



الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologiques

Spécialité : Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Intitulé

Stress oxydant induit par des mixtures de xénobiotiques.

Présentée par : LAOUABDIA SELLAMI Meriem

Directrice de thèse : Pr. BERREBBAH Houria (Université Badji Mokhtar Annaba)

Devant le jury composé de :

Dr. KADRI Skander	Pr	Université Badji Mokhtar Annaba	Président
Dr.TARFAYA Moncef	MCA	Université Badji Mokhtar Annaba	Examineur
Dr.DAHDYOUH Faouzi	MCA	L'école Normale Supérieure d'Enseignement Technologique de Skikda	Examineur
Dr. BOUMEDRIS Zineddine	MCA	Université Chadli Bendjedid El Taref	Examineur

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

Cette thèse est le fruit d'un travail de plusieurs années réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie cellulaire, de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

*Tout d'abord, je tiens à remercier **Mme BERREBBAH Houria**, responsable du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire et Professeur à l'Université d'Annaba, pour sa guidance précieuse et son rôle déterminant dans l'orientation de mes recherches. Je la remercie sincèrement pour ses conseils avisés, ses compétences scientifiques, sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Ma reconnaissance va aussi à **Mr DJEBAR Med Reda** pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé lors de ma première inscription au sein du laboratoire.*

Ainsi, je remercie vivement les membres du Jury qui ont eu l'amabilité de porter une appréciation sur ce travail.

*Merci à **Mr KADRI Skander**, Professeur à l'Université Badji Mokhtar Annaba de pouvoir présider le Jury.*

*Ma profonde gratitude va à **Mr TARFAYA Moncef**, de l'Université Badji Mokhtar Annaba, à **Mr DAHDOUH Faouzi**, de L'école Normale Supérieure d'Enseignement Technologique de Skikda et à **Mr BOUMEDRIS Zineddine**, de l'Université Chadli Bendjdid El Taref d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.*

*Je voudrais remercier également mes collègues et amis du laboratoire de Toxicologie Cellulaire : **Khaled, Lyes, Amina, Chiraz, Linda, Medina et Imene**, Merci pour la bonne compagnie et l'esprit du partage que je n'oublierais jamais.*

*Je souhaite exprimer ma reconnaissance infinie à ma famille, en particulier à mes **parents, mon frère, ma tante et mon époux**, pour leur soutien et leur foi en moi tout au long de ce parcours. Sans eux, ce travail n'aurait pas été possible.*

*Enfin, je remercie mes amies proches **Asma, Sana et Zina** ainsi que toutes personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail, je ne vous remercierais jamais assez.*

Dédicace

A ma fille, la prunelle de mes yeux

Racha

*« Croyez en vos rêves et ils se réaliseront peut-être. Croyez en vous
et ils se réaliseront sûrement. »*

Martin Luther King.

Résumé

Les éléments métalliques sont dispersés d'une manière permanente dans l'environnement, et du fait de leur persistance, ils peuvent s'accumuler dans les tissus des organismes vivants posant ainsi un problème majeur.

Ce travail vise l'évaluation de la toxicité des concentrations croissantes des sels d'Aluminium (Al) et de Chrome (Cr(VI)) sur deux modèles cellulaires alternatifs : *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp.* Pour cela, nous avons évalué l'impact de ces métaux sur le plan physiologique, biochimique, enzymatique, morphologique et comportemental.

Nos résultats mettent en évidence une perturbation de la croissance des deux modèles étudiés suite à l'exposition à l'Al, Cr(VI) et leur mixture. Cet effet inhibiteur est confirmé par les pourcentages de réponses positifs ainsi que par la perturbation des paramètres de croissance (Nombre, Vitesse, Temps de générations). Le suivi des biomarqueurs du stress oxydant indique l'induction de l'activité catalase (CAT) et de l'activité de Glutathion S-transférase (GST) et de l'augmentation du taux du Glutathion (GSH) et de la teneur en Malondialdéhyde (MDA) chez les deux modèles cellulaires révélant ainsi un état de stress oxydant. De plus, les observations microscopiques des cellules valident l'effet des métaux sur l'intégrité cellulaire. Chez les paramécies, ces effets sont accompagnés par une perturbation du mouvement et de la trajectoire.

Par ailleurs, les essais sur l'implication des mitochondries dans la toxicité des métaux testés mettent en évidence une perturbation de la production de l'ATP et/ou du métabolisme de l'oxygène après traitement par le Cr(VI) et une altération du coenzyme A 3-ketoacyl CoA thiolase après exposition à l'Al.

Mots clés : Toxicité, Métaux, Aluminium, Chrome, Levure, Paramécie, Mitochondrie, Stress oxydant.

Abstract

Metallic elements are permanently dispersed in the environment, and because of their persistence, they can accumulate in the tissues of living organisms, posing a major problem.

The aim of this study was to assess the toxicity of increasing concentrations of Aluminium salts (Al) and Chromium (Cr(VI)) on two alternative cell models: *Saccharomyces cerevisiae* and *Paramecium sp.* To do this, we evaluated the impact of these metals at the physiological, biochemical, enzymatic, morphological and behavioural levels.

Our results show a disturbance in the growth of the two models studied following exposure to Al, Cr(V) and their mixture. This inhibitory effect is confirmed by the percentages of positive responses and by the disruption of growth parameters (number, speed and generation time). Monitoring of oxidative stress biomarkers indicated the induction of catalase activity (CAT) and Glutathione S-transferase (GST) activity and an increase in Glutathione (GSH) and Malondialdehyde (MDA) levels in both cell models, thus revealing a state of oxidative stress. In addition, microscopic observations of the cells validate the effect of metals on cellular integrity. In paramecia, these effects are accompanied by a disruption in movement and trajectory.

In addition, tests on the involvement of mitochondria in the toxicity of the metals tested revealed a disturbance in ATP production and/or oxygen metabolism after treatment with Cr(VI) and an alteration in coenzyme A 3-ketoacyl CoA thiolase after exposure to Al.

Key words : Toxicity, Metals, Aluminium , Chromium , Yeast, Paramecium, Mitochondria, Oxidative stress.

ملخص

تنتشر المكونات معدنية بشكل دائم في البيئة، وبسبب ثباتها، يمكن أن تتراكم في أنسجة الكائنات الحية، مما يشكل مشكلة كبيرة .

كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم سمية التركيزات المتزايدة من الألمنيوم والكروم على نموذجين بديلين من الخلايا: كائنات سكاروميس المخية (*Saccharomyces cerevisiae*) وكائنات الباراميسيوم (*Paramecium sp.*) وللقيام بذلك، قمنا بتقييم تأثير هذه المعادن على المستويات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية والإنزيمية والمورفولوجية والسلوكية.

أظهرت نتائجنا اضطرابًا في نمو النموذجين المدروسين بعد التعرض للآل والكروم ومزيجهما. ويتأكد هذا التأثير المثبط من خلال النسب المنوية للاستجابات الإيجابية واضطراب معايير النمو (العدد والسرعة وزمن التوليد). أشارت مراقبة المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي إلى تحريض نشاط الكاتالاز (CAT) ونشاط الجلوتاثيون (S-transferase (GST) وزيادة في مستويات الجلوتاثيون (GSH) والمالونديالدهيد (MDA) في كلا النموذجين الخليين، مما يكشف عن حالة من الإجهاد التأكسدي. بالإضافة إلى ذلك، تثبت الملاحظات المجهرية للخلايا صحة تأثير المعادن على السلامة الخلوية. في الباراميسيا، يصاحب هذه التأثيرات اضطراب في الحركة والمسار.

بالإضافة إلى ذلك، كشفت الاختبارات الخاصة بتورط الميتوكوندريا في سمية المعادن التي تم اختبارها عن وجود اضطراب في إنتاج الأدينوسين الثلاثي الفوسفات و/أو استقلاب الأكسجين بعد المعالجة بالكروم وتغير في الإنزيم المساعد 3-كينتو أوكيل ثيولاز بعد التعرض للألمنيوم.

الكلمات المفتاحية: السمية، المعادن، الألمنيوم، الكروم، الخميرة، الباراميسيوم، الميتوكوندريا، الإجهاد التأكسدي.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des planches

Liste des abréviations

CHAPITRE I : Introduction

Préambule	1
1. Notions sur les métaux lourds :	2
1.1. Propriétés et caractéristiques :	3
1.2. Sources :	3
1.3. Intérêt d'utilisation :	4
1.4. Les métaux dans l'environnement :	5
1.5. Impact des métaux sur la santé humaine :	5
2. Rappels sur la toxicité de l'Aluminium et du Chrome :	6
2.1. Cas de l'Aluminium :	6
2.2. Toxicité du Chrome :	8
3. Effet des mixtures toxiques (effet cocktail) :	10
4. Stress oxydant et cibles cellulaires des toxiques :	11
5. Utilisation d'organismes alternatifs :	12
5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	13
5.2. <i>Paramecium sp</i> :	15
6) Objectifs :	17

CHAPITRE II : Matériel et méthodes 18

1. Matériel biologique :	18
1.1. Les levures :	18
1.2. Les paramécies :	19
2. Matériel chimique :	20
3. Méthodes :	21
3.1. Culture des cellules :	21
3.1.1. Culture de levures :	21
3.1.2. Culture de paramécies :	22
3.2. <i>Etude physiologique</i>	24
3.2.1. Cinétique de croissance des cellules :	24

3.2.2.	Pourcentage de réponse :	24
3.2.3.	Calcul des paramètres de croissance :	25
3.2.4.	Calcul des concentrations inhibitrices (CI50) :	25
3.3.	<i>Etude du métabolisme biochimique</i>	26
3.3.1.	Dosage de protéines totales :	26
3.3.2.	Dosage des lipides totaux :	26
3.4.	<i>Etude des bio-marqueurs du stress oxydatif</i>	28
3.4.1.	Préparation de l'extrait enzymatique :	28
3.4.2.	Dosage de l'activité catalase (CAT) :	28
3.4.3.	Dosage du taux de glutathion (GSH) :	29
3.4.4.	Dosage de la Glutathion S- transférase (GST):	30
3.4.5.	Dosage du Malondialdèhyde (MDA) :	30
3.5.	<i>Etude morphologique et comportementale</i>	31
3.5.1.	Cas des levures :	31
3.5.2.	Cas des paramécies :	32
3.6.	<i>Traitement de Saccharomyces cerevisiae par la TMZ, PDN et les KCN:</i>	33
3.7.	<i>Etude statistique</i>	33
CHAPITRE III : Résultats		34
1.	Effet des métaux sur la cinétique de croissance	34
1.1.	Cas des levures :	34
1.2.	Cas des paramécies :	37
2.	Effet sur le pourcentage de réponse :	40
2.1.	Cas des levures :	40
2.2.	Cas des paramécies :	43
3.	Effet des métaux sur les paramètres de croissance :	46
3.1.	Cas des levures :	46
3.2.	Cas des paramécies :	47
4.	Détermination des CI50 :	49
5.	Effet des sels d'Al, du Cr(VI) et de leur combinaison Al/Cr(VI) sur les paramètres biochimiques	50
5.1.	Cas des levures :	50
5.2.	Cas des paramécies	56
6.	Effet des métaux sur l'évolution des bio-marqueurs du stress oxydatif	62
6.1.	Cas des levures	62

6.2. Cas des paramécies	74
7. Impact de la toxicité d'Al et du Cr sur la structure cellulaire :	86
7.1. Cas des levures	86
7.2. Cas des paramécies	88
8. Effet des métaux sur le mouvement cellulaire :	91
8.1. Trajectoire :	91
8.2. Vitesse de déplacement des paramécies :	93
9. Effet des inhibiteurs mitochondriaux sur la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comparativement au traitement aux métaux (Sulfate d'Aluminium et Chromate de Potassium) ...	94
9.1 Cas des sels d'Al :	94
9.2. Cas des particules de Cr(VI) :	95
9.3. Evolution des pourcentages de réponse :	97
Chapitre IV : Discussion	98
Conclusion générale et perspectives	112
Références bibliographiques	114

Liste des figures

Figure 1 : Absorption et distribution de l'Aluminium dans l'organisme. (Gourier et Fréry, 2004)	8
Figure 2 : Quantités (tonnes) et sources d'émission du Chrome Hexavalent. (Xia et al., 2020).....	10
Figure 3 Structure d'une levure.....	14
Figure 4 : Structure d'une paramécie.	16
Figure 5 : Observation microscopique d'une culture de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Grx10)..	19
Figure 6 Observation microscopique d'une paramécie <i>Paramecium</i> sp fixée au Lugol (Gr x20).	20
Figure 7 : Observation microscopique de paramécie colorée au vert de méthyle (Gr x20)	23
Figure 8 : Protocol expérimental résumant la méthode de dosage des métabolites (Protéines et lipides totaux) basée sur les techniques de Shibko et al. (1966)	27
Figure 9 : Protocol expérimental décrivant la méthode de coloration des cellules avant observation au microscope optique.....	32
Figure 10 : Effet de l'Al sur la cinétique de croissance des levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	34
Figure 11 : Effet du Cr(VI) sur la cinétique de croissance des levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	35
Figure 12 : Effet du mélange Al/Cr(VI) sur la cinétique de croissance des levures.	36
Figure 13 : Effet des sels d'Al sur la croissance des paramécies après 96h d'exposition.....	37
Figure 14 : Effet des particules de Cr(VI) sur la croissance des paramécies après 96h de traitement. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	38
Figure 15 : Effet de la mixture Al/Cr sur la croissance des paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	39
Figure 16 : Pourcentage de réponse des levures traitées à l'Al. ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	40
Figure 17 : Pourcentage de réponse des levures exposées au Cr(VI). ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	41
Figure 18 : Pourcentage de réponse des levures exposées aux différentes mixtures d'Al/Cr(VI). ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	42
Figure 19 : Pourcentage de réponse des paramécies traitées avec les sels d'Al. ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	43
Figure 20 : Pourcentage de réponse des paramécies exposées aux Cr(VI). ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	44
Figure 21 : Pourcentage de réponse des paramécies exposées aux mélanges de concentrations Al/Cr(VI). ns : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)	45

Figure 22 : Effet de l'Al sur la teneur en protéines totales (µg) chez les levures. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	50
Figure 23 : Effet des concentrations croissantes du Cr(VI) sur le taux de protéines totales (µg) chez les levures. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	51
Figure 24 : Effet des différentes mixtures d'Al/Cr sur l'évolution du taux de protéines totales (µg) chez les levures. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	52
Figure 25 : Effet de l'Al sur la teneur en lipides totaux (µg) chez <i>S.cereviciae</i> . * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	53
Figure 26 : Effet du Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (µg) chez <i>S.cereviciae</i> . * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	54
Figure 27 : Effet de la mixture de concentrations d'Al/Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (µg) chez <i>S.cereviciae</i> . * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	55
Figure 28 : Effet des concentrations croissantes des sels d'Al sur le taux de protéines totales (µg) chez les paramécies.....	56
Figure 29 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur la teneur en protéines totales (µg) chez les paramécies. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	57
Figure 30 : Effet de la mixture de concentrations d'Al/Cr(VI) sur le taux de protéines totales (µg) chez les paramécies. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	58
Figure 31 : Effet des concentrations croissantes d'Al sur le taux de lipides totaux (µg) chez les paramécies.....	59
Figure 32 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (µg) chez les paramécies. * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	60
Figure 33 : Effet de la mixture Al/Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (µg) chez les paramécies.....	61
Figure 34 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par les sels d'Al (µmol/min/mg de Prot). * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	62
Figure 35 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par le Cr(VI) (µmol/min/mg de Prot). * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	63
Figure 36 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par la mixture Al/Cr(VI) (µmol/min/mg de Prot). * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative)	64
Figure 37 : Evolution du taux de Glutathion (GSH) chez les levures témoins et exposées aux sels d'Al (µmol/mg de Prot). * : P≤0,05 (significative), ** : P≤0,01 (très significative), *** : P≤0,001 (hautement significative) et **** : P<0.0001 (très hautement significative).....	65
Figure 38 : Teneur en Glutathion (GSH) chez les levures témoins et traitées par le Cr (IV) (µmol/mg de Prot).	66

