 % pour les paramécies traitées avec la plus forte concentration (1.4mg).cette augmentation est toujours dose- dépendant.

## 1-2- Dosage des métabolites

### 1-2-1- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux de protéines

Afin de suivre les différentes activités enzymatiques impliquées dans la métabolisation et/ou la détoxification du xénobiotique, nous avons procédé en premier lieu à l'évaluation du taux de protéines totale. La figure (24) représente l'évolution du taux de protéines en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Paracétamol.

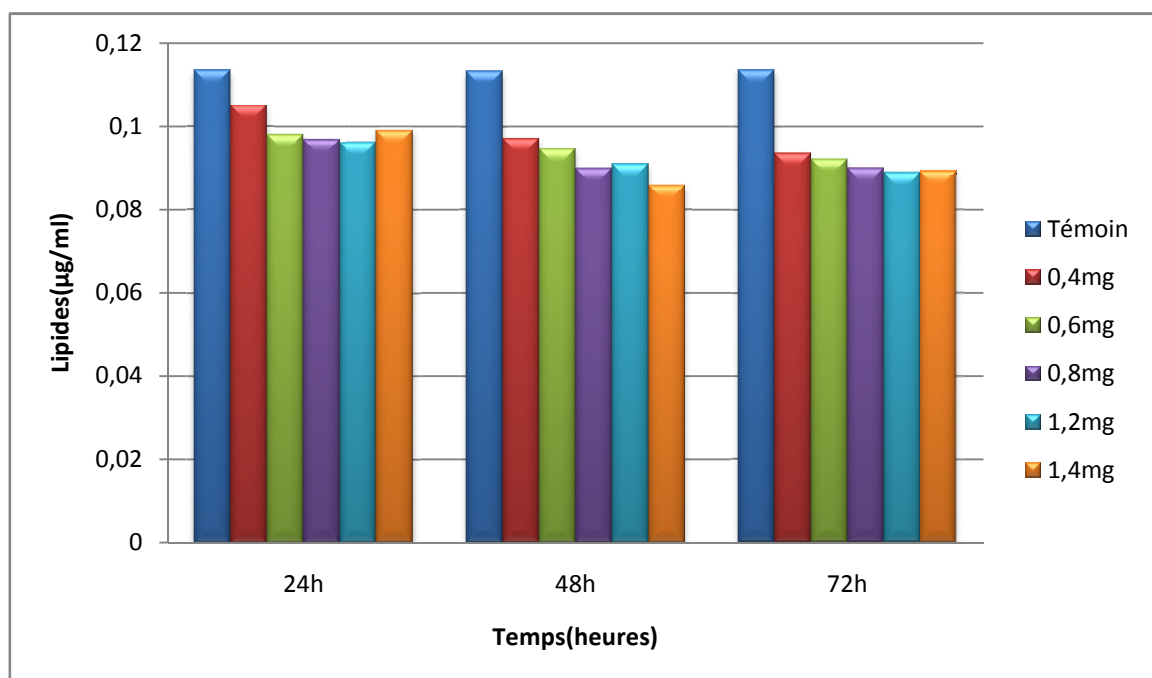


**Figure 24 : Effet du Paracétamol sur le taux des protéines en fonction du temps.**

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

#### **1-2-2- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux des lipides**

La figure (25) illustre les variations de taux de lipides en fonction du temps en présence de concentrations croissantes de Paracétamol.

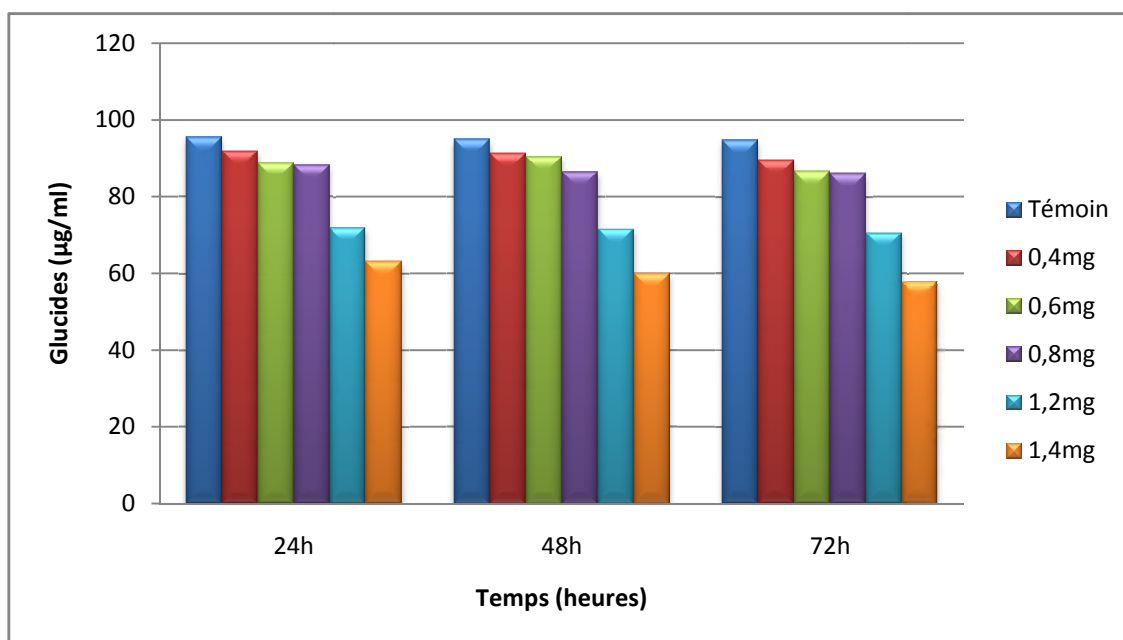


**Figure 25 : Effet du Paracétamol sur le taux des lipides en fonction du temps.**

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

### **1-2-3- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux des glucides**

La figure (26) représente les variations du taux de glucides observées chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol.