Figure 39 : Effet de la mixture Al/Cr(VI) sur le taux de Glutathion (GSH) chez les levures ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de Prot).....	67
Figure 40 : Evolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes d'Al ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot).....	68
Figure 41 : Evolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes de C(IV) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	69
Figure 42 : Evolution de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les mélanges (Al/Cr(VI)) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	70
Figure 43 : Teneur en Malondialdéhyde (MDA) chez les levures témoins et traitées par les sels d'Al ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	71
Figure 44 : Evolution du taux de MDA chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes de Cr(VI) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)	72
Figure 45 : Evolution du taux de MDA chez les levures témoins et traitées avec les mélanges de concentrations d'Al/Cr ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)	73
Figure 46 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies témoins et en présence de concentrations croissantes d'Al ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot).	74
Figure 47 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies témoins et traitées avec les concentrations de Cr(VI) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	75
Figure 48 : Suivi de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies en présence des différentes mélanges Al/Cr(VI) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)	76
Figure 49 : Effet des sels d'Al sur le taux de Glutathion (GSH) chez les paramécies ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	77
Figure 50 : Effet du Cr(VI) sur la teneur en Glutathion (GSH) chez les paramécies ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	78
Figure 51 : Effet du mélange de concentrations Al/Cr(VI) sur le taux de Glutathion (GSH) chez les paramécies ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)	79
Figure 52 : Effet des concentrations croissantes d'Al sur le suivi de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les paramécies ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	80
Figure 53 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les paramécies ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	81

Figure 54 : Effet des mixtures d'Al/Cr(VI) sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	82
Figure 55 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes d'Al ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	83
Figure 56 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et exposées au Cr(VI) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	84
Figure 57 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et en présence de mixtures de Concentrations Al/Cr(VI) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	85
Figure 58 : Paramécie témoin observée par microscope optique après une fixation au Formol (4%) au Gr x20.....	88
Figure 59 : Trajectoires des paramécies témoins tracées par le logiciel Kinovea et indiquées en ligne bleue (Grx4).	91
Figure 60 : Suivi de la cinétique de croissance des levures exposées à la Trimetazidine, Prednisolone et aux Cyanures comparativement aux cellules témoins et celles traitées avec les sels d'Aluminium pendant 24heures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	95
Figure 61 : Suivi de la cinétique de croissance des levures exposées à la Trimetazidine, Prednisolone et aux Cyanures comparativement aux témoins et aux cellules traitées par le Cr(VI) pendant 24heures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	96
Figure 62 : Pourcentage de réponses de <i>S.cereviciae</i> traitées avec TMZ, PDN, KCN , Al et Cr(VI). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Domaine d'utilisation de métaux.....	4
Tableau 2 : Les types d'interactions possibles entre divers polluants.	11
Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du Sulfate d'Al et du Cr(VI).	21
Tableau 4 : <i>Caractéristiques des principales espèces de paramécies.</i>	23
Tableau 5 : Impact des sels d'Aluminium, du Chrome et de leur mélange sur les paramètres de croissance de <i>S.cereviciae</i> . * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	46
Tableau 6 : Impact des sels d'Aluminium, du Chrome et de leur mélange sur les paramètres de croissance des paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative).....	48
Tableau 7 : Valeurs des CI50 (μM) de l'Al et du Cr(VI) chez les levures et paramécies.	49

Tableau 8 : Vitesse de déplacement des paramécies témoins et traitées à l'Al, Cr(VI) et à la combinaison. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)..... 93

Liste des Planches

Planche 1: Observations microscopiques (Grx100) des levures témoins (A) et traitées aux sels d'Aluminium (B) : C1Al, (C) : C4Al ainsi qu'aux particules de Chrome (D) : C1Cr, (E) : C4Cr.....	86
Planche 2: Observations microscopiques (Gr x100) des levures exposées aux mélange Al/Cr (A) : C1Al/C1Cr, (B) :C1Al/C4Cr et (C) : C1Cr/C4Al.....	87
Planche 3: Paramécies exposées aux différentes concentrations d'Al (C1Al, C2Al, C3Al et C4Al) et au Cr (C1Cr, C2Cr, C3Cr et C4Cr) observées au microscope optique après une fixation au Formol (4%) (Grx20).....	89
Planche 4: Paramécies en présence de mixtures d'Al/Cr C1Al/C1Cr, C2Al/C2Cr, C3Al/C3Cr et C4Al/C4Cr observées au microscope optique (Grx20).....	90
Planche 5: Trajectoires des paramécies filmées au Grx4 et traitées par les plus fortes concentrations d'Al (C4 : A), du Cr(VI) (C4 : B) et de leurs mélanges (C4A/C4Cr : C) tracées en ligne bleue par le logiciel Kinovea.....	92

Liste des abréviations

TMZ : Trimetazidine

PDN : Prednisolone

KCN : Cyanide de potassium

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

CHAPITRE I : Introduction

Préambule

La présence des métaux lourds dans la nature est principalement attribuable au développement accru des activités humaines telles que l'industrie minière, l'agriculture intensive, les rejets industriels et les déchets urbains. Par conséquent, ces substances peuvent être absorbées et stockées par les organismes vivants présents dans les sols, les cours d'eau et les océans. Leur toxicité est donc préoccupante car, en s'accumulant dans les tissus biologiques, ces métaux peuvent entraîner diverses pathologies chez l'Homme et causer une détérioration de la qualité de l'environnement et de ses composants.

De nombreuses études ont rapporté les effets délétères des métaux, et précisent qu'il est essentiel de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle de la pollution par ces éléments afin de réduire les risques pour la santé humaine et surtout la santé environnementale. Cela inclut la réglementation des émissions industrielles, le traitement des eaux usées, la surveillance de la qualité de l'eau....etc.

Divers travaux ont constaté une dégradation de la biodiversité dans le cas où les eaux sont polluées par des concentrations importantes de métaux. Ainsi **Granum et al. (2005)** ont confirmé la présence de diverses altérations de la qualité du milieu ainsi que les populations qui l'occupent.

Par ailleurs, le potentiel toxique de ces molécules peut être plus ou moins intensifié lorsqu'ils sont mélangés, on parle alors de l'effet cocktail. Ce dernier fait référence à l'interaction complexe entre plusieurs substances chimiques présentes simultanément dans l'environnement ou à l'intérieur d'un organisme vivant, qui entrainera sans aucun doute des effets toxiques différents de ceux observés avec chaque substance prise individuellement.

En effet, l'Homme est exposé à une multitude de substances chimiques provenant de diverses sources telles que l'alimentation, l'air, l'eau, les produits de consommation....etc. Ces substances peuvent inclure des polluants industriels, des pesticides, des métaux lourds, des produits chimiques présents dans les plastiques et les produits d'hygiène, ainsi que d'autres contaminants environnementaux.

Pour mieux comprendre et évaluer l'effet cocktail, de nouvelles approches avancées en toxicologie sont nécessaires. Cela comprend des études combinées de plusieurs substances chimiques, ainsi que l'utilisation de données sur les mélanges chimiques réels auxquels les

CHAPITRE I : Introduction

individus sont exposés dans leur environnement quotidien. C'est pour cela qu'il est crucial d'avoir des réponses physiologiques, biochimiques, comportementales et structurales de ces organismes qui permettra alors de comprendre les différentes interactions entre les polluants auxquels ils sont exposés. Cette approche est essentielle et couramment employée dans le but d'évaluer d'une façon précise les altérations induites pour au final adopter des mesures de prévention et de gestion adéquates.

1. Notions sur les métaux lourds :

En toxicologie, les métaux sont définis comme étant des molécules à caractère cumulatif ayant essentiellement des effets très néfastes sur les organismes vivants (**Adli, 2016**), et leur nocivité est souvent liée à leur rémanence et à leur spéciation. Contrairement aux polluants organiques, les métaux lourds sont peu métabolisés, ils peuvent donc être transférés dans le réseau trophique et s'accumuler dans la matière vivante (**Benguedda-Rahhal, 2011**). Ainsi, grâce à leur stabilité moléculaire, les métaux lourds sont très connus par leur persistance, leur toxicité et leur pouvoir d'accumulation à travers la chaîne alimentaire (**Pérez-Rama et al., 2002**). De plus, ils sont transportés dans l'atmosphère et peuvent se déposer dans des régions éloignées du lieu d'émission (**Popescu et al., 1998**).

En général, ils sont considérés essentiels à la vie sous forme d'oligoéléments voir même indispensables à l'état de trace pour divers processus cellulaires vitaux et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques par ex : le zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn), cobalt (Co), nickel (Ni), fer (Fe) et sélénium (Se) (**Kabata-Pendias et al., 2001**). Cependant, à fortes concentrations, ils peuvent s'avérer toxiques. En effet certains métaux à savoir le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) sont potentiellement toxiques même en faibles quantités présentant un caractère polluant sans pour autant avoir un rôle biologique bénéfique connu (**Botonnet, 2000 ; Miquel, 2001**).

Par ailleurs, **Migeons (2009)** explique la théorie émise par **Pearson (1963)** qui permet de classer les métaux en fonction de leurs affinités et donc de leur capacité de liaison soit avec l'oxygène (Classe A) soit avec les ligands porteurs d'azote ou de soufre (classe B). Entre les deux types, on trouvera les métaux de classe intermédiaire qui présentent des caractéristiques propres aux deux classes. Cette distinction reflète davantage la facilité des métaux à traverser

les membranes cellulaires, à être stockés au sein de granules de détoxification ou à être complexés à des protéines fixatrices de métaux.

1.1. Propriétés et caractéristiques :

Les métaux lourds ont des propriétés physiques spécifiques à celles des métaux y compris la bonne conductivité thermique et électrique. Ces molécules sont très électropositives et donnent par perte d'électrons des cations métalliques de charge variable qui présentent à la fois des densités de charge élevées avec un caractère électrophile, ce dernier favorise la création de liaisons ioniques, covalentes et/ou intermédiaires avec les ligands cellulaires (**Belabed, 2010**).

1.2. Sources :

1.2.1) Sources naturelles :

L'activité volcanique ainsi que l'altération des continents et les incendies de forêts sont les sources naturelles les plus courantes. Il est à noter que la contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma (**Darmondrail et al., 2000**).

1.2.2) Sources anthropiques :

Les métaux issus des activités anthropiques sont présents sous formes chimiques assez réactives entraînent par conséquent des risques plus ou moins importants par rapport aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés en formes relativement inertes (**Mckenzie, 1997**).

En effet, La source anthropique englobe les activités pétrochimiques, l'utilisation de combustibles fossiles (ex : centrales électriques au charbon, chaudières, fours à ciment), les activités industrielles, le transport (ex : véhicules et moteurs routiers/non routiers, embarcations), l'incinération des déchets, les déchets urbains (ex : eaux usées, boues d'épuration, ordures ménagères) et agricole et certains produits (ex : interrupteurs électriques, amalgames dentaires, éclairages fluorescents) (**Gouin et al., 2016**).

1.3. Intérêt d'utilisation :

Grâce à leur caractéristiques spécifiques, les métaux lourds sont fréquemment utilisés dans les nouvelles technologies à savoir dans le domaine de la métallurgie et le secteur électronique. Et ce grâce à leur intégration aisée dans les aciers inoxydables, les matériaux du bâtiment, les munitions, les matériaux médicaux, la bijouterie ...etc (**Aranguren, 2008**). De plus, les produits chimiques utilisés en agriculture y compris les pesticides (fongicides, insecticides ou herbicides) peuvent également contenir des quantités de métaux toxiques comme Cu, Cd, Zn et Pb (**Compaoré et Nanéma, 2010**).

Selon **Galvez-Cloutier et al. (2005)** les principaux axes d'utilisation de métaux sont résumés dans le tableau (1) :

Tableau 1 : Domaine d'utilisation de métaux.

Métaux	Domaine d'utilisation
Cd, Pb, Zn, Hg	Appareils électriques
Ti, Cd, Hg, En, Pb, Ce, Al, Cu, Cr	Peinture
Pb, As, Cu, Sn, En, Mn	Biocides
Ni, Hg, Pb, Cd	Carburants
Cd, Sn	Matières plastiques
Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn	Engrais
Cr, Fe, Al	Textiles

1.4. Les métaux dans l'environnement :

L'utilisation des métaux ne cesse de s'accroître dans le secteur industriel bien qu'ils fassent partie des substances chimiques susceptibles de constituer un danger menaçant particulièrement l'écosystème aquatique (**Hlavay et al., 2001**). La contamination de ce dernier entraîne un effet non seulement sur l'équilibre écologique de l'environnement, mais aussi sur la diversité des organismes aquatiques (**Guedenon et al., 2011**).

Cette problématique est abordée par diverses études qui ont rapporté une diminution de la productivité et de la biodiversité particulièrement aux plus fortes concentrations. (**Granum et al., 2005**)

Les métaux présents dans les eaux et sédiments sont absorbés par les plantes et les animaux aquatiques. Cependant, au-delà de certaines concentrations, ces composés pourraient altérer la survie des populations biologiques ou provoquer leur accumulation et leur transport d'un organisme à un autre de la chaîne trophique (**Benguedda-rahhal, 2012**). De plus, leur transport varie selon les caractéristiques physiques et chimiques du milieu naturel, les indicateurs biologiques, la nature et le degré de contamination. (**Allen, 1996 ; Benguedda-Rahhal, 2011**)

La plupart des métaux considérés comme toxiques au niveau environnemental sont ceux qui appartiennent au groupe intermédiaire "B" car ils forment des complexes inorganiques dans les solutions salines. Ces molécules sont hautement lipophiles et peuvent ainsi traverser facilement les membranes cellulaires. De plus, elles sont persistantes et sont classées parmi les substances les plus dangereuses (**Simkiss, 1983**). De ce fait, le potentiel toxique d'un métal dépend de sa spéciation c'est-à-dire sa forme chimique, autant que des facteurs environnementaux (**Babich, 1980**).

1.5. Impact des métaux sur la santé humaine :

Les métaux lourds peuvent s'accumuler dans l'organisme et particulièrement au niveau des reins. En fait, chaque type de métal possède des effets spécifiques sur la santé humaine. Néanmoins, les symptômes de la toxicité apparaissent en cas d'absorption ou de contact avec

de fortes concentrations en métaux ou de concentrations plus faibles à long terme (**Squinazi, 2020**).

En effet, c'est au cours de leur métabolisation que ces molécules peuvent se transformer et devenir potentiellement dangereuses pour la santé humaine en provoquant des effets perturbateurs sur divers fonctions vitales (**Kalia et al., 2005**)

La plupart des données disponibles sur la toxicité des métaux lourds proviennent d'études de cas d'intoxications collectives aiguë ou professionnelles. Ainsi, très peu de cas confirment la responsabilité de la pollution dans l'accroissement de la mortalité. (**Fekih et al., 1990 ; Gourari, 1991**).

2. Rappels sur la toxicité de l'Aluminium et du Chrome :

2.1. Cas de l'Aluminium :

L'aluminium est un métal léger qui se trouve naturellement dans l'écorce terrestre où son extraction et son traitement permettent d'élever son niveau dans l'environnement (**Agency for Toxic Substances and Disease Registry., 2008**). Ainsi, il est présent également dans plusieurs produits à usage fréquent et journalier notamment dans les boites de conserve, les vaccins, les produits de cosmétique, les jouets, la vaisselle, ...etc. Sa toxicité potentielle pour la santé humaine et environnementale suscite des préoccupations croissantes chez la communauté scientifique (**Bryliński et al., 2023**).

Les travaux de **Barabasz et al. (2002)** et **Batisse (2014)** ont révélé que l'aluminium peut présenter une menace majeure pour les organismes vivants. De plus, de nombreux facteurs, dont le pH de l'eau et la teneur en matière organique, influencent grandement sa toxicité, car l'absorption de l'Al est optimale dans le cas où le pH est acide, ce qui explique sa forte toxicité en milieu acide (**Jeffrey 1996 ; Boudjellal, 2022**).

De plus, il s'est avéré que la toxicité de l'aluminium résulte probablement de son interaction avec la membrane plasmique, les cibles apoplastiques et symplastiques (**Kochian et al., 2005**). Chez l'homme, Mg^{2+} et Fe^{3+} sont remplacés par Al^{3+} , ce qui provoque de nombreuses perturbations associées à la communication intercellulaire, à la croissance cellulaire et aux fonctions sécrétoires. Ainsi, les altérations manifestées au niveau des neurones sont similaires aux lésions dégénératives observées chez les patients atteints de la maladie

CHAPITRE I : Introduction

d'Alzheimer (**Mirza et al., 2017**). De ce fait, les plus grandes complications de la toxicité de l'aluminium sont les effets neurotoxiques tels que l'atrophie neuronale dans le locus ceruleus, la substantia nigra et le striatum (**Filiz et Meral, 2007**). Ces effets sont corroborés par **Yokel et McNamara (2001)**.

Dans l'eau potable la concentration maximale admissible de l'Al est de l'ordre de 0.2mg/l, la FDA (Food and Drug Administration) a proposé de limiter la concentration en aluminium dans les solutés destinés à la nutrition parentérale à 25µg/l (**FDA, 2002**).