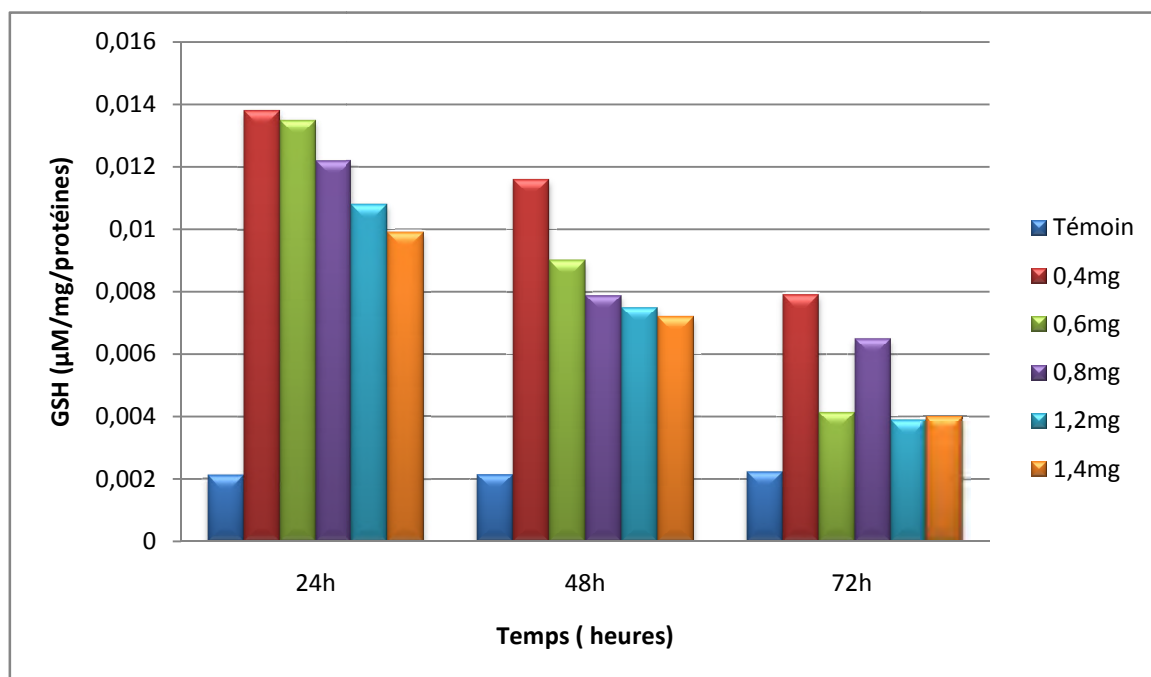
**Figure 26 : Effet du Paracétamol sur le taux des glucides en fonction du temps.**

Nous avons enregistré une déplétion des glucides très remarquable surtout pour les fortes concentrations de xénobiotique qui diminue de manière très importante surtout pour la dose 1.4mg qui atteint 59mg/ml.

### **1-3- Dosage des biomarqueurs de stress oxydatif**

#### **1-3-1- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux de GSH**

La figure (27) montre l'évolution du taux de GSH en fonction du temps en présence des concentrations croissantes de Paracétamol chez les paramécies.



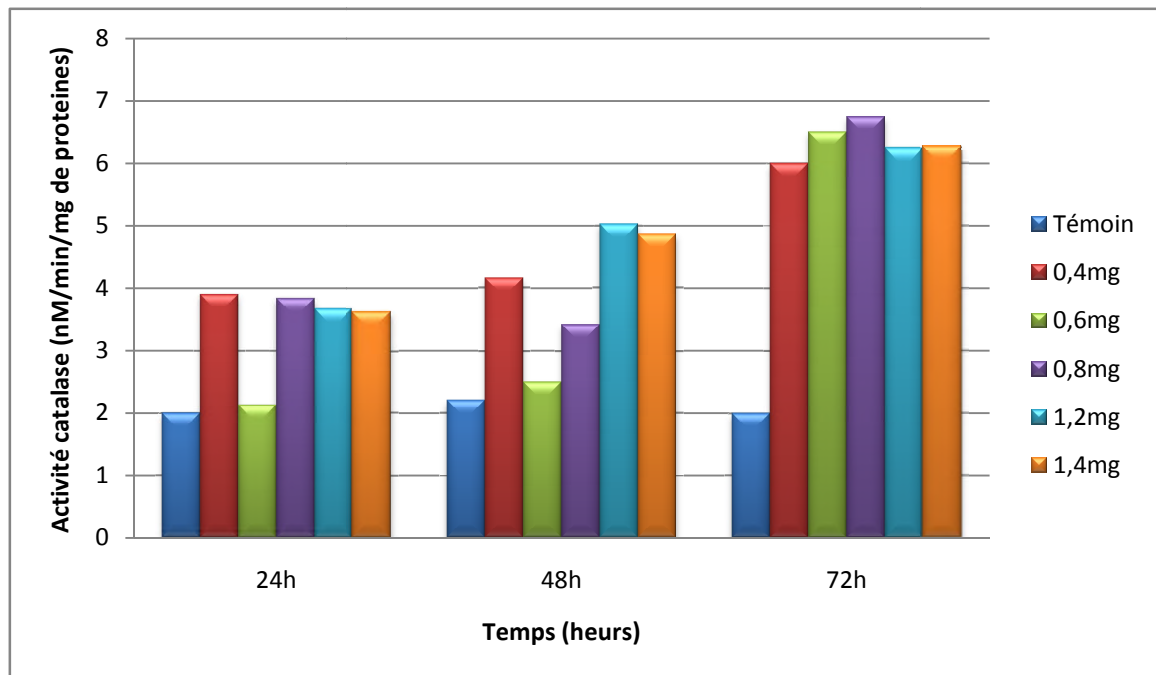
**Figure 27 : Effet de Paracétamol sur le taux de GSH.**

Nous remarquons une diminution du taux de GSH après traitement par différents concentrations de Paracétamol.

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

### **1-3-2- Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité catalase**

Le suivre de l'évolution de l'activité catalase au cours de l'expérimentation est illustré dans la figure (28).



**Figure 28 : Effet de Paracétamol sur l'activité catalase.**

Nos résultats montrent que cette activité augmente de façon progressive selon la dose et le temps d'exposition donc elle est dose-dépendante. Cette augmentation est particulièrement observée chez les paramécies traitées avec les plus fortes concentrations de Paracétamol (0.8, 1.2 et 1.4) et ce par rapport au témoin après 72h de traitement, alors chez les témoins, l'activité catalase ne subit aucune variation et reste constante.

## 2- Discussion

Nous tenterons dans cette étude de suivre un composé pharmaceutique, largement utilisés dans les milieux médicaux, et de mettre en évidence leurs effets sur les paramètres, biochimiques et physiologiques des modèles biologiques non cibles considérés comme d'excellents modèles alternatifs mais également des bio-indicateurs de la pollution. Notre choix s'est porté sur des protistes ciliés: *Paramecium.sp.*

D'abord dans notre étude nous nous sommes étudiés la cinétique de croissance de *Paramecium sp* vise à établir un modèle de croissance bien défini mettant en évidence avec précision les différentes étapes d'une courbe spécifique à cette espèce de protozoaires ciliés.

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

Dans ce travail nous nous sommes aussi intéressés à la toxicité d'une molécule utilisée largement comme antipyrétiques : le Paracétamol sur un modèle biologique alternatif à savoir la paramécie. Pour cela nous sommes intéressés en premier lieu à l'effet de ce xénobiotique sur la croissance cellulaire qui est un paramètre qui rend réellement compte de la toxicité d'un xénobiotique (**Sauvant et al., 1999; Perez-Rama, 2001**).

Après le traitement par le Paracétamol nos résultats montre que quelque soit la concentration de xénobiotique, la croissance est inhibée en fin de traitement (72h). La toxicité se manifeste en premier lieu par une importante diminution du nombre de cellules qui est dose dépendant en fonction du temps d'exposition et ce dès le début du traitement. Ceci nous amène à confirmer l'influx du Paracétamol à l'intérieur des cellules, malgré la présence de la paroi cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive de xénobiotique mais qui reste néanmoins perméable (**Beaumont et Cassier, 1998**). Nos résultats sont en accord avec ceux de **Cleuvers, (2003)** qui a montré que l'Ibuprofène inhibe la croissance de *Desmodesmus subspicatus* à la concentration de 315 mg/L et immobilise les *Daphnia magna* à 108 mg/L.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Bouaricha et al ., (2013)** qui ont étudié la toxicité du Proclaim (biopesticide) sur les paramécies et ceux de **Sbartai et al., (2009)** qui ont testé l'effet du Bifenazate et de l'indoxacarbe (pesticides) et qui ont mis en évidence l'importance du facteur -croissance des paramécies- en toxicologie cellulaire, cet effet de Paracétamol sur la croissance cellulaire, est renforcé par le pourcentage de réponse (**Wong et al., 1999**), qui un paramètre confirment bien l'évolution des courbes de croissance des paramécies traitées par les différentes concentrations de xénobiotique utilisés.

Nos résultats montre aussi que il ya une inhibition de croissance cellulaire traduisant par le taux de mortalité des paramécies exposé au Paracétamol qui à l' origine d'une forte mortalité. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Quinn et al., (2008)** et **Kim et al., (2009)** qui ont montré que l'Ibuprofène tue 50 % des *Thamnocephalus platyurus*, des *Hydra attenuata* et des *Oryzias latipes* respectivement aux concentrations 19 mg/L, 22 mg/L et plus de 100 mg/L.

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

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

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

l'augmentation du taux de protéines totales pourrait être liée au déclenchement du processus de détoxification à travers l'induction de la transcription des gènes des enzymes.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Peccini et al., (1994)** ; **Masaya et al., (2002)** qui ont mis en évidence une augmentation significative du taux de protéines totales sous l'effet d'un stress chimique chez des modèles biologiques différents (têtards, protistes ciliés, lapins), nos résultats sont en accord aussi avec ceux de **Benbouzid(2012)** qui mis en évidence une stimulation du taux de protéine totale chez *Paramecium sp* traité par des pesticides, **Grara(2011)** également a montré une perturbation du taux de protéines, chez des escargots traités par des métaux lourds, une augmentation des taux de protéines carbonylées hépatiques chez le rat après une exposition sub-chronique à un insecticide le malathion a été mise en évidence par **Possamai et al.,(2006)**. Ainsi ces résultats vont dans le même sens que ceux de **Benbouzid (2012) et Boulassel (2014)** qui ont respectivement mise en évidence une stimulation de taux des protéines totales chez les *Paramécium sp* en présence des agents thérapeutique de synthèse et des AINS.

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

Pour les lipides, nous avons aussi montré une déplétion du taux de ces macromolécules puisque les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses double liaisons, comme l'acide linoléiques ou l'acides éicosapentenoïque. Les réactions radicalaires sont à l'origine de la peroxydation lipidique que se traduit *in vitro* par le rancissement. Le mécanisme radicalaire comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et terminaison (**Halliwell et Gutteridge, 1989**). Plus récemment **Benbouzid (2012)** a montré que chez les paramécies traitées par des pesticides le taux des lipides étaient fortement perturbés, l'auteur explique ce phénomène par la peroxydation lipidique générée par les ROS.

les résultats qui nous avons trouvé sont en accord avec ceux de **Benbouzid(2012)** et **Amamra et al., (2015)** (a).ce qui confirme la toxicité de l'xénobiotique testés particulièrement aux plus fortes concentrations que les faibles concentrations.

Dans notre travaille nous avons obtenu une diminution du taux de GSH pour les échantillons traité par le Paracétamol en fonction du temps. Le glutathion se trouve dans le cytosol en concentration élevée, le reste étant localisé dans les mitochondries, le noyau et les peroxyosomes (**Lu, 2000**). Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion a un rôle très important dans le maintien de l'état réduit de la cellule (**Yu, 1994**). Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification. Une déficience en GSH expose les cellules à un risque oxydatif (**Drögue, 2002**). En effet, le GSH élimine les xénobiotiques comme les pesticides par conjugaison. Ce processus peut faire intervenir la glutathion-S-transférase (**Renneberg, 1982, Noctor et al., 2002**).

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

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

La réduction du taux de GSH peut être expliquée par l'utilisation massive de ce dernier par la GST dans les réactions de conjugaison.