L'ingestion répétée peut causer une carence en phosphate pouvant entraîner l'affaiblissement des os. L'étude menée par **Exley et al. (2013)** a révélé une corrélation entre l'aluminium dans l'eau potable et une diminution de la densité minérale osseuse chez les femmes. *In vivo*, ce métal favorise des échanges de chromatides soeurs, des anomalies chromosomiques, et la formation de micro-noyaux dans les globules blancs humains. Par ailleurs, diverses données toxicologiques sont utilisées afin de caractériser le danger et retenir les valeurs toxicologiques nécessaires à l'évaluation du risque. Ainsi la valeur toxicologique systémique de référence pour les effets sur la santé est de l'ordre de 0,3 µg Al/kg pc/j.(Figure 1)

Des études de cancérogénèse suggèrent une relation probable entre le cancer du sein et les antitranspirants à base de sels d'Aluminium (**Sonthonnax, 2014**).

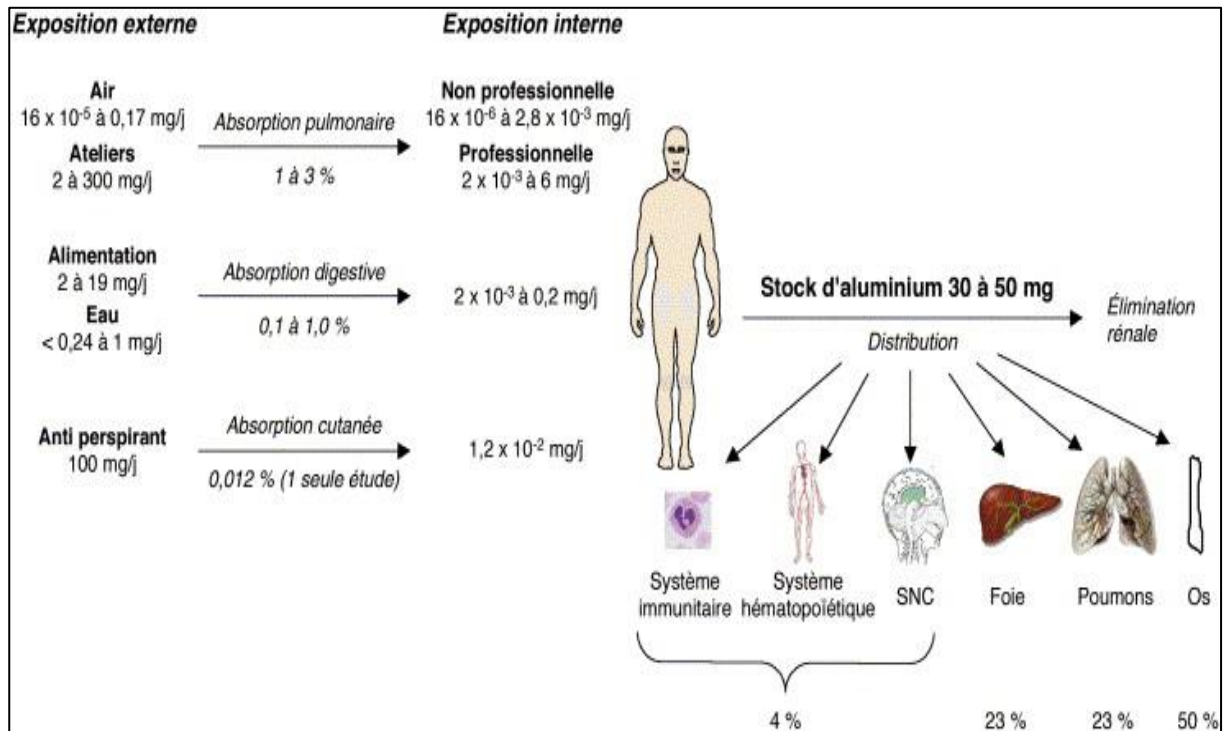


Figure 1 : Absorption et distribution de l'Aluminium dans l'organisme. (Gourier *et* Fréry, 2004)

A l'échelle environnementale, il est connu depuis très longtemps que l'Al est considéré comme un agent toxique pour les organismes aquatiques d'eau douce surtout en cas de fortes concentrations et ce grâce à sa dissolution dans l'eau qui va créer, en conséquences, des composés bio-disponibles (Rahimzadeh *et al.*, 2022). En milieu aquatique, Il agit sur les animaux branchiaux notamment les poissons et les invertébrés, en induisant une perte d'ions plasmatiques et hémolymphtiques provoquant ainsi un déséquilibre osmorégulateur tout en gardant sa capacité à se bio-accumuler. Alors que chez le poisson, la forme monomère et inorganique de l'Al peut réduire les activités enzymatiques importantes. L'aluminium semble également s'accumuler dans les invertébrés d'eau douce et peut agir en synergie avec n'importe quel autre polluant (Rosseland *et al.*, 1990).

2.2. Toxicité du Chrome :

Selon Hoet (2015), le chrome est un métal qui peut exister dans différents états d'oxydation :

CHAPITRE I : Introduction

- Le Chrome métallique [Cr (0)] : ne se trouve pas naturellement dans l'environnement mais est d'origine humaine.
- Les Chrome trivalents [Cr (III)] : sont très stables et se trouvent naturellement dans des minerais, tels que la chromite, il est également considéré comme oligo-élément essentiel en nutrition humaine à faibles doses.
- Le Chromer hexa-valent [Cr (VI)] : deuxième état le plus stable, se trouve rarement de façon naturelle dans l'environnement et représente la forme la plus toxique du chrome.

La population générale est exposée au chrome via l'alimentation ou les suppléments alimentaires, l'eau potable et l'inhalation de l'air ambiant contenant du chrome. En effet, le chrome hexavalent est un cancérigène potentiel, principalement connu pour son implication dans le cancer du poumon. Il peut être inhalé lors de processus industriels tels que la soudure, le chromage, le revêtement de métaux et l'utilisation de certains produits chimiques. L'exposition cutanée au chrome hexavalent peut également se produire, en particulier chez les travailleurs manipulant des produits contenant du chrome (**Anselmetti, 2017**).

Plusieurs études ont montré que l'exposition prolongée au chrome hexavalent peut provoquer des effets toxiques notamment des lésions pulmonaires, des irritations cutanées, des allergies, des ulcères, des perforations du septum nasal et des dommages au foie et aux reins. De plus, le chrome hexavalent est associé à des effets mutagènes et génotoxiques. Ainsi, le Chrome trivalent formé à partir du Chrome hexavalent peut réagir avec les macromolécules telles que les protéines et lipides induisant ainsi une cytotoxicité et une génération de ROS conduisant par conséquent à une apoptose cellulaire (**Anses, 2010**).

Les effets toxiques du chrome dépendent de sa forme chimique, la voie de son exposition et sa dose et les réglementations des expositions professionnelles visent toujours à réduire les risques du Cr sur la santé. (**Chiffolleau, 2001**)

De plus, la fréquence de son émission dans la nature continue à s'accroître au fil des années (Figure 2). Sa forte hydro-solubilité explique sa mobilité au sein des écosystèmes où la contamination par le Cr hexavalent, forme la plus toxique, pourrait s'élargir touchant ainsi divers niveaux trophiques. En effet, ce composé pourrait agir sur la faune aquatique à des concentrations plus ou moins élevées. Ce métal peut inhiber la croissance du phytoplancton d'eau douce à une concentration de 10 µg•L⁻¹. Cependant, il est connu comme étant peu toxique dans les eaux salées. (**Afri-Mehennaoui et al., 2009 ; Ben Khelil et al., 2012**)

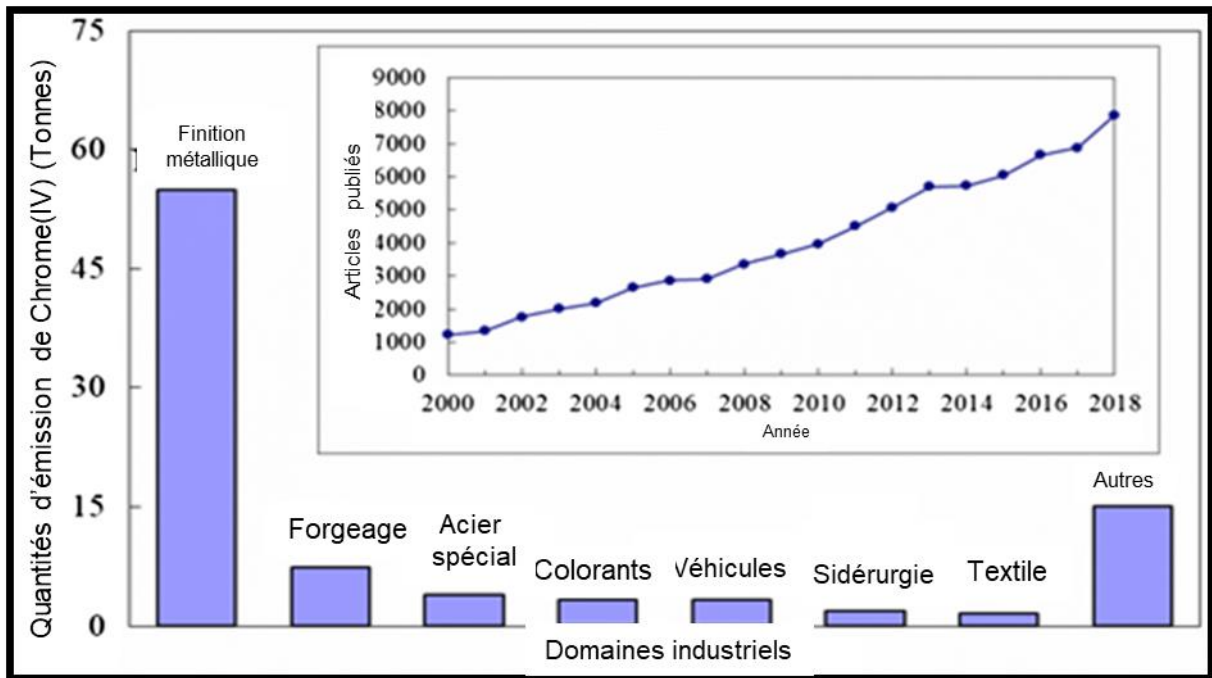


Figure 2 : Quantités (tonnes) et sources d'émission du Chrome Hexavalent. (Xia *et al.*, 2020)

3. Effet des mélanges toxiques (effet cocktail) :

Le terme Cocktail fait référence à un mélange de plusieurs molécules telles que les métaux présents simultanément dans un environnement ou au sein d'un organisme vivant. Ces métaux peuvent provenir de diverses sources telles que l'industrie, l'agriculture, les déchets, ou encore la pollution atmosphérique. Cette exposition peut se produire dans des contextes variés tels que l'eau potable, les aliments, l'air ambiant ou les lieux de travail (Rouimi, 2016).

En effet, l'exposition à un cocktail de métaux peut entraîner des effets toxiques différents de ceux observés avec chaque métal pris individuellement. Les métaux peuvent interagir entre eux, modifiant ainsi leurs propriétés chimiques, leur biodisponibilité, leur métabolisme et leurs effets toxiques. Ces interactions peuvent conduire à des effets additifs, synergiques ou antagonistes, augmentant ou diminuant l'effet toxique global du mélange (Ribera *et al.*, 2011) (Tableau 2).

Tableau 2 : Les types d'interactions possibles entre divers polluants.

Types d'interactions		
<p>Interaction Supra-additivité :</p> <p style="text-align: center;">Synergie Effet combiné est plus important.</p> <p style="text-align: center;">Potentialisation Effet d'un composé augmente celui de l'autre.</p> <p style="text-align: center;">Coalition Toxicité dans le cas du mélange uniquement.</p>	<p>Interaction Sub-additivité :</p> <p style="text-align: center;">Antagonisme Effet du mélange est moins important.</p> <p style="text-align: center;">Inhibition Effet d'un composé est réduit par l'autre.</p> <p style="text-align: center;">Sans influence apparente Absence d'effet des composés seuls ou mélangés.</p>	<p>Pas d'interaction :</p> <p style="text-align: center;">Additivité Effet d'un mélange correspond à sa toxicité attendue en se référant aux concentrations et aux actions indépendantes.</p>

Certains métaux tels que le plomb, le mercure, cadmium, l'arsenic et le chrome sont connus pour leur toxicité intrinsèque. Cependant, lorsque ces métaux sont présents en mélange avec d'autres, ils peuvent avoir des effets toxiques plus prononcés rendant ainsi la recherche sur les mixtures métalliques un domaine très actif et d'actualité en toxicologie environnementale.

En effet, la toxicité des cocktails de métaux dépend de nombreux facteurs, tels que les concentrations relatives de chaque métal, la durée et la voie d'exposition, ainsi que les caractéristiques individuelles de l'organisme exposé. Par conséquent, il est essentiel de mener des études approfondies et spécifiques pour évaluer les risques liés à l'exposition à des cocktails de métaux dans des situations particulières. (Drakvik *et al.*, 2020)

4. Stress oxydant et cibles cellulaires des toxiques :

Les stress oxydatif est défini comme étant un état de déséquilibre de l'homéostasie entre la production des substances prooxydantes (radicaux libres, ERO) et la capacité de défense des antioxydants en faveur des prooxydants (Boulassel, 2013). Il est nécessaire de préciser que

CHAPITRE I : Introduction

cette homéostasie de l'état Rédox peut être rompue, soit par une production excessive d'ERO, soit par une diminution des capacités antioxydantes de l'organisme (**Migdal et Serres , 2011**).

Dans le cas d'une agression cellulaire, la mitochondrie, siège de la respiration cellulaire, peut se détourner de son rôle physiologique indispensable qui est synthèse de l'ATP vers une génération d'un stress oxydatif qui peut causer ainsi une mort cellulaire (**Bo, 2009**).

Par conséquence, les structures, organites et macromolécules cellulaires (Protéines, Lipides, ADN, Sucres) sont reconnues comme cibles cellulaires du stress oxydatif induit par divers substances toxiques qui varient en fonction de la nature spécifique de ces substances ainsi de leurs mécanismes d'action. Citons quelques cibles privilégiées des métaux :

- **Les protéines et enzymes** : les métaux peuvent interagir avec les protéines et les enzymes entraînant, par conséquence, des altérations de leur structure, de leur fonction et de leur activité. Par exemple, le mercure peut se lier aux groupes sulfhydryles des protéines conduisant à la perturbation de leur activité normale (**Valko et al., 2006**).

- **La mitochondrie** : est une cible cellulaire importante pour de nombreuses substances toxiques. En raison de son rôle essentiel dans la production d'énergie cellulaire, la mitochondrie est sensible aux perturbations causées par certains métaux, ce qui peut causer des dysfonctionnements et des effets néfastes sur la cellule (**Yin et al., 2014**).

En effet, la mitochondrie peut être affectée par différents types de xénobiotiques, notamment les agents chimiques, les métaux lourds, les pesticides, les médicaments, les toxines environnementales...etc. La perturbation de la fonction mitochondriale peut avoir de multiples conséquences, telles que la production accrue de radicaux libres, la diminution de la production d'ATP, des altérations de la perméabilité membranaire parallèlement à des dysfonctionnements du métabolisme énergétique.

5. Utilisation d'organismes alternatifs :

L'utilisation d'organismes alternatifs en toxicologie, tels que les modèles cellulaires, est une approche courante pour évaluer les effets toxiques des substances chimiques. Ces organismes offrent des alternatives aux tests sur les animaux, permettant ainsi de réduire le recours à l'expérimentation animale tout en fournissant des informations pertinentes sur la toxicité des substances.

Hartung et al. (2009) a mis l'accent sur les modèles *in vitro* et les méthodes basées sur des organismes non humains et souligne l'importance de l'utilisation de ces approches pour remplacer ou réduire l'utilisation des animaux dans les études de toxicité ou encore **Leist et al. (2014)** et **Rovida et al. (2015)** qui recommandent une transition vers des méthodes plus prédictives et pertinentes pour l'évaluation de la toxicité.

L'utilisation des protistes ciliés d'eau douce (*Paramecium sp*) et des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) comme modèles alternatifs offre une multitude d'avantages dans les études de cytotoxicité.