Parmi les enzymes impliquées dans les systèmes de détoxification, la catalase occupe une place de choix. En effet cette enzyme apparait dans les premières lignes de défense contre les radicaux libres. Ainsi, **Azzouz (2012)** a mis en évidence une forte induction de l'activité CAT chez *Paramecium tetraurelia*, traitées avec deux pesticides : Amistar Xtra et le Glyphosate, il en est de même pour les travaux de **Benbouzid (2012)** qui a aussi démontré une induction de l'activité Catalase chez ce même modèle biologique suite a un traitement avec des phényl phosphoramidates. Ainsi, nos travaux confirment ceux cités ci-dessus puisque nous avons également mis en évidence une augmentation de l'activité Catalase chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de Paracétamol confirmée ainsi la toxicité d'xénobiotique particulièrement aux fortes concentrations.

Nos résultats corroborent ceux de **Lopez (2007)** qui ont démontrés que les pesticides induisant l'activité des enzymes antioxydantes, il en est de même pour l'étude de **Montassif et al., (2007)** qui ont mis en évidence une augmentation de l'activité catalase chez *Tetrahymena pyriformis* soumis à une pollution métallique, cependant **Morakinyo et al., (2011)** ont montré une diminution de l'activité CAT chez les spermatozoïdes de rats traités par la Nifedipine ,les auteurs expliquent cette diminution par un forte stress oxydatif.



# *Conclusion et perspectives*

## **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.

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

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

Au niveau intracellulaire, nous avons mis en évidence une perturbation des macromolécules (lipides, glucides, protéines), en ce qui concerne l'étude des biomarqueurs de stress nous avons mis en évidence le déclenchement d'une batterie de processus enzymatiques telles que la stimulation de l'activité CAT connus pour leur rôle dans la détoxification ainsi qu'une démunissions du taux de GHS.

A l'issue de ce travail nous pouvons conclure que :

- La paramécie est un modèle cellulaire idéal pour les études en toxicologie cellulaire et écotoxicologie vue son organisation cellulaire particulière, son comportement et sa culture simple et facile au laboratoire.
- L'hypothèse la plus plausible que nous pouvons avancer, est que l'xénobiotique testé induit la formation de « **radicaux libres** » conséquence logique d'un stress chimique cellulaire.

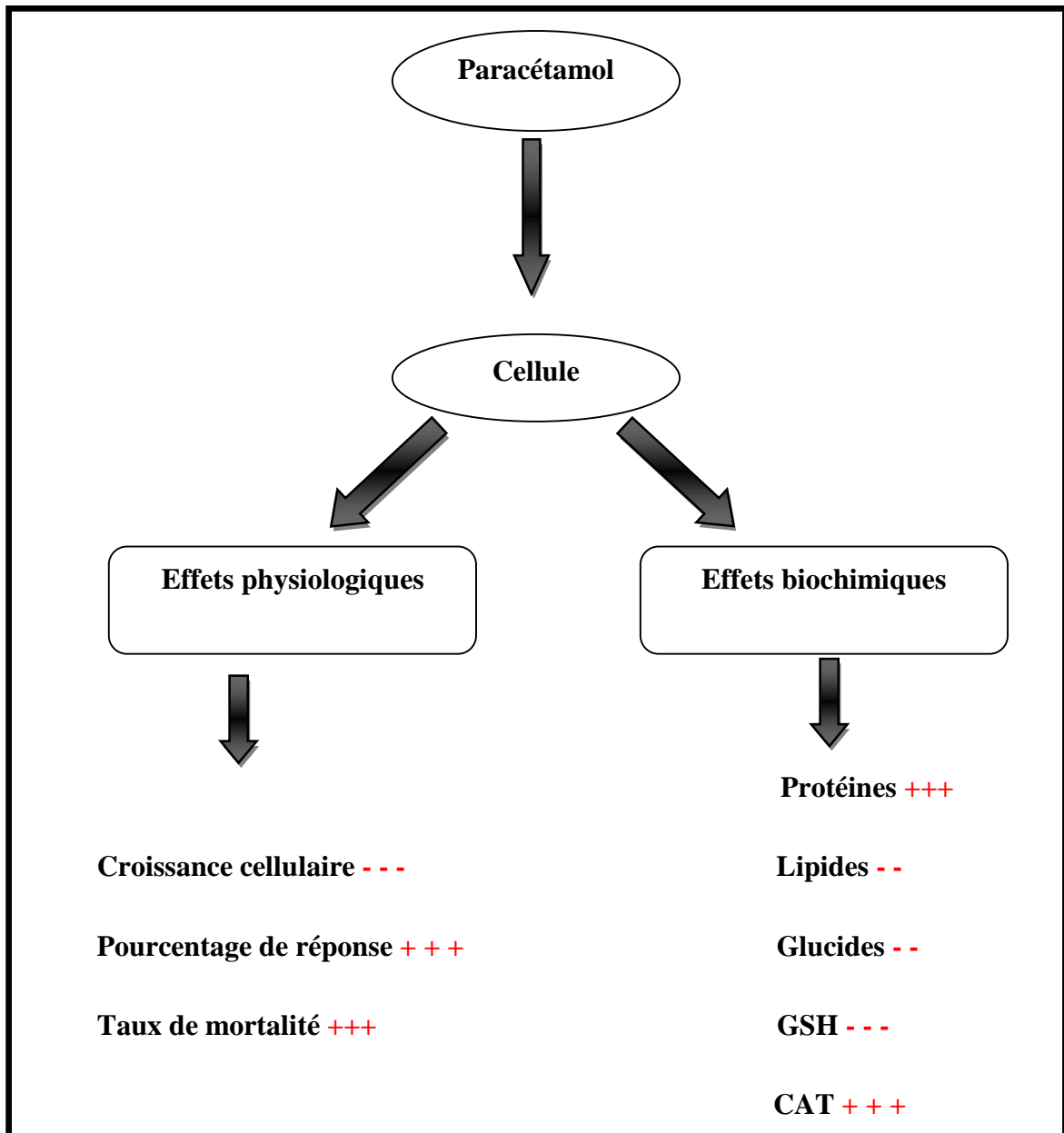


Figure29 : Effets physiologiques et biochimiques du Paracétamol observés.

## **Perspectives**

En perspectives, il serait intéressant :

- De comparer les effets de paracétamol sur d'autres ciliés proches des paramécies comme *Tetrahymena pyriformis* .
- D'entamer une recherche pluridisciplinaire en impliquant des chimistes, afin d'étudier la toxicité des produits de dégradations de paracétamol sur l'environnement aquatique.
- D'étudier la respiration à partir de mitochondries isolées des paramécies.
- Analyser de manière fonctionnelle les entités moléculaires induites par le stress chimique et, identifier et caractériser les gènes impliqués dans les processus mis en jeu dans la signalisation des stress chimiques et/ou dans la régulation de la réponse cellulaire ;
- Etudier le devenir de ces toxiques, leurs différentes formes de stockage (spéciation), afin de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la concentration et de la biotransformation de ces éléments au niveau cellulaire ;



# *Référence bibliographique*

**A**

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

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

**Albrich, W.C., Monnet, D.L., Arbarth, S., 2004:** Antibiotic Selection Pressure and Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Em. Infect. Dis.* 10: 514-517.

**Allen, R., 1991 :** Oxygen reactive species and anti-oxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation: *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 196, p. 117-29.

**Altan, O., Pabuccuoglu, A., Altan, A., Konyalioglu, S., Bayraktar, H. ; 2003 :** Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science.* 44:545-550.

**Alvarez, B., and Radi R. ; 2003 :** Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25: 295–311.

**Amamra,R.,Djabar,MR., Grara,N.,Moumeni,O.,Otmani,H.,et al., 2015 :** Cypermethrin-Induces Oxidative Stress to the Freshwater Ciliate Mode : *Paramecium tetraurelia*. *Annual Review et Research in biology*,5 (5),385-399.<sup>(a)</sup>.

**Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P., 2003:** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere.* 50: 1319-1330.

**Antony, M., 2004 :** Bioréacteur à membranes immergées pour le traitement des eaux résiduaires urbaines. Thèse de doctorat, institut national des sciences appliquées de Toulouse, p 105.

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

**Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004:** Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 333: 167-184.

**Azzouz, z., 2012 :** Etude des effet toxiques d'un fongicide(Amistar Xtra) et d'un herbicide(Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Doctorat de l'université d'annaba.141, p114.

## **B**

**Baillie, JK., Bates, MGD., Thompson, AAR., Waring, WS., Partridge, RW., Schnopp, MF., Simpson, A., Gulliver-Sloan ,F., Maxwell ,SRJ., and Webb, DJ., 2007 :** Lowland Subjects Exposed to High Altitude Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Endogenous Urate Production Augments. *Chest.* 131:1473-78.

**Bannwarth, B., and F. Pehourcq., 2003:** Pharmacologic basis for using paracetamol: pharmacokinetic and pharmacodynamic issues. *Drugs.* 63 Spec No 2: p. 5-13.

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

**Beameont et Cassier., 1998 :**Travaux Pratique de biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3<sup>ème</sup> édition DUNOD.

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

**Benbouzib,H., 2012 :** Evaluation et etude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées.these de doctorat de l'université d'Annaba.p 87.

**Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005 :** Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environnement, a case study: Höje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122: 195-204.

**Bennett, J., and Cabbage, J.; 1992:** Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. Of Ecology, Olympia, WA. 29pp.

**BIAM** (Banque de Données Automatisée sur les Médicaments), En substance : paracétamol. 2004.

**Bleys, J., Miller, ER., Pastor-Barriuso, R., Appel, LJ., and Guallar, E. ; 2006 :** Vitaminmineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 84(4):880-887.

**Bloomer, RJ., and Fisher-Wellman, KH.; 2008 :** Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine*. 5(3):218-28.

**Bonnefont, J., Alloui, A., Chapuy, E., et Al., 2003 :**Orally administered paracetamol does not act locally in the rat formalin test: evidence for a supraspinal, serotonin-dependent antinociceptive mechanism. *Anesthesiology*Oct;99(4):976-81.

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

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

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

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

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

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

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

**Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003:** Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142: 169-183.

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

**Buser, H.-R., Müller, M.D., 1998:** Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide Mecoprop in various Swiss lakes and the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 32: 188-192.

## C

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

**Carlson, K., Yang, S., Cha, J.M., Doeslen, K., Davis, J., 2004:** Antibiotics in Animals Waste Lagoons and Manure Stockpiles, *Colorado State Univ Agronomy News.* 24-3.

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

**Chaudiere, J., and R. Ferrari-Iliou, 1999 :** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms: *Food Chem Toxicol*, v. 37, p. 949-62.

**Cherait., 2015:** Evaluation à échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridine sur un modèle expérimental bioindicateur de stress.

**Clarkson, P.M. and Thompson, H.S., 2000 :** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition.* 72(2):637- 646.

**Clayden, J; Warren, S; Greeves, N; Wothers, P., 2003:** Chimie organique. De Boeck. 2<sup>ème</sup> Ed. Paris.

**Cleuvers, M., 2005:** Initial risk assessment for three [beta]-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere*. 59: 199-205.

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

**Cohen, J., 2007:** Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.).Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.

**Cohen, G., Hochstein, P., 1963 :** Glutathione peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 2: 1420-1428.

**Corliss, J. O., Lacy, D. And Palay, S. O., 1961:** Fixing and staining of Protozoa in the Microtomist's Vade-Mecum (Bolles-Lee). London, *XII e* ed.

## **D**

**Darley-USmar, V., and Halliwell, B., 1996 :** Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system: *Pharm Res*, v. 13, p. 649-62.

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

**De Moffarts B, Portier K, Kirschvink N, Coudert J, Fellmann N, van Erck E, Letellier C, Motta C, Pincemail J, Art T, Lekeux P. ; 2007 :** Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. *Vet J.* 174(1):113- 21.

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

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

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

**Douris, PC., Elokda, AS., Handrakis, JP., Principal, S., Rondo, E., Bovell, J., Coughlin, WP., Mastroianni, CN., Wong, MJ., Zimmerman, T. ; 2009 :** Martial art train enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *J Strength Cond Res.* 23(5):1518-23.