5.1. *Saccharomyces cerevisiae* :

Les levures sont les premiers microorganismes eucaryotes qui ont été utilisés et séquencés par l'Homme (**Goffeau, 1996 ; Bertazzi, 2012**). C'est un champignon immobile de forme sphérique, ovoïde ou arrondies de taille variable de 3 à 14µm comportant une phase unicellulaire au cours de son développement, une phase unicellulaire (**Leyral et Vierling, 2007**). Il est doté d'une paroi cellulaire rigide entourant une membrane plasmique, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites dont les mitochondries et une grande vacuole (**Thuriaux, 2004**). En effet, il existe environ 80 genres de levures avec approximativement 600 espèces connues. Appartenant majoritairement à trois classes : les Champignons, les Ascomycètes et les Basidiomycètes où *S.cerevisiae* est considéré comme étant la cellule la plus proche des espèces supérieures grâce à son caractère diploïde. (Figure 3)

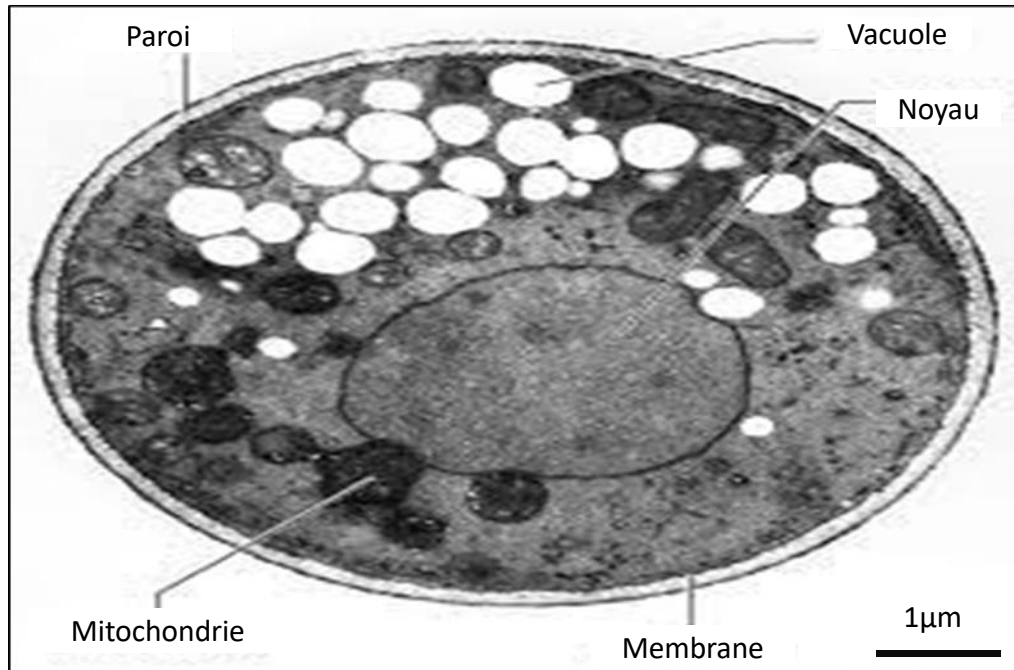


Figure 3 Structure d'une levure.

Concernant son cycle de vie, **Herskowitz (1988)** affirme qu'il existe deux modes de reproduction de *S.cerevisiae*. L'un correspond à la prolifération cellulaire ou bourgeonnement : un processus par lequel une cellule donne naissance à une autre cellule identique. Et l'autre est la reproduction sexuée c'est-à-dire la transition de la ploïdie au cours du cycle cellulaire. Au cours de cette phase, les cellules haploïdes de sexe opposé se conjuguent pour former des cellules diploïdes. Tandis que les cellules diploïdes sporulent pour former des cellules haploïdes. Ces phénomènes dépendent fortement des conditions environnementales externes. En fait, les cellules haploïdes et diploïdes débutant la phase G1 appelée "pré-Start". Si la quantité de nutriments est suffisante, elles peuvent poursuivre leur cycle cellulaire mitotique (reproduction asexuée). Cependant, dans le cas où la quantité de nutriments est limitée en glucose, les cellules haploïdes entrent directement alors en mode de conjugaison sexuelle (reproduction sexuée) et les cellules diploïdes déclenchent un mode de sporulation.

Depuis très longtemps, l'Homme utilise la levure dans l'industrie alimentaire notamment dans la fabrication de différents aliments qu'en industrie pharmaco chimique (**Vargas et al., 2010 ; Kocharin, 2013 ; Accituno, 2013**). Alors que dans la nature, *S. cerevisiae* est présente sur la peau des fruits et insectes, chez l'homme comme commensal ou pathogène, dans le sol, sur diverses plantes et sur les chênes (**Goddard et al., 2015**). De plus, elle est utilisée en Toxicologie et en Ecotoxicologie comme un modèle alternatif où elle offre le privilège à

CHAPITRE I : Introduction

détecter avec précision les différentes altérations biologiques suite à l'exposition à n'importe quels polluants (Iwahashi *et al.*, 2000 ; Tomaska, 2000). Elle est considérée idéale comme modèle biologique du fait de sa complexité génétique intermédiaire entre les organismes eucaryotes et procaryotes (Lin *et al.*, 2014).

Leur utilisation est souvent choisie en termes de bio surveillance environnementale du fait de leur résistance aux conditions défavorables. Selon Simon (2011) les levures sont capables à s'adapter aux conditions environnementales. Ainsi, elles sont tolérantes à toute une gamme de température allant de 0° jusqu'à 55°C, à l'alcool (20%) et aux variations de pH où le pH optimale à leur croissance est noté à une valeur entre 2.8 et 8. De plus, ces cellules sont fortement résistantes à la dessiccation et peuvent s'adapter vis-à-vis de la pression osmotique c'est-à-dire qu'elles peuvent proliférer en présence d'une concentration de 3M de sucre.

D'où s'inscrit le choix porté sur ce modèle cellulaire pour de multiples raisons à savoir :

- La facilité de leur culture cellulaire ainsi que son moindre cout.
- L'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles permettent à ces eucaryotes à être étudié aussi facilement que des procaryotes.
- Leur capacité à s'adapter et à résister aux conditions défaiillantes. Ces cellules peuvent très bien survivre dans des conditions anaérobies permettant ainsi de de réaliser des tests non réalisables avec d'autres organismes supérieurs (Marlene, 2006).
- Ces organismes possèdent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* en a 16) (Larpent, 1990).

5.2. *Paramecium sp* :

La paramécie est un micro-organisme unicellulaire du groupe des protozoaires qui vit généralement dans les eaux douces stagnantes : ce sont des organismes libres (non parasites) vivant dans les étangs d'eau douce, des ruisseaux et des rivières à travers le monde. Cette cellule mesure environ 150 µm de long et 50 µm de large où sa taille varie considérablement selon l'approvisionnement alimentaire et le stade du cycle de vie (Azzouz, 2012).

La paramécie polarisée et asymétrique présente de nombreux organites différenciés ayant des fonctions très spécialisées, le goulet de phagocytose permet l'ingestion des bactéries alors

CHAPITRE I : Introduction

que le cytoprocte sert nécessairement à l'expulsion des déchets et les vacuoles pulsatiles servant à réguler l'osmolarité (Figure 4). De plus, une des plus grandes caractéristiques de la paramécie est la présence de milliers de cils vibratoires sur toute sa surface permettant la locomotion et la nutrition. Cet organisme possède également une voie de sécrétion régulée, une voie d'exocytose, des trichocystes, un moyen de défense contre ses prédateurs, ainsi qu'un cortex complexe (**Damaj, 2012**).

La locomotion des paramécies est assurée par de nombreux cils contractiles (environ 25000 cils) ; leurs battements permet le déplacement en avant ou en arrière ou également effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle (**Beaumont et cassier, 1997**).

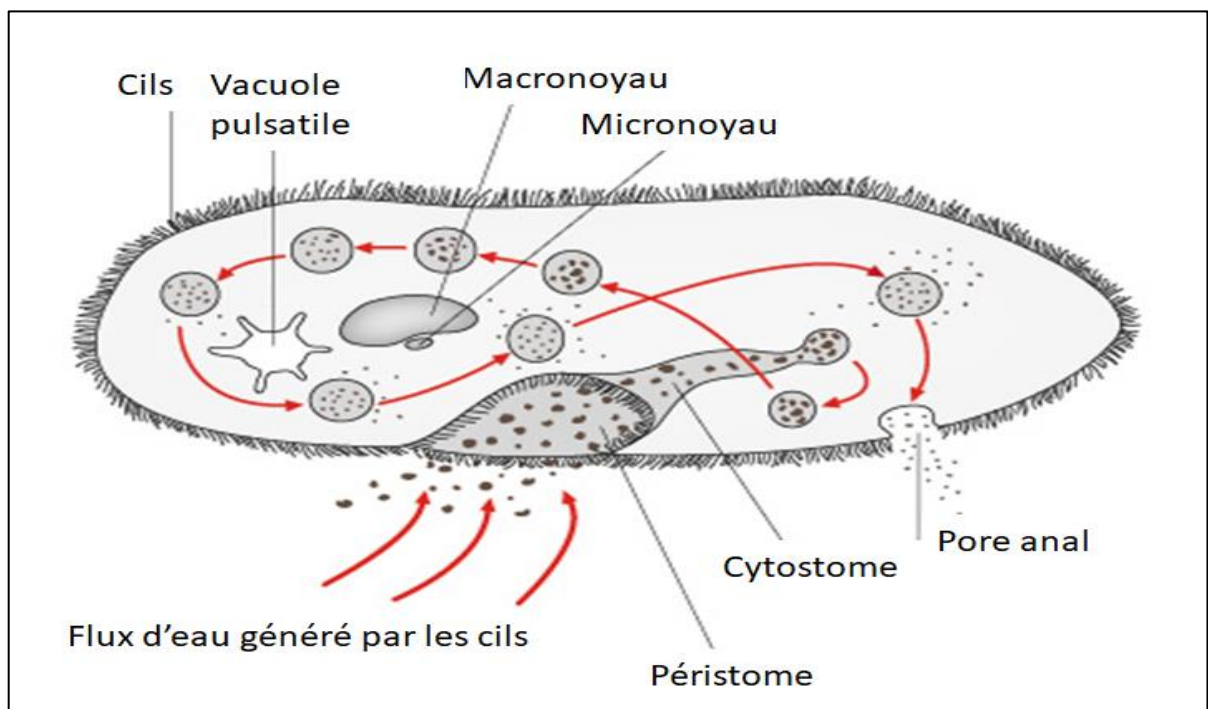


Figure 4 : Structure d'une paramécie.

Cette espèce s'avère adaptée aux bios essais en Toxicologie en raison de :

- Son taxon est présent, abondant et facilement identifiable.
- La possession d'un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème aquatique.
- Une culture facile en laboratoire et une manipulation rapide (cycle de vie court) réalisées à moindre coût. (**Beal et Anderson, 1993 ; Kamola, 1995**)
- La sensibilité aisée et confirmée quel que soit le produit testé.

CHAPITRE I : Introduction

- La possession de cils contractiles identiques à celles des cellules épithéliales des mammifères assurant sa mobilité. (Gräf *et al.*, 1999)
- Le fait que les battements ciliaires chez les mammifères soient parfaitement comparables à ceux des paramécies (prouvés par les études de microcinématographie à haute vitesse) (Berrebbah, 1990)
- La paramécie est considérée comme un modèle idéal pour analyser divers phénomènes biologiques, toxicologiques et éco-toxicologiques grâce à son organisation, son fonctionnement et sa complexité structurale (Meyer *et al.*, 2005 ; Bouaricha *et al.*, 2012 ; Shaikh *et al.*, 2022).

6) Objectifs :

L'objectif principal de ce travail concerne l'évaluation de la toxicité potentielle de deux métaux : l'Aluminium, le Chrome et leur mixture (Al/Cr) sur deux modèles alternatifs unicellulaires *Paramecium sp* et *Saccharomyces cerevisiae*. Pour cela nous avons ciblé :

- La cinétique de croissance cellulaire qui est l'une des approches physiologiques les plus employées dans le but de fournir, d'une manière globale et en amont, des informations sur l'impact d'un xénobiotique vis-à-vis d'un organisme vivant. Car toute perturbation du cycle de croissance des micro-organismes représente le premier signe précoce d'une toxicité potentielle.
(Vasseur, 2021).
- L'évaluation des valeurs sélectives (Fitness), un outil fondamental qui permet de détecter et de comprendre les mécanismes d'action des toxiques. Ainsi nous avons suivi l'évolution des bio-marqueurs du stress oxydatif induit par des concentrations croissantes d'Al, du Cr et de leur combinaison Al/Cr tels que la CAT, GST, GSH et MDA.
- Les battements ciliaires et le mouvement cellulaire (trajectoire et vitesse de déplacement) sont des biomarqueurs de toxicité et les variations de fréquence des battements ciliaires sont une indication très sensible des perturbations de l'homéostasie cellulaire, d'où notre intérêt pour ces paramètres.
- D'un autre côté, l'utilisation d'inhibiteurs mitochondriaux nous permet de confirmer l'implication de cet organelle cellulaire dans la génération du stress oxydant.

CHAPITRE II :
Matériel et méthodes

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

Les essais et expérimentations réalisés dans ce travail sont effectués au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, Université de Annaba.

1. Matériel biologique :

Comme bioindicateur de cytotoxicité, nous avons choisis deux modèles alternatifs à savoir : la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et la paramécie (*Paramecium sp*),

1.1. Les levures :

Ces cellules présentées dans la Figure 5 possèdent la classification décrite par **Larpent (2012)** :

- Domaine : Eucaryotes
- Règne : Fungi
- Embranchement : Mycètes
- Division : Ascomycota
- Sous-division : Saccharomycotina
- Classe : Saccharomycetes
- Ordre : Saccharomycétale
- Famille : Saccharomycetaceae
- Genre : *Saccharomyces*
- Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*

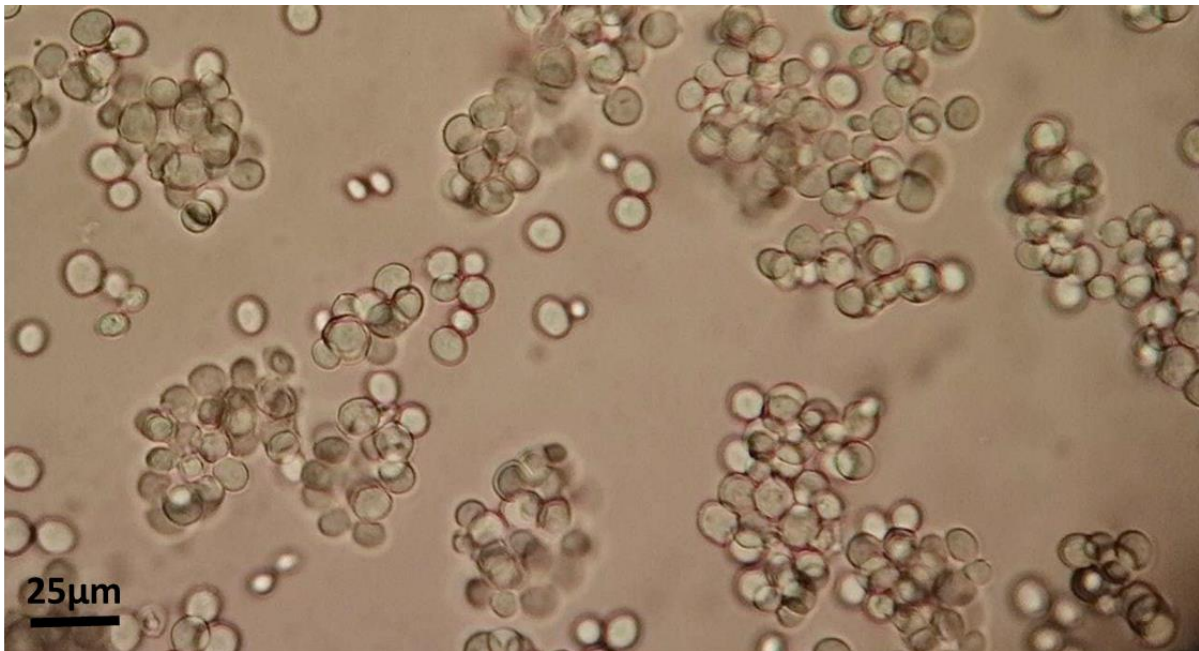


Figure 5 : Observation microscopique d'une culture de levures *Saccharomyces cerevisiae* (Grx10).

1.2. Les paramécies :

Les protistes ciliés observés dans la Figure 6 sont classifiés par **Corliss et al. (1961)** :

- Domaine : Eucaryotes
- Division : Alveolata
- Embranchement : Ciliophora
- Classe : Oligohymenophorea
- Ordre : Peniculida
- Famille : Parameciidae
- Genre : Paramecium
- Espèce : *Paramecium sp*



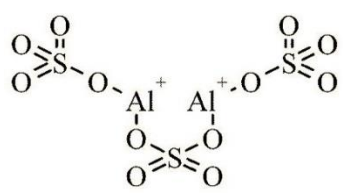
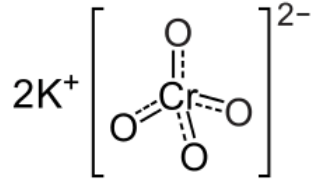
Figure 6 Observation microscopique d'une paramécie *Paramecium sp* fixée au Lugol (Gr x20).