**Duarte, TL., Jones, GDD., 2007:** Vitamin C modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 43:1165–1175.

**Dunn, P., Galvin, S., Hettenbach, K., 2004:** The development of an environmentally benign synthesis of sildenafil citrate (Viagra™) and its assessment by green chemistry metrics. *Green Chem.* 6: 43-48.

## **E**

**Ellis, F., 2002:** Paracétamol - a curriculum resource. Osborne. 1<sup>ère</sup> Ed., Londres.

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

**Evans, P., and Halliwell, B., 1999 :**Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria: *Ann NY Acad Sci*, v. 884, p. 19-40.

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

## **F**

**Faure-Frémiot, 1924:** Contribution à la connaissance des infusoires planctoniques. *Bull. Biol. Fr. Belg., suppl.* 6 : 1-171.

**Favier, A., 2003 :** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 108-115.

**Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004 :** Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the

current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment ? Environ. Toxicol. Chem. 23: 1344-1354.

**Ferrari, B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2003.** :Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters : study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. Ecotoxicol Environ Saf 55(3), 359-70.

**Finaud, J., Lac ,G., Filaire, E. ; 2006b** : Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. Sports med 36 (4): 327-58.

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

## **G**

**Garric, J., Ferrari, B., Fraysse, B., Mons, R., Vollat, B., 2006** : Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. Environnement Risques et Santé. 5: 290-295

**Génoscope 2007:** Centre National de Séquençage. France.

**Giesy, J.P. ,and Hoke, R.A.; 1989:** Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection. J. Great Lakes Res. 15:539-569.

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

**Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., Kanazaw, K. ; 2008** : A formation mechanism for 8-hydroxy-2 -deoxyguanosine mediated by peroxidized 2-deoxythymidine. Free Radical Biology and Medicine. 45:1318–1325.

**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 l'Université de Annaba.120, p.91.

**H**

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

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989 :** Free Radicals in Medicine, Second edition, Clarendon Press, Oxford.

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

**Hargreaves, B.J., Kronfeld, D.S., Waldron, J.N., Lopes, M.A., Gay, L.S., Saker, K.E., Cooper, W.L., Sklan, D.J., Harris, P.A. ; 2002b :** Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Vet J Suppl.* (34):116-21.

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

**Hellsten, Y., Nielsen, J.J., Lykkesfeldt, J., Bruhn, M., Silveira, L., Pilegaard, H., Bangsbo, J. ; 2007 :** Antioxidant supplementation enhances the exercise-induced increase in mitochondrial uncoupling protein 3 and endothelial nitric oxide synthase mRNA content in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine.* 43:353–361.

**Hempel, N., Ye, H., Abessi, B., Mian, B., Melendez, J.A. ; 2009 :** Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine.* 46:42–50.

**Honigberg, 1964:** Morphology and evolution of Ciliophora. III. Diagnoses and Phylogenesis of 53 Saproelbiontes mainly of the order Heterotrichida. *Arch. Protistenk.*, 107 : 185-294.

**Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., 2002:** Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43(2):229-235.

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

**I**

**Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., Rubino, M., 2005:** Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Sci. Total Environ.* 348: 93-101.

**Isidori, M., Bellotta, M., Cangiano, M., Parrella, A., 2009 :** Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environment International* 35, 826-829.

**J**

**Johnson, RJ., Sautin, YY., Oliver, WJ., Roncal, C., Mu, W., Gabriela Sanchez-Lozada, L., Rodriguez-Iturbe, B., Nakagawa, T., Benner, SA. ; 2009 :** Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society? *J Comp Physiol B.* 179(1):67-76.

**Jones, D.P., Ekl6w, L, Thor, H, Orrenius, S., 1981 :** Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 505-516.

**Junco, T.T., Martin, M.G., Toledo, L.P., Gomez, P.L., Barrasa J.L.M., 2001:** Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *Int. J. hyg. Environ. Health* 203: 363-368.

**K**

**Kahl, A.; 1930-1935:** Wimpertiere Oder Ciliata (Infusoria) *in: Dahl Tierwelt Deutschlands Jena.G. Fischer* (19, 21, 25, 26).

**Kehrer, JP. ; 2000 :** The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 149:43–50.

**Kim, J., Park ,Y., Choi, K., 2009:** Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquat Toxicol* 91:87–94.

**Kirschvink, N., de Moffarts, B., Lekeux, P.; 2008 :** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal.* 177:178–191.

**Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D., 2009:** Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International* 35, 402- 417.

**Koenraad, P.M.F.J., Hazeleger, W.C., Van der Laan, T., Beumer, R.R., Rombouts, F.M., 1994:** Survey of *Campylobacter* spp in sewage plants in the Netherlands. *Food Microbiol.* 11: 65-73.

**Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, B.L., Buxton H.T., 2002.** Pharmaceuticals, hormones, and others organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202-1211.

**Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., 2004:** Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 328: 119-130.

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

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

**Kümmerer, K., 2004:** Pharmaceuticals in the Environment (2nd ed.), Springer-Verlag.

## L

**Lam, M.W., Mabury, S.A., 2005:** Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 67(2):177-188.

**Lamprecht, M., Greilberger, J., Oettl, K., 2004:** Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. *Nutrition.* 20(7-8): 728-730.

**Lechat, P., Lagier G., et Boiteau, J.,** Le paracétamol. *Thérapie*, 1978, 33(5), 551-585.

**Leclerc, H., Mizon F., 1978 :** Eaux d'alimentation et bactéries résistantes aux antibiotiques. Incidence sur les normes. *Rev. Epidémiol. Santé Publique.* 26:137-146.

**Le Marec, C., 2005 :** Histoire du paracétamol. Le praticien en anesthésie-réanimation. Vol 9 - N°4, 321-328.

**Lin, A.Y.C., Reinhard, M., 2005:** Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. Environ. Toxicol. and Chem. 24(6) 1303-1309.