2. Matériel chimique :

Nous avons étudié l'effet du Sulfate d'Aluminium, le Chromate de potassium et de leur mixture à différentes concentrations. Ces dernières ont été sélectionnées d'après la littérature (**Zaoui *et al.*, 2011**) et après avoir réalisé divers essais préliminaires.

Il est nécessaire de noter que le sulfate d'Aluminium utilisé est fourni par BIOCHEM Chemopharma. Quant au Chromate de potassium, il est obtenu par SIGMA-ALDRICH. Ainsi, les deux molécules sont hydrosolubles et possèdent les propriétés décrites dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du Sulfate d'Al et du Cr(VI).

Formule D'Al	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 	Formule Du Cr	K_2CrO_4 
Etat physique	Solide	Etat physique	Solide
Solubilité	360.364 g/l à 20°C	Solubilité	63g/100ml à 20°C
Masse molaire	342.15g/mol	Masse molaire	194.2g/mol
Point de fusion	Décomposition à 770°C	Point de fusion	Décomposition à 975°C
Densité	2.71	Densité	2.73

Le Cyanide de potassium (KCN) provient de SIGMA-ALDRICH, la Trimetazidine (TMZ) et la Prednisolone (PDN) proviennent de BIOGALENIC.

3. Méthodes :

3.1. Culture des cellules :

3.1.1. Culture de levures :

Saccharomyces cerevisiae subit tout d'abord un lavage à l'eau physiologique avant chaque manipulation afin d'éliminer toutes traces de substrats non désirés, et ce selon les étapes suivantes :

- Diluer 5g de levure boulangère dans 100ml de NaCl à 0,9%
- Agiter la suspension pendant 15min
- Centrifuger la suspension 3 fois pendant 5min à 3000Tours
- Eliminer le surnageant après chaque centrifugation

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

En suite prendre le dernier culot qui représente la fraction brute (F9) des levures *Saccharomyces cerevisiae* et le mettre dans le milieu de culture décrit par **Pol (1996)** et adapté par **Cherait (2015)**. Ainsi, Afin d'obtenir une croissance cellulaire optimale, il est nécessaire de fournir une source d'oxygène, ajuster le pH à 6.2 et maintenir une température ambiante ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) aux cellules pendant deux heures de temps.

3.1.2. Culture de paramécies :

En premier lieu, nous avons réalisé une culture mixte constituée principalement de foin et d'eau de pluie. La préparation est laissée incuber dans un endroit tiède et sombre. Au bout de 5 à 7 jours, un voile bactérien est formé à la surface représentant un signe d'apparition des premiers protistes ciliés. L'observation microscopique révèle l'apparition de plusieurs souches de paramécies à divers tailles et formes. Ainsi, nous avons réalisé divers isolements dans des tubes ependorfs afin de maintenir un seul type de cellule. Les paramécies isolées sont donc cultivées dans le milieu décrit par **Azzouz (2012)** où le pH est maintenu à 6,5 et la température d'incubation à 28°C . Tous les trois jours, un repiquage est réalisé afin de garder une culture pure et jeune.

Après avoir maintenu une seule souche de paramécies, nous avons tenté de l'identifier à l'aide des techniques de colorations et observations microscopiques. Pour cela, nous avons effectué divers colorations au vert de méthyle dans le but de colorer le macro et micro-noyau (organites essentielles à leur distinction) puis nous nous sommes référées aux caractéristiques des paramécies décrit par les plus anciens auteurs : **Wenrich (1928)** et **Wichterman (1953)** (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques des principales espèces de paramécies.

Espèce	Nombre de micro-noyaux	Forme de micro-noyaux	Taille de cellule
<i>P.caudatum</i>	1	Elliptique	290 microns
<i>P.aurelia</i>	2	Sphérique	170 microns
<i>P.bursaria</i>	1	Elliptique	150 microns
<i>P.multimicronucleata</i>	3-4	Sphérique	310 microns
<i>P.trichium</i>	1	Elliptique	70 microns
<i>P.calkinsi</i>	1-2	Sphérique	/
<i>P.polycarium</i>	4	Sphérique	/
<i>P.woodruffi</i>	3-4	Sphérique	210 microns
<i>P.pseudotrichium</i>	2-4	Sphérique	/
<i>P.africanum</i>	4-9	Sphérique	/
<i>P.jankowski</i>	2	Sphérique	/
<i>P.augandae</i>	1-2	Sphérique	/

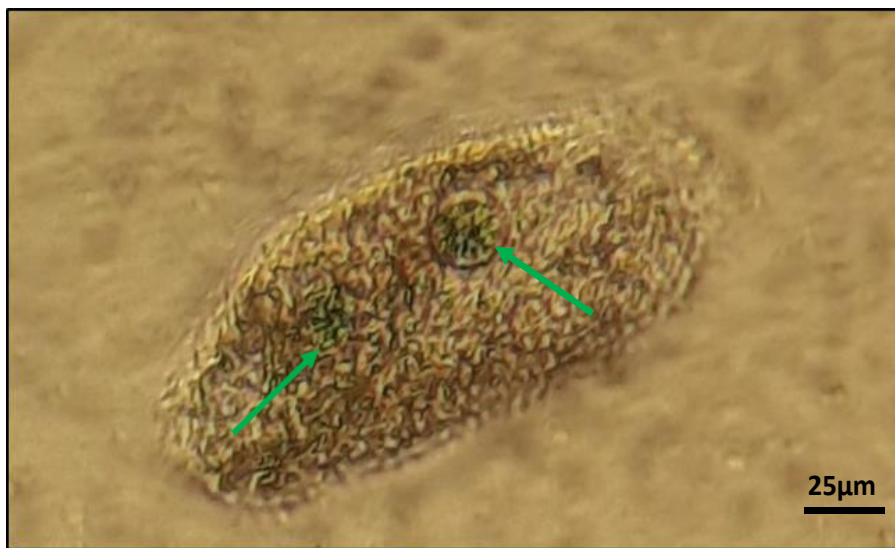


Figure 7 : Observation microscopique de paramécie colorée au vert de méthyle (Gr x20)

(→ Micro-noyau)

Après avoir bien analysé la structure des cellules, il s'est avéré que l'espèce de paramécie obtenue est celle de *Paramecium aurelia* possédant deux micro-noyaux sphériques (Figure 7) et mesure environ 160 μm (Kahl, 1935 ; Kohen, 2007 ; Benbouzid, 2012).

3.2. Etude physiologique

3.2.1. Cinétique de croissance des cellules :

3.2.1.1. Cas des levures :

Les concentrations choisies sont : 50µM, 100µM, 1mM, 25mM pour les deux métaux (Aluminium Al, Chrome Cr) et 50µM Al/50µM Cr, 100µM Al/100µM Cr, 50µM Al/25mM Cr, 50µM Cr /25mM Al pour leur mixture. Après la phase exponentielle c'est-à-dire après 2heurs d'oxygénation, chaque aliquote de 50ml est exposé aux concentrations précédemment citées. Ainsi, les conditions optimales sont maintenues pour les cellules témoins et traitées durant 24heures de traitement.

La croissance cellulaire est suivie par la spectrophotométrie à la longueur d'onde 660nm, et ce après 24heures d'exposition aux xénobiotiques.

3.2.1.2. Cas des paramécies :

Le traitement des paramécies avec les métaux et leur combinaison est effectué ainsi : une culture de 10µl de paramécies est ajoutée au différents aliquotes. Les concentrations retenues sont : 5µM, 10µM, 50 et 100µM pour les deux métaux séparés et 5µM Al/5µM Cr, 10µM Al/10µM Cr, 50µM Al/50µM Cr et 100µM Al /100µM Cr pour leur mixture.

Le suivi de la cinétique de croissance est effectué par le comptage journalier des paramécies dès la mise en contact avec le xénobiotique (T=0) jusqu'au 7ème jour (T=96h). Ce comptage est réalisé par le dénombrement des paramécies sous microscope optique (Motic BA400) au grossissement x10 après fixation au Lugol et à l'aide d'un compteur manuel.

3.2.2. Pourcentage de réponse :

C'est un paramètre qui renseigne sur l'effet d'un xénobiotique vis-à-vis d'un modèle biologique. Si le pourcentage de réponse est positif, il s'agit d'une inhibition de croissance, or s'il est négatif il s'agit alors d'une stimulation de croissance. (Wong *et al.*, 1999)

Il est calculé à l'aide de la formule de ci-dessous :

$$\% \text{ de réponse} = \frac{(N_t - N_c)}{N_t} * 100$$

Où N_t représente le nombre de cellules témoins alors que N_c désigne le nombre de cellules traitées au temps désiré

3.2.3. Calcul des paramètres de croissance :

Ces paramètres sont déterminés dans le but d'évaluer l'impact des molécules testés sur la croissance cellulaire. Le nombre de génération (n), la vélocité ou la vitesse de génération (k) et le temps de génération (g) qui désigne le temps nécessaire pour qu'une population de micro-organismes se divise en doublant son nombre en fonction du temps.

$$N = \frac{(\log N_t - \log N_0)}{\log 2}$$

$$K = \frac{N}{t}$$

$$G = \frac{1}{K}$$

Dans ce cas, N_t fait référence au nombre de la population à un temps bien déterminé (t : 96h et t : 3h qui sont respectivement optimaux pour la croissance des paramécies et des levures). Tandis que N_0 représente le nombre initial de cellules c'est-à-dire le nombre à $t = 24h$ chez les paramécies et t : 1h chez les levures.

3.2.4. Calcul des concentrations inhibitrices (CI50) :

La CI50 désigne la concentration du xénobiotique qui inhibe 50% de la population des levures et des paramécies. Dans notre cas nous l'avons calculé à partir des concentrations sélectionnées. Et ce par la méthode Probit (Graphpad Prism) et en tenant compte de la croissance cellulaire en phase exponentielle. (Finney, 1952)

3.3. Etude du métabolisme biochimique

3.3.1. Dosage de protéines totales :

Le dosage de protéines totales est réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)** adaptée par **Krunger (2009)** : il s'agit d'une technique qui mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant (Le **Bleu Brillant de Coomassie**), qui est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par un spectrophotomètre de type JENWAY 6300 (Figure 8).

3.3.2. Dosage des lipides totaux :

Le dosage des lipides totaux est réalisé selon **Goldsworthy et al. (1972)**, en utilisant la vanilline comme réactif spécifique à cette étude. La quantité de lipides est déterminée par spectrophotométrie (JENWAY 6300) à une longueur d'onde de 530 nm (Figure 8).

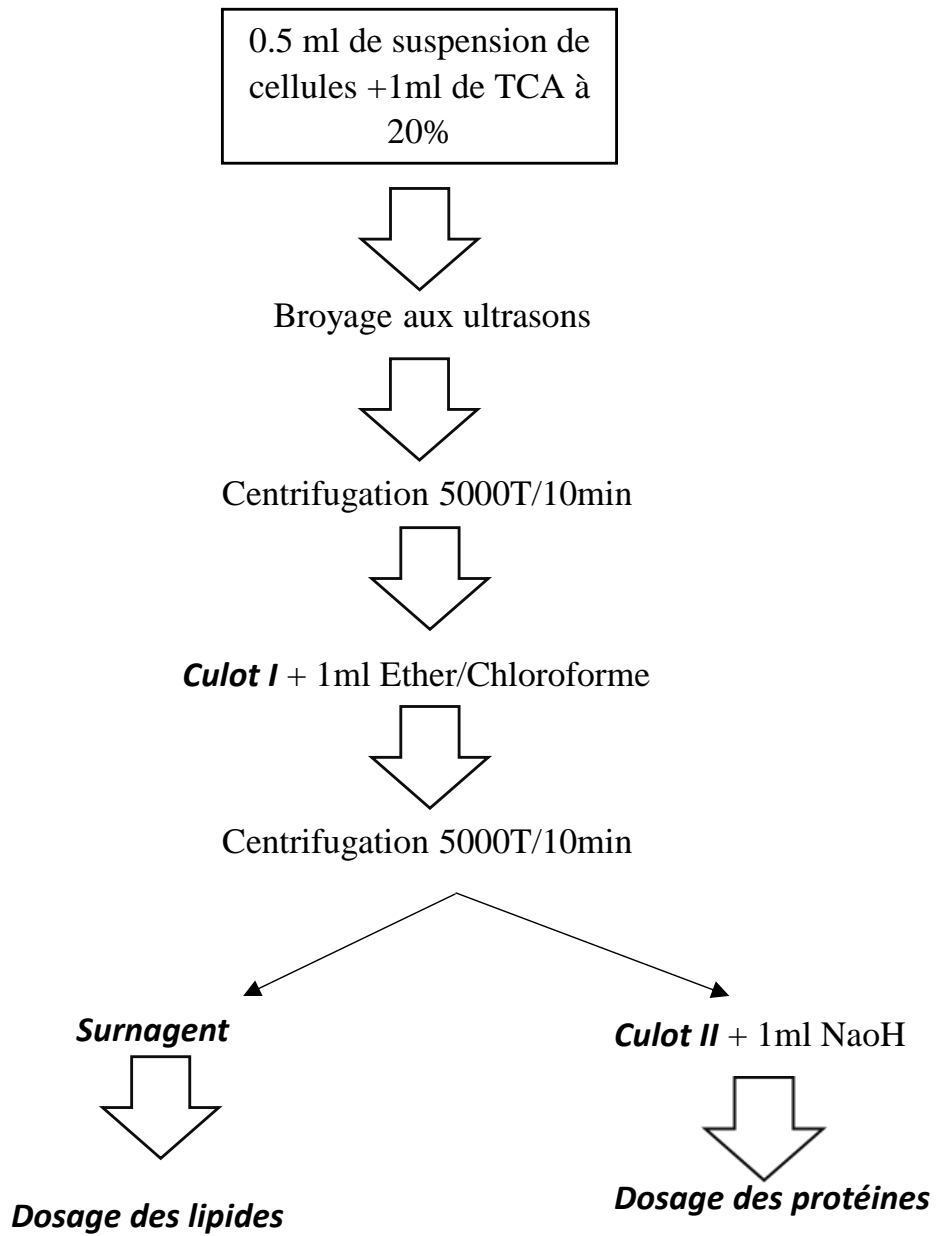


Figure 8: Protocol expérimental résumant la méthode de dosage des métabolites (Protéines et lipides totaux) basée sur les techniques de **Shibko et al. (1966)**

3.4. Etude des bio-marqueurs du stress oxydatif

3.4.1. Préparation de l'extrait enzymatique :

3.4.1.1. Cas des levures :

Après une centrifugation de 1500g/10minutes, le culot qui contient la fraction enzymatique est utilisé par la suite dans les dosages des bio-marqueurs enzymatiques selon le protocole suivant : les échantillons sont broyés dans un tampon phosphate (100mM, pH 7,5) à l'aide des ultrasons dans un bac de glace, l'homogénat est centrifugé à une vitesse de 10000 g/30min/4°C, le culot contient la fraction enzymatique brute.

3.4.1.2. Cas des paramécies :

Après un traitement d'au moins cinq (5) heures, les échantillons contenant les paramécies témoins et traitées aux métaux sont homogénéisées aux ultrasons. L'homogénat est centrifugé à 4°C pendant 30 min à 6000 g. et le culot obtenu contient la fraction enzymatique brute.

3.4.2. Dosage de l'activité catalase (CAT) :

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de **Claiborne (1985)** modifiée par **Prokić (2017)** qui repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les cellules sont alors broyées aux ultrasons dans 1ml de tampon phosphate, puis l'homogénat est récupéré et centrifugé à 15000 tours pendant 10min.

Ensuite, une solution de 0.050ml du surnageant, 0.75ml du tampon phosphate et 0.2 ml d'eau oxygénée (H₂O₂) est déposée dans une cuve en quartz ; la lecture au spectrophotomètre de type JENWAY 6305 est effectuée à la longueur d'onde de 240nm pendant une minute. L'activité catalase est mesurée en nmol/min / mg de protéines selon la formule suivante :

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

Soit :

- ΔDO : La pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- 0.040 : Le coefficient d'extinction d'eau oxygénée.
- Mg : Quantité de protéines en Mg.

3.4.3. Dosage du taux de glutathion (GSH) :

Le dosage du taux de glutathion est réalisé selon la méthode de **Weeckbeker et Cory (1988)** rapportée par **Dahdouh (2019)** qui repose sur la mesure de la densité optique de l'acide 2-nitro-5- mercapturique ; ce dernier résulte de la réaction de l'acide 5,5' dithio- 2-nitrobenzoïque (DTNB) par le groupement (-SH) du glutathion.

Pour cela, une suspension de levure est additionnée à 1 ml d'EDTA (0.02M) puis broyée à l'ultrason : 0.8 ml de ce mélange récupéré est mélangé à 0.2ml de la solution d'ASS (une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0.25% permet de protéger le groupement thiol du glutathion). Après agitation au vortex dans un bain de glace, une centrifugation des aliquots à 1000 tours pendant 5min est réalisée après un repos de 15 min à une température ambiante. A un volume de 0.5ml du surnageant, on rajoute 1ml d'EDTA et 0.025ml de DTNB. la lecture de la DO se fait après 5 min de repos à une longueur d'onde de 412nm. Ainsi, le taux de glutathion est exprimé en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines selon l'équation suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{M}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13,1 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg}}$$

Où :

- 1 : le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.
- 1.525 : le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant.
- 13,1 : le coefficient d'absorbance du groupement SH à 412nm.
- 0.8 : le volume de l'homogénat.
- 0.5 : le volume du surnageant.

3.4.4. Dosage de la Glutathion S- transférase (GST):

Le suivi de l'activité enzymatique GST est réalisé selon la méthode de **Habig *et al.*, (1974)** modifiée par **Simarani (2016)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GsT et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4-dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion réduit (GSH).

Le principe du dosage consiste à faire réagir 200 µl de l'extrait enzymatique de levures témoins et traitées avec 1,2 ml du mélange CDNB. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 min à 340 nm dans un spectrophotomètre Jenway 3600 contre un blanc où l'extrait enzymatique est remplacé par 200 µl de tampon phosphate ou d'eau distillée. L'activité de cette enzyme est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{GST } (\mu\text{moles/min/mg de protéines}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{\varepsilon * V * P}$$

Soit :

- ΔDO : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps
- V : Volume de l'échantillon en ml (0.2 ml)
- P : mg de protéines par ml de la fraction à doser
- ε : Coefficient d'extinction molaire du complexe GSH-CDNB (9.6 nM/cm)

3.4.5. Dosage du Malondialdéhyde (MDA) :

Le MDA est dosé selon la méthode de **Draper *et Hadley* (1990)** améliorée par **Garcia (2020)** basée sur la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le MDA donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à 532 nm.

Les levures sont homogénéisées aux ultra-sons dans 1ml de tampon Tris-HCL (50 nM, pH 7,5) puis centrifugées pendant 10 min à 10000 tours/min. 500 µl du surnageant sont additionnés de 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 20% (TCA) puis chauffés au bain marie à 100°C pendant 15 min.

Après refroidissement dans un bain de glace, une centrifugation est effectuée à 10000 tours/min pendant 10 min, puis 2 ml du surnageant sont alors prélevés auxquels on ajoute 1 ml

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

de TBA. Un second chauffage à 100°C pendant 15 min est effectué et après refroidissement, 1,5 ml de butanol sont rajoutés. Après agitation, une dernière centrifugation (10000 tours/min pendant 10 minutes) est réalisée et 1 ml de surnageant butanolique renfermant les complexes TBA/MDA est récupéré.

La lecture des absorbances est effectuée à 532 nm contre un blanc (1 ml de tampon Tris-HCl à la place de l'extrait butanolique) et le taux de MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{MDA } (\mu\text{moles/mg de protéines}) = \frac{\text{Do} * \text{C} * \text{Vt}}{\text{Mg de protéines}}$$

A savoir :

- Do : Densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.
- C : Coefficient d'extinction molaire du TBA : 156.
- Vt : Volume total dans la cuve : 1ml (butanol renfermant TBA/MDA)

3.5. Etude morphologique et comportementale

3.5.1. Cas des levures :

Un frottis de *Saccharomyces cerevisiae* témoins et traitées est réalisé selon la méthode de **Pol (1996)** (Figure 9). Nous avons choisi de réaliser une coloration au bleu de méthylène qui agit selon le principe d'oxydo-réduction. Sa réduction au sein de la cellule est assurée par une enzyme spécifique. Quand les cellules sont immergées dans ce colorant, les enzymes des cellules vivantes décolorent sa pigmentation. Tandis que, les cellules mortes au sein desquelles l'enzyme est inactive, ne réagissent pas et restent bleues sous forme oxydée (**Rocken et Strauss, 1976**).

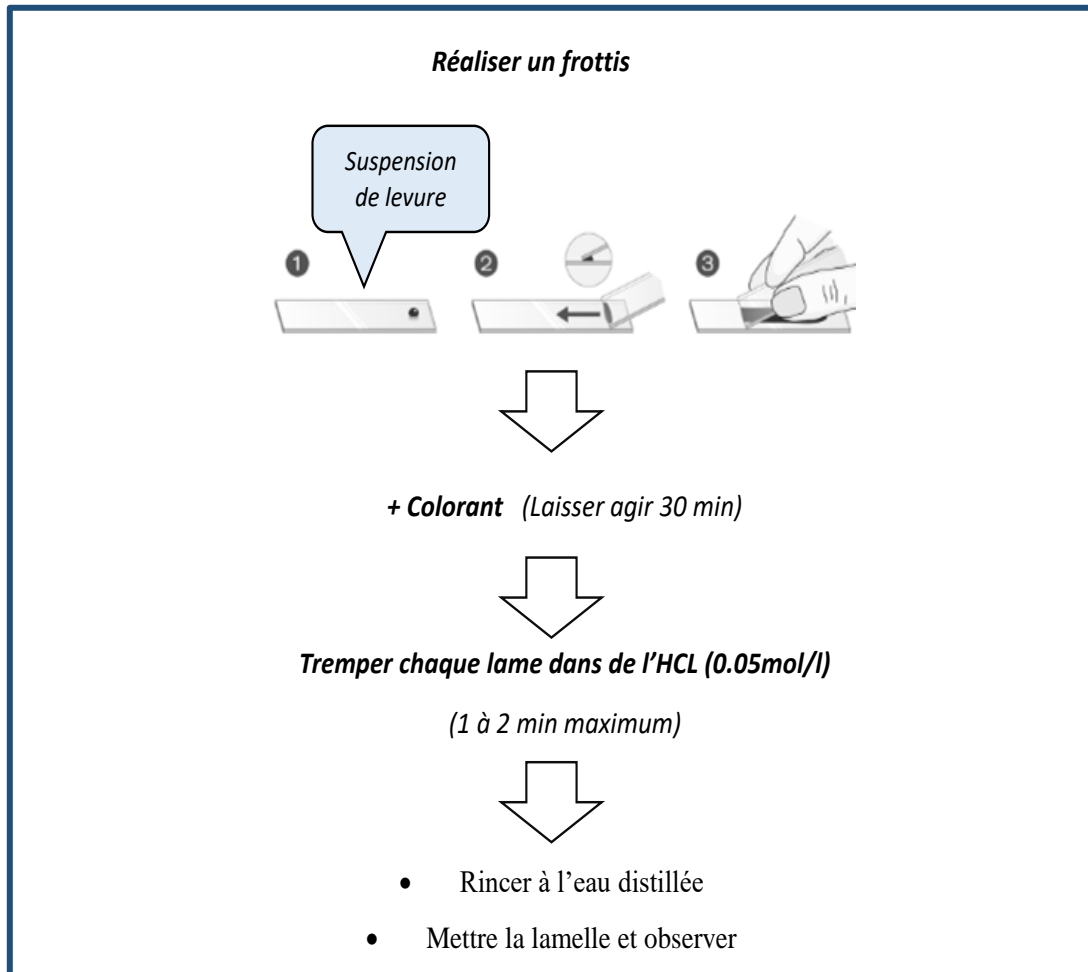


Figure 9 : Protocol expérimental décrivant la méthode de coloration des cellules avant observation au microscope optique.

3.5.2. Cas des paramécies :

Nous avons étudié l'impact des métaux et de leur mixture à l'échelle cellulaire à l'aide de plusieurs observations microscopiques au Grx20 après fixation au formol (4%). Ainsi, leur morphologie est comparée à celle des cellules témoins et à la littérature.

Les trajectoires et les vitesses de déplacement des paramécies témoins et traitées sont suivis à l'aide du logiciel Kinovea version 0.9.5 qui permet de tracer précisément la trajectoire du déplacement et ce après l'analyse des vidéos enregistrées. Ainsi, il permet de calculer la vitesse de déplacement en ressortant la distance en pixel et le temps en centième de seconde.

3.6. Traitement de *Saccharomyces cerevisiae* par la TMZ, PDN et les KCN:

Après divers essais, les levures sont exposées à la plus faible concentration (50 μ M) de TMZ, PDN, KCN, d'Al et de Cr(VI) respectivement. Le suivi de la croissance cellulaire est réalisé après 2H, 3H, 4H et 24H de traitement par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 600nm.

De plus, nous avons également calculé le pourcentage de réponse chez les cellules traitées par les molécules citées par rapport à celles traitées par l'Al et le Cr(VI).

3.7. Etude statistique

Toutes nos expériences sont répétées au moins trois fois. Nos résultats sont analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9 en utilisant des tests ANOVA One way et Two ways. Les tests de comparaison multiples sont également effectués : tests de Dunnetts pour tous les paramètres et tests de Tukey pour l'analyse des pourcentages de réponses.

Ainsi, les données obtenues sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type SEM où les différences significatives sont notées lorsque $P \leq 0,05$ (significative), $P \leq 0,01$ (très significative), $P \leq 0,001$ (hautement significative) et $P < 0.0001$ (très hautement significative).

CHAPITRE III : Résultats

CHAPITRE III : Résultats

1. Effet des métaux sur la cinétique de croissance

1.1.Cas des levures :

Les figures (10), (11) et (12) mettent en évidence l'impact des sels d'Aluminium, des particules de Chrome ainsi que leur mixture sur la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

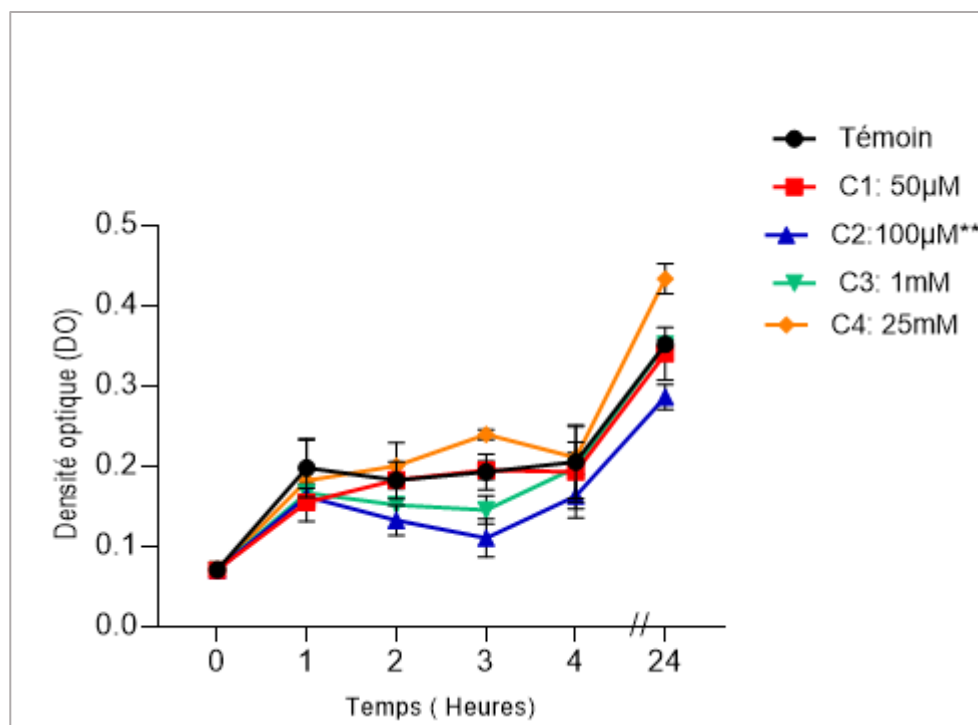


Figure 10 : Effet de l'Al sur la cinétique de croissance des levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Dans le cas des cellules témoins, la croissance est normale avec phase exponentielle obtenue après 3H de temps avec une DO de 0.260. Chez les traitées par la plus forte concentration (C4) d'Al, la croissance semble stimulée avec une DO de l'ordre de 0,213. Alors que chez les cellules traitées par les plus faibles concentrations C2 et C3 les Do sont de l'ordre de 0.174 et 0.198 respectivement. (Figure 10).

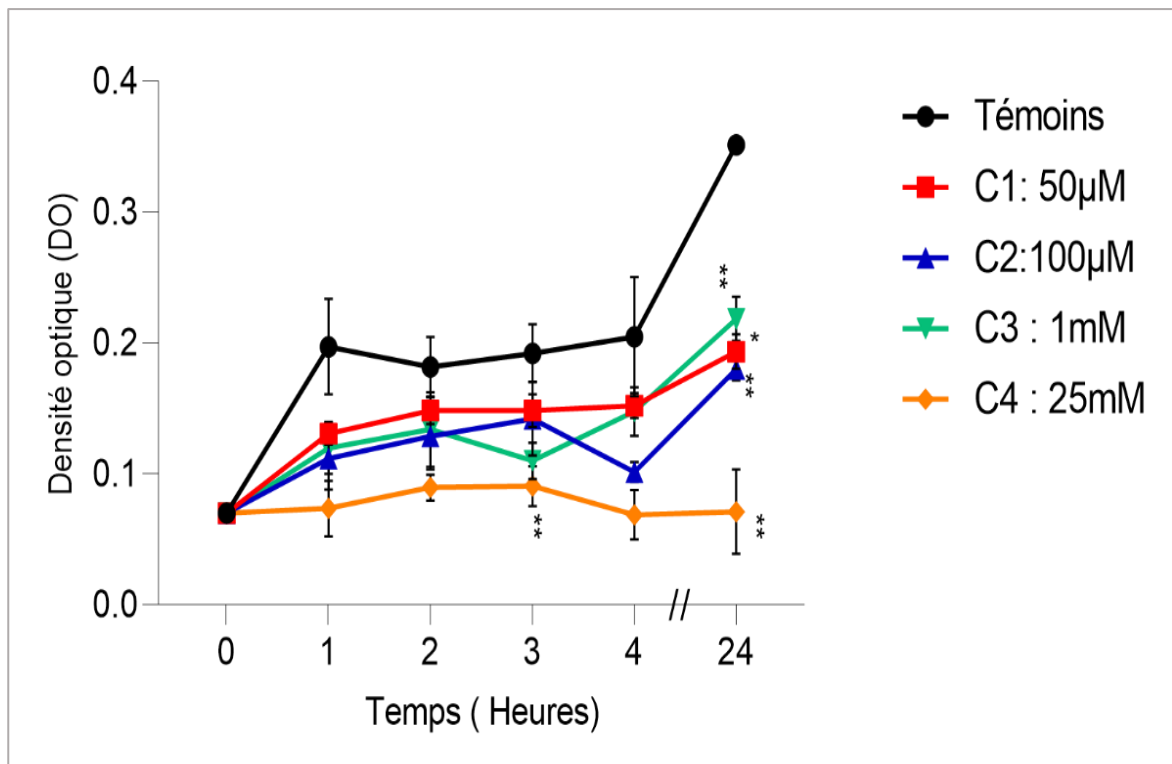


Figure 11 : Effet du Cr(VI) sur la cinétique de croissance des levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (11) montre l'impact des Chromates de potassium sur la croissance cellulaire après 24 heures d'exposition.

Dans ce cas, on remarque une inhibition par rapport aux témoins après 1heure d'exposition, après 3heures on constate une inhibition très significative chez les levures traitées par la plus forte concentration ($p=0,0073$) avec une DO de l'ordre de 0.090 et ce comparativement aux témoins dont la DO de l'ordre de 0.260.

De plus, après 24h de traitement cette perturbation devient très significative pour les cellules traitées par C1 ($p=0,0017$), C2 ($p=0,0052$) et C4 ($p=0,0096$) avec des DO respectives de l'ordre de 0.193, 0.180 et 0.071. Cette inhibition devient significative ($p=0,0210$) pour C3 avec une DO de 0.137 alors que chez les témoins la DO est de l'ordre de 0.485.