**Livingstone, D.R., 2001 :** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.

**Lopez, O.,2007:** Change in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters.*171:3, p.146-153.

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

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

## **M**

**MAC kellar, Q.A., Mays,A., et Lees, P.,1991:** Pharmacology and therapeutics of NSAID in the dog and cat - 2 : individual agents. *J. Small Anim. Pract.*, 32, 225-235.

**Mac Laren, D. ; 2007 :** Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.

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

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

**Marnett, L.J., 2002 :** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*,p.181- 182,p.219-222.

**Marnett, L.J., Riggins, JN., West, J.D. ; 2003:** Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest.* 111(5):583-93.

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

**Matés, JM., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999:** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* 32, 595-603.

**McCord, J.M., Fridovich, I. ,1969 :** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

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

**Meister, A. ; 1994 :** Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 269: 9397–9400.

**Mesplede, J ; Saluzzo, C., 2004 :** Cent manipulations en chimie organique et inorganique. Bréal. 1<sup>ère</sup> Ed. Paris.

**Meyer, E., et Beisson, J.; 2005 :** Épigenétique: la paramécie comme modèle d'étude. *MEDECINE/SCIENCES n° 4, vol; 21 : 377-83.*

**Montassif, D., Manar,R., Kabine, M.,Bourhim, N., Zaroul,Z., Latruffe, N., Elkebbej, M.,M.S.,2007 :**Physiologie, morphologie and metabic change in tetrahymena pyriformis for the in vivo cytotoxicity assesement of metallic polution :Impact on D-B-hydroxyburate dehydrogenase.*Ecological Indicateurs*, 7,p.882-894.

**Morakinyo,A.O.,IranloyeB.O., Darmola, A.O., OA Adegoke, O.A., 2011:** Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress.*Advances in Medical Science*, 56(1) ,95-105.

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

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

**Murrell, G., M. Francis, and Bromle, L., 1990** : Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals: *Biochem J*, v. 265, p. 659-65.

## N

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

**Nicholls, P., Fita, I., Loewen, P.C. 2001** : Enzymology and structure of catalases. *Adv. Inorg. Chem.* 51: 51-106.

**Niess, AM., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B., Speit ,G. ; 1996** : DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med*. 17(6):397-403.

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

## P

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

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

**Pasquier-Meunier, P.,2011** : Mise en place de protocoles d'analyse des carbohydrates, lipides et acides gras volatiles sur des échantillons d'un décanteur primaires. Institut national des sciences appliquées Toulouse, France, p 06.

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

**Paxeus, N., 2004**: Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional

wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Science and Technology* 50(5):253-260.

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

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

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

**Perrin, J.F., 2011:** *Analys chim/TP-dosage-protéines-abs.odt*, p1.

**Pittaluga, M., Parisi, P., Sabatini, S., Ceci, R., Caporossi, D., Valeria Catani ,M., Savini, I., Avigliano, L.; 2006:** Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res.* 40(6):607-14.

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

**Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D. & Hutchinson, T., 2008 :** Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 70, 47-52.

**Possamai,F.P.,Fortunato, J.J.,Feir,G.,Aagostinho , F.R., Quevedo, J.,Wilhelm Filho, D.,and Dal-Pizzol ,F., 2006:** 'oxydative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rat ', *environnement toxicologie and pharmacology*,p.198-204.

**Powers, SK., Smuder, AJ., Kavazis, AN., Hudson, MB. ; 2010:** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism.* 20:2–14.

**Powers, SK., and Lennon, SL., 1999:** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

**Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M., Dusart J. 2003:** Microbiologie. Édit. 2. De Boeck Université, 1164 p.

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

## Q

**Quinn, B., Gagne, F., et Blaise, C., 2008 :** An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment* 389, 306-314.

## R

**Regoli, F., Principato, G., 1995 :** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implications for a proper use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31: 143-164.

**Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., 2003 :** Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2120-2129.

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

**Remy, C. E., Marret, and F., Bonnet., 2006:** Actualité du paracétamol. Évaluation et traitement de la douleur

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

**Renner, R., 2002 :** Drugs mixtures prove harmful. *Environ. Sci. Technol.* 37:1713-1719.

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

**Richards, S. M., Kelly, S. E., et Hanson, M. L., 2008:** Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 637- 644.

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

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

**Roig, B., 2008:**Knappe: presentation and synthesis. Bruxelles, Commission Européenne, 45 p. Diffusées le 15-16/10/2008.

**Roque, M., 1961:** Recherches sur les Infusoires Ciliés : Les *Hymenostomes pbiculiens*. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, XCV : 431-519.

## S

**Sacher, F., Raue, B., Brauch, H.-J., 2005:** Analysis of iodinated X-ray contrast agents in water samples by ion chromatography and inductively-coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1085: 117-123.

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

**Sanderson, H., Johnson, D.J., Reitsma, T., Brain, R.A., Wilson, C.J., Solomon, K.R., 2004b:** Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul. Toxicol. Pharm.* 39: 158-183.

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

**Sayre, LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. ; 2005 :** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità*. 41(2):143- 164.

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

**Schwartzbrod, J., Block, J.C., Collomb, J., 1983:** Surface water *Salmonellae*: serotypes and antibiotic resistance. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol*. 42: 179-189.

**Seiler, J.P., 2002:** Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology--can the two be connected? *Toxicology Letters* 131(1-2):105-115.

**Serrie, A et Thurel, C. ,2002:** La douleur en pratique quotidienne : diagnostic et traitement. Arnette ; 2<sup>ème</sup> Ed., Paris.

**Serviddio,G.,Bellanti,F.,Vendemiale, G., 2013 :** Free radical biology for medicine : learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*,65,952-968.

**Shils, ME., Shike, M., Ross, AC., Caballero, B., Cousins, RJ., 2006:** Modern Nutrition in Health and Disease. Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 396. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 27812-27817

**Spiteller, G. ; 2006 :** Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology Medicine*. 41(3):362–387.

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

**Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K., Hartmann, A., 1997:** Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in Sewage Water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36: 174-179.

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

**Stubbs, C.O. and A.J. Lee. ; 2004 :** *The obesity epidemic: both energy intake and physical activity contribute.* *Med J Aust* (9): p. 489-91.

**Suty, L., 2010 :** La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Editions Quae. p. 328.

## T

**Taxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J., 2005:** Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* 39: 1761-1772.