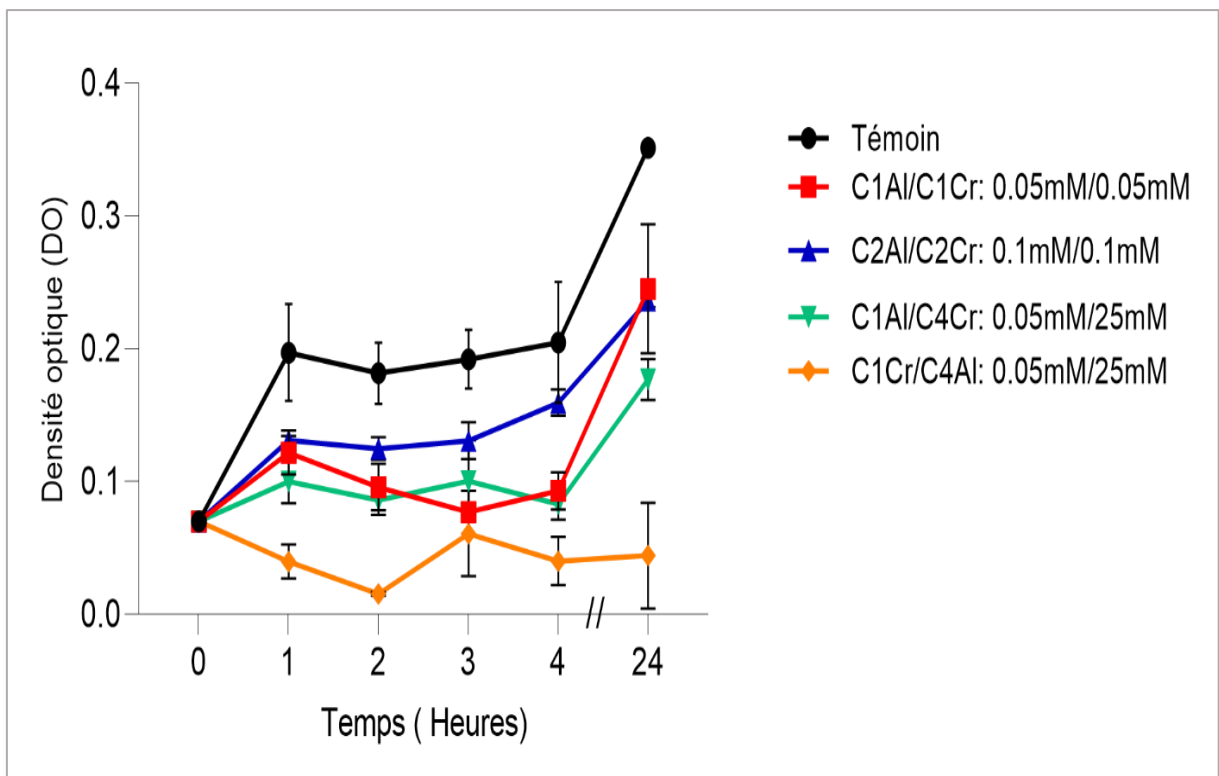


Figure 12 : Effet du mélange Al/Cr(VI) sur la cinétique de croissance des levures.

Le traitement par la mixture de métaux (Al/Cr(VI)) (Figure 12) met en évidence une inhibition dès 1 heure de traitement.

Cette inhibition continue à être plus marquée chez les cellules traitées par certains mélanges avec des DO respectives de l'ordre de 0.127, 0.094 et de 0.055 chez les cellules traitées par C1Al/ C1Cr, C1Al/C4Cr et par C1Cr/C4Al contrairement aux témoins dont la DO est de l'ordre de 0.260 et ce après 3 heures de traitement.

Cependant, après 24h d'exposition, l'inhibition de croissance re-devient dose-dépendante, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 64% (DO : 0.177) et de 94% (DO : 0.038) pour les cellules traitées par C1Al/C4Cr et C1Cr/ C4Al comparativement aux témoins (DO : 0.485).

1.2.Cas des paramécies :

Les figures (13), (14) et (15) illustrent l'impact des sels d'Aluminium, des particules de Chrome ainsi que leur mélange sur la croissance des paramécies.

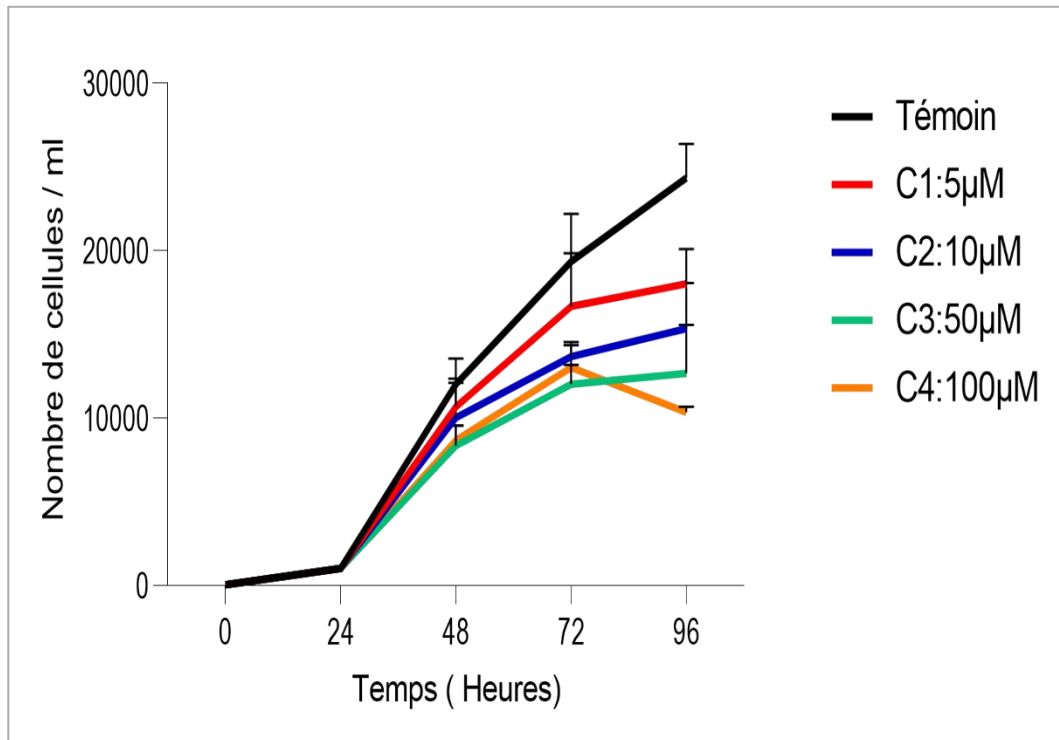


Figure 13 : Effet des sels d'Al sur la croissance des paramécies après 96h d'exposition.

Nous constatons une inhibition de la croissance des paramécies exposées aux différentes concentrations d'Al (Figure 13). Cette inhibition est dose-dépendante avec un nombre qui passe de 16000,33 cellules/ml chez les cellules traitées par C1 à 13000,33 cellules/ml chez les cellules exposées à la plus forte concentration comparativement aux témoins dont le nombre atteint 19000,33 cellules/ml et ce après 72heures d'expositions.

Après 96heures de traitement, le nombre des cellules témoins et traitées par C1 (18000 cellules/ml), C2 (18000 cellules/ml) et C3 (12666 cellules/ml) tend à augmenter tandis que celui des cellules traitées par la plus forte concentration (C4) tend à diminuer atteignant 10333 cellules/ml.

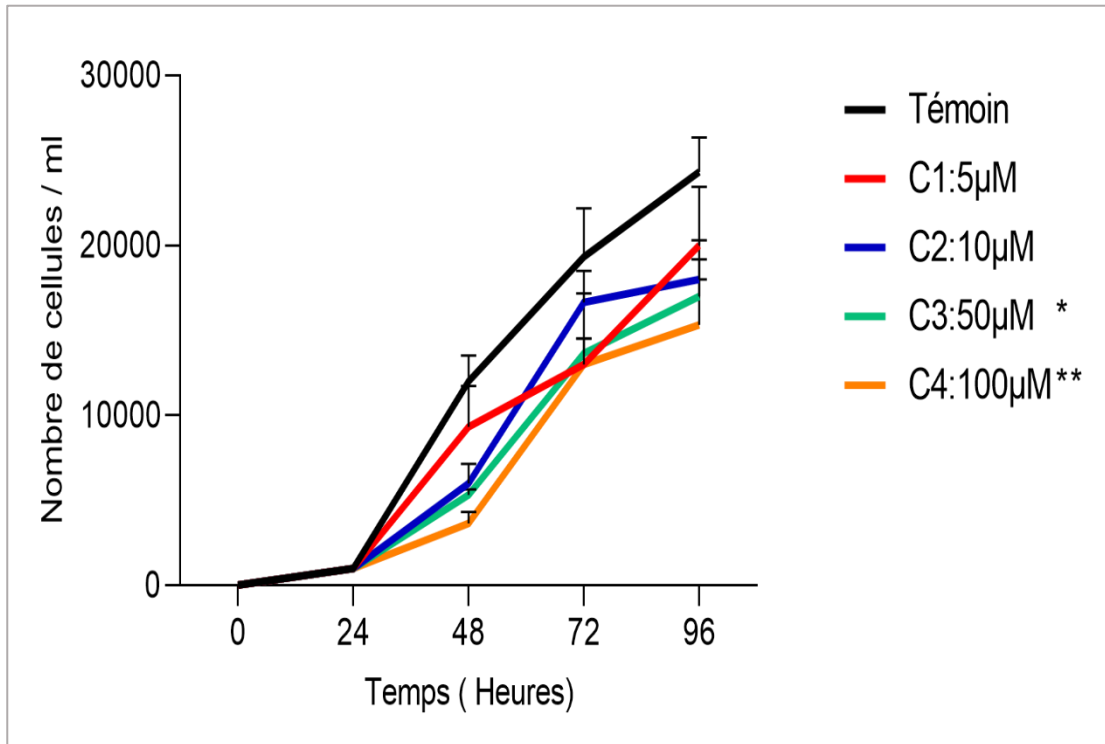


Figure 14: Effet des particules de Cr(VI) sur la croissance des paramécies après 96h de traitement. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Le traitement par les chromates de potassium (Figure 14) a également induit une inhibition de la croissance des paramécies. En fait, la déplétion du nombre des cellules est très significative chez celles traitées par C4 ($p = 0.0196$) avec une valeur de l'ordre de 15000.33 cellules/ml, et significative chez les traitées par C3 ($p = 0.0066$) avec une valeur de l'ordre de 17000 cellules/ml, contrairement aux cellules témoins qui atteignent 24000.33 cellules/ml après 96heures de traitement.

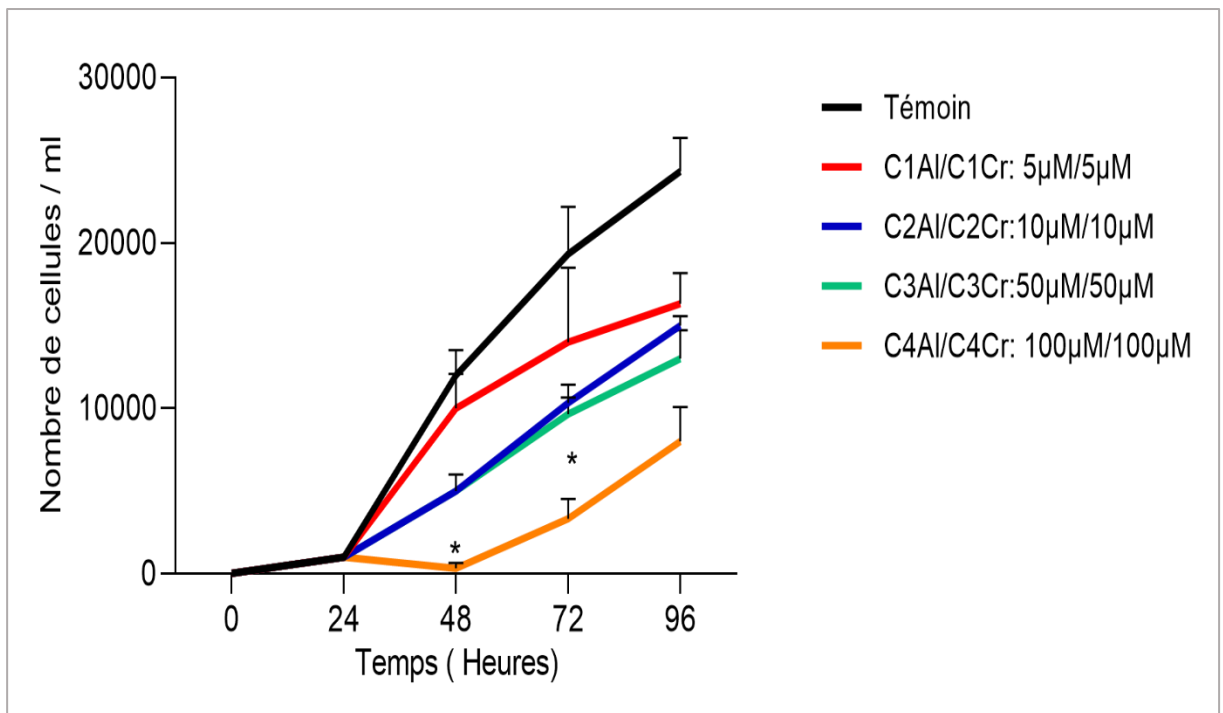


Figure 15 : Effet de la mixture Al/Cr sur la croissance des paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous constatons que la cinétique de croissance est clairement perturbée chez *Paramecium sp* exposées à toutes les combinaisons Al/Cr. Cette perturbation se manifeste par une inhibition significative ($p = 0.0231$) et plus marquée chez les cellules exposées à la mixture des fortes concentrations (C4Al/ C4Cr) après 48 heures d'expositions. En effet, le nombre des cellules diminue pour atteindre 333.33 cellules/ml chez les cellules traitées par C4 Al/C4Cr contrairement aux témoins dont le nombre dépasse 19000.33 cellules/ml après 48 heures d'exposition. Chez les traitées par les autres combinaisons, le nombre de cellules augmente mais reste inférieur à celui des témoins.

2. Effet sur le pourcentage de réponse :

2.1. Cas des levures :

Les figures (16), (17) et (18) illustrent l'effet des deux métaux Al et Cr(VI) ainsi que leur mélange sur le pourcentage de réponse chez les levures *S.cerevisiae*.

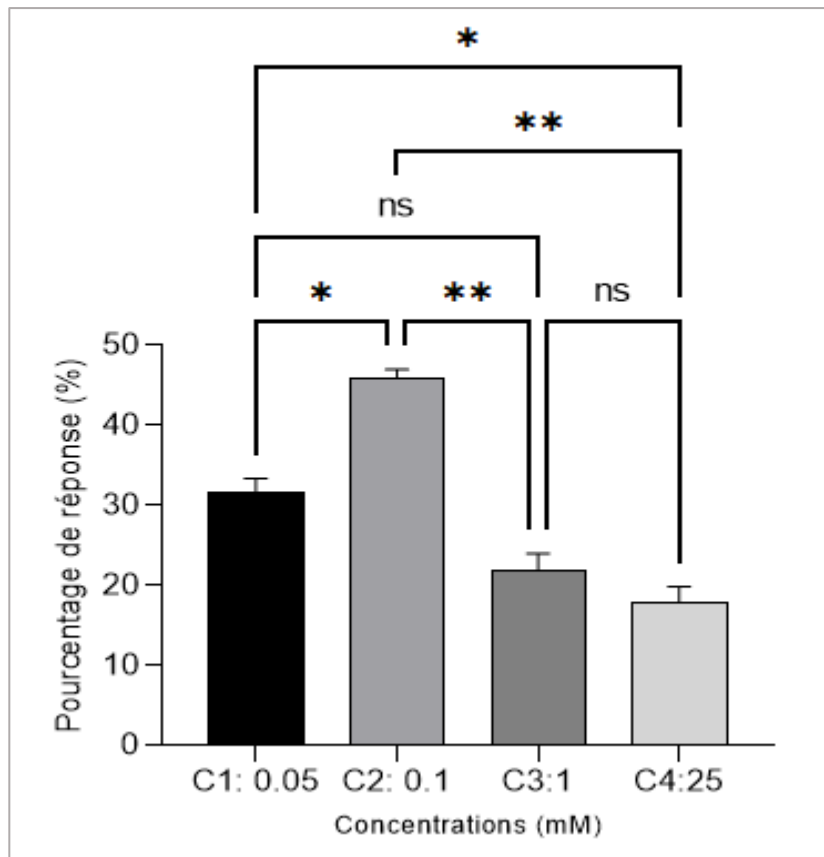


Figure 16 : Pourcentage de réponse des levures traitées à l'Al. *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous constatons que les pourcentages de réponses des traitées par la concentration C2Al sont les plus élevés (46%) par rapport aux concentrations aussi bien inférieures C1 (31.7%) que C3 (22%) et C4 (17.9%) respectivement.