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

**Ternes, T.A., 1998:** Occurrence of drugs I german sewage treatment plants and river. *Water Res.* 32: 3245-3260.

**Thaker, 2005:**Pharmaceutical data elude researchers, *Environ. Sci. Technol.* 139: 193A-194A.

**Togola, A., 2006 :** Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques - Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I, 316 p.

**Tsai, K., Hsu, TG., Hsu, KM., Cheng, H., Liu, TY., Hsu, CF., and Kung., CW. ; 2001 :** Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1465-72.

V

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

**Van Helden, YGJ., Keijer, J., Knaapen, AM., Heil ,SG., Briedé, JJ., van Schooten, FJ., Godschalk, RWL. ,2009 :**  $\beta$ -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radical Biology Medicine*. 46:299–304.

**Vasconcelos, SML., Goulart, MOF., Moura, JBF., Manfredini, V., Benfato, MS., Kubota, LT. , 2007 :** Espécies reativas de oxigénio et de nitrogénio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim Nova*. 30(5):1323-1338.

**Vergani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrell, A., Valente, L., L, Floreani., Bragantini ,F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. , 2004 :** Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNAdepleted cell lines. *Eur J Biochem*. 271:3646–3656.

**Viarengo,A. ,Nott,J.,1993 :**Mechanisme of heavy metalcation homeostasis in marine invertebrates. *Comp.Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol. Toxicol*, 104, p.355-372.

**Viarengo, A., 1994 :** Heavy metal cytotoxicity in mrine organ-isme : effet on  $ca^{+2}$  homeostasis and possible alternationof signal transduction pathways.*Adv. Comp.Environ.Phsiolo*, 20, p.85 110.

**Vidal.ML., 2001 :**Etude de marqueurs biochimique de pollution chez le molusque bivalves d'eau douce *Corbicula fluminea* (Muller)-Purification et caractérisation des Glutathion S-Transférases.Thèse de doctorat de l'université de Bordeaux.267 ,p.15,17.

**Viel, E., et al., 1999:** Propacetamol: from basic action to clinical utilization. *Ann Fr Anesth Reanim*, 18(3): p. 332-40.

W

**Webb, S.F., 2001:** A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: K. Kümmerer, Editor, Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks, Springer-Verlag, Berlin. pp. 319-343.

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

**Weigel, S., 2003:** Occurrence, distribution and fate of pharmaceuticals and further polar contaminants in the marine environment. PhD Thesis. University of Hamburg 136 p.

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

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

**Wilber, RL., Holm, PL., Morris, DM., Dallam, GM., Subudhi, AW., Murray, DM.,Callan, SD., 2004 :** Effect of FIO<sub>2</sub> on oxidative stress during interval training at moderate altitude. *Med Sci Sports Exerc.* 36(11):1888-1894.

**Winterbourn, C.C., 2015 :** Are free radicals involved in thiol-based redox signaling ? *Free Radical Biology and Medicine*, 80,167-170.

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

**Wolinsky, I. ; 1998 :** Nutrition in Exercise and Sport. 3th edition. New York: CRC Press.

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

Y

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

**Z**

**Zou, J., Neumann, N.F., Holland, J.W., Belosevic, M., Cunningham, C., Secombes, C.J., et Rowley, A.F. ,1999:** Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. *Biochemical Journal* 340(1), 153-159.

**Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000:** Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*. 355: 1789-1790.

## Résumé

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité d'un médicament largement utilisé comme un antipyrétique le Paracétamol sur un modèle cellulaire *Parameciumsp*.

Plusieurs concentrations de Paracétamol ont été choisies (0.4mg/l, 0.6mg/l, 0.8mg/l, 1.2mg/l et 1.4mg/l), et différents paramètres : physiologique (croissance, pourcentage de réponse et le taux de mortalité), biochimiques (protéines total, lipides, glucides) et les biomarqueurs de stress oxydant (CAT et GSH).

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

**Mots clé :** Toxicité, Paracétamol, *Paraméciumsp*, Stress oxydatif.

## ملخص

توجد عدة أنواع من الأدوية تضم مواد فعالة مخصصة للتفاعل مع الكائن الحي، حيث عند تواجدها في الوسط البيئي يمكن أن تؤثر في الكائنات الحية غير المستهدفة.

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثيرات السمية لخافض الحرارة و مسكن الألم البراسيتامول، ولإجراء هذه الدراسة فقد تم استخدام نوع من أنواع الهدبيات البرامسيوم كنوع بيولوجي.

وقد بينت النتائج المتحصل عليها بان هذا الدواء له تأثير سلبي على النمو الخلوي للبرامسيوم كما أثبتته حساب النسبة المئوية للاستجابة ومعدل الوفيات. إضافة إلى ذلك فان النتائج أظهرت نقص في الايضيات الرئيسية والمتمثلة في الدهون والغلوسيدات على غرار البروتينات التي تم تسجيل ارتفاع في معدلها.

وفي الأخير ولإتمام دراستنا قمنا بدراسة المؤشرات الحيوية للأكسدة، فقد تبين وجود تنشيط إنزيم CAT مع انخفاض في معدل GSH.

**الكلمات الدليلية :** الأكسدة- البراسيتامول- البرامسيوم- السمية.

## ABSTRACT

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

Therefore, a culture of *paramecium sp*. Was treated with deferent concentrations of paracetamol. In our approach to assess the effects of this molecule, we measured the yeast cell growth and the rate of lipids, proteins and carbohydrates. In addition to the levels of some stress biomarker (GSH and CAT). As a result of this research, paracetamol have a decrease on cell proliferation of *paramecium sp*, this inhibitory effect was dose-dependent and proportional to increasing concentration of paracetamol. The same result was found about the lipids and carbohydrates rates, when the results of proteins rate shown an increase of this parameter we have also demonstrated an increase of antioxidant enzyme (CAT) measured after exposure to paracetamol, together a decrease of no enzymatic antioxidants (GSH levels). Our results indicate clearly an occurrence of oxidative stress.

**Keywords:** Toxicity, Acetaminophen, *parameciumsp*, Oxidative Stress.