L'analyse de la variance ANOVA révèle des différences très significatifs ($p=0.0011$). Ainsi, la comparaison multiple indique des différences très significatives entre C2 et C3 ($p=0.0020$), C2 et C4 ($p=0.0011$), significative entre C1 et C2 ($p=0.0140$) et C1 et C4 ($p=0.0161$).

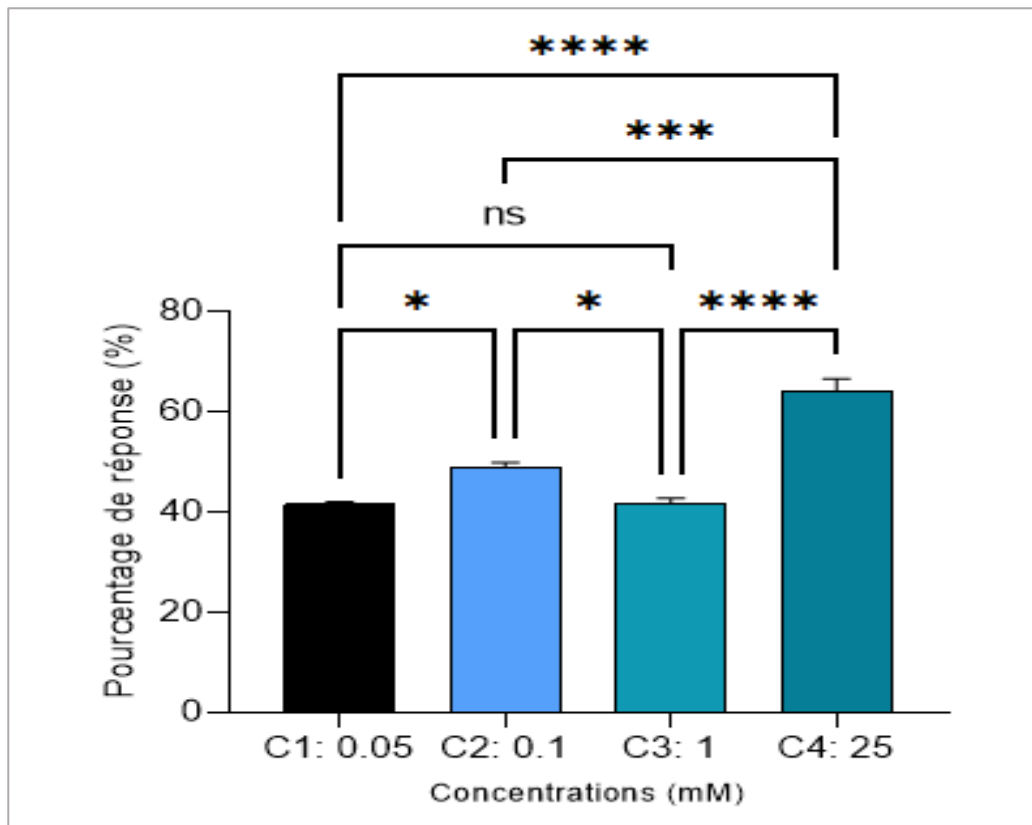


Figure 17 : Pourcentage de réponse des levures exposées au Cr(VI). *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Concernant *Saccharomyces cerevisiae* traitées par les concentrations croissantes de Cr(VI). Nous constatons que le pourcentage de réponse des traitées par C4 est plus élevé (65%) par rapport aux concentrations C1, C2 et C3 qui sont de l'ordre de 41%, 48% et 41.6%. Ainsi, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatives (< 0.0001). La comparaison multiple indique des différences très hautement significatives entre C3 et C4, C4 et C1, hautement significatives entre C2 et C4 ($p=0.0003$) et significatives entre C1 et C2 ($p=0.0280$), C2 et C3 ($p=0.030$).

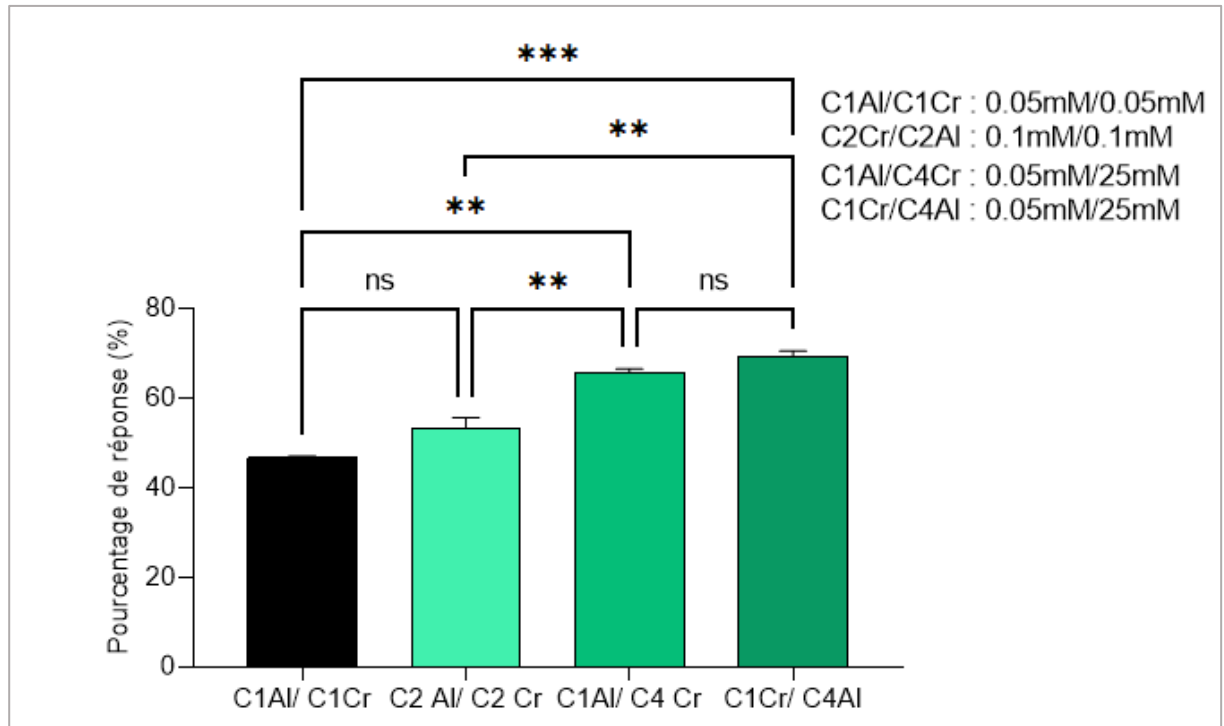


Figure 18 : Pourcentage de réponse des levures exposées aux différentes mixtures d'Al/Cr(VI). *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Le traitement par les mixtures (Al/Cr(VI)) révèle que les pourcentages de réponses les plus élevés sont ceux des cellules traitées par C1Al/C4Cr et C1Cr/C4Al avec des valeurs respectives de 65% et 70%. L'analyse de variance ANOVA révèle des différences hautement significatives ($p=0.0008$). De plus, le test de comparaison multiple révèle des différences hautement significatives entre C1Al/C1Cr et C1Cr /C4Al ($p=0.0010$), et très significatives entre C1Al/C1Cr et C1Al/C4Cr ($p=0.0019$), C2Al/C2Cr et C1Al/C4Cr ($p=0.0098$), C2Al/C2Cr et C1Cr/C4Al ($p=0.0038$).

2.2.Cas des paramécies :

Les figures (19), (20) et (21) mettent en valeur l'effet des deux métaux (Al et Cr(VI)) ainsi que leur mélange (Al/Cr(VI)) sur le pourcentage de réponse chez les paramécies.

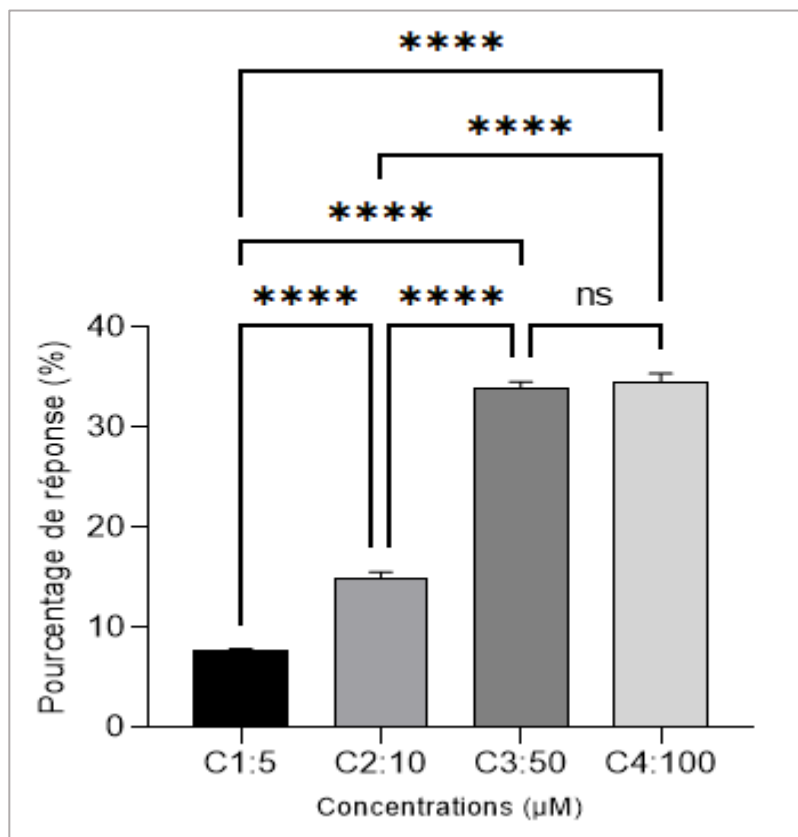


Figure 19 : Pourcentage de réponse des paramécies traitées avec les sels d'Al. *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (19) met en évidence des pourcentages de réponses positives qui atteignent 34.61% chez les cellules exposées à la plus forte concentration d'Al (C4). Le test de variance ANOVA montre des résultats très hautement significatifs ($p < 0.0001$). Ainsi, le test de comparaison multiple révèle des différences très hautement significatives entre C1 et C2, C1 et C3, C2 et C3, C2 et C4, C1 et C4 ($P < 0.0001$).

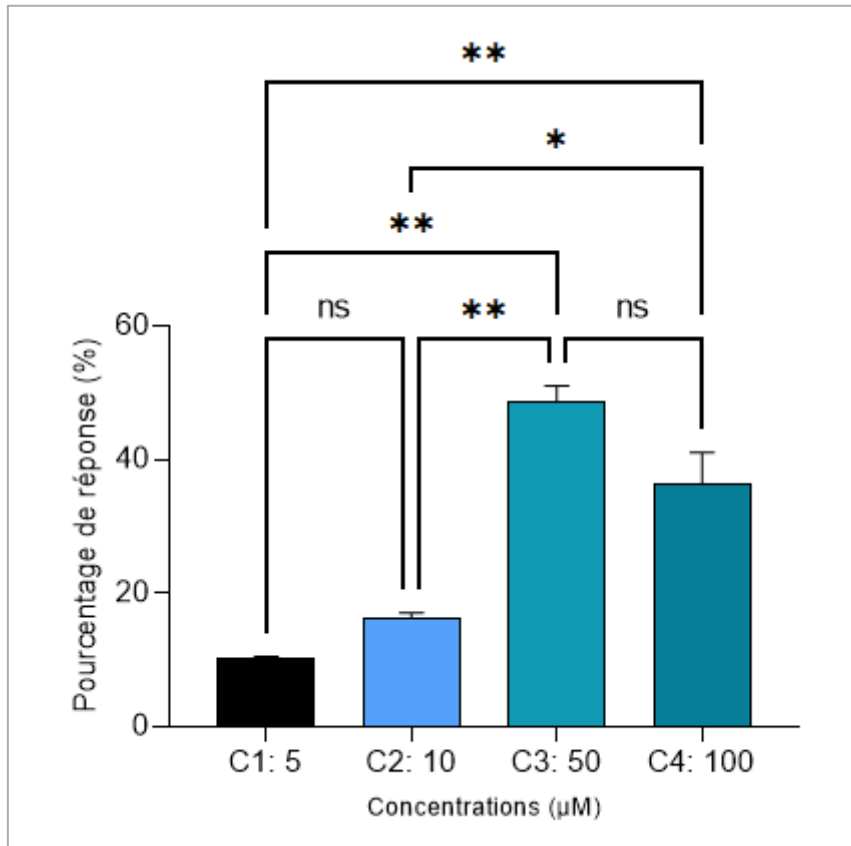


Figure 20 : Pourcentage de réponse des paramécies exposées aux Cr(VI). *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Nous constatons que les pourcentages de réponses des paramécies traitées par le Cr sont positives (Figure 20) où la valeur la plus élevée est notée chez les cellules exposées à la plus forte concentration (36.9%). L'analyse de variance ANOVA révèle des résultats significatifs ($p=0.0016$). De plus, la comparaison multiple montre des différences très significatives entre C1 et C3 ($p=0.0019$), C2 et C3 ($p=0.0080$), C1 et C4 ($p=0.0036$) et significative entre C2 et C4 ($p=0.020$).

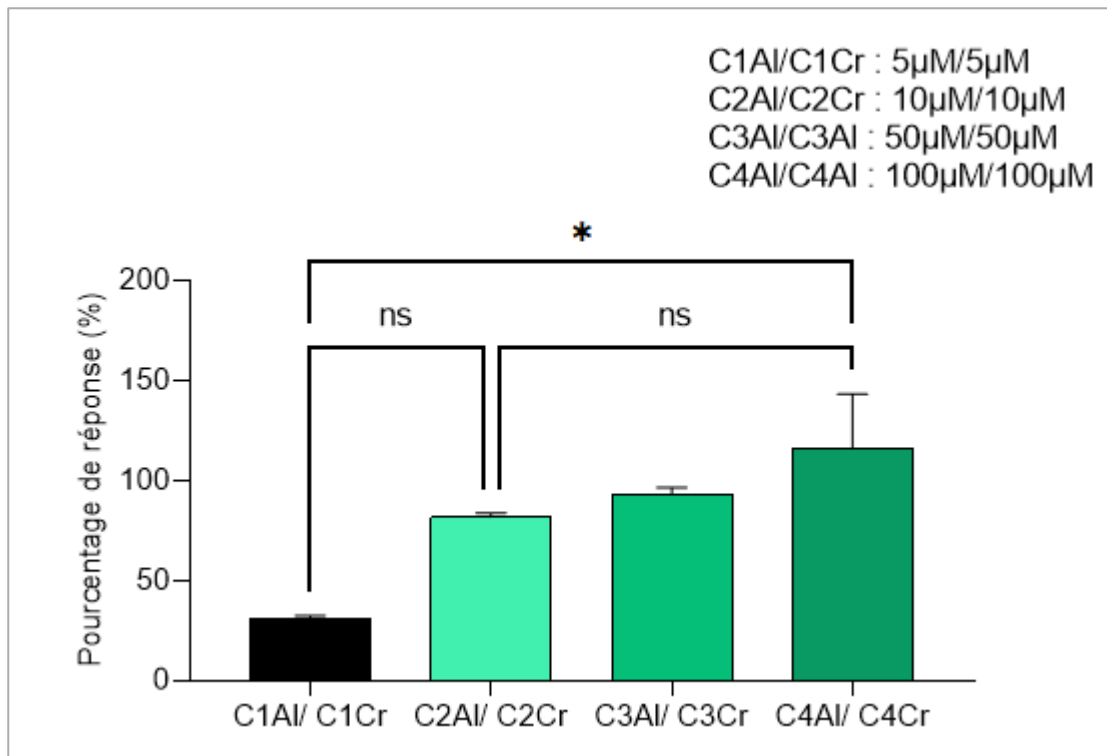


Figure 21: Pourcentage de réponse des paramécies exposées aux mélanges de concentrations Al/Cr(VI). *ns* : non significative, * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La figure (21) met en évidence des pourcentages de réponses positives chez les paramécies traitées par la mixture (Al/Cr). Ainsi, nous remarquons que la valeur la plus élevée est notée chez les cellules exposées à C4Al/C4Cr avec un pourcentage de l'ordre de 116%. Dans ce cas, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences significatives ($p = 0,0439$). Le test de comparaison multiple révèle ainsi des différences significatives ($p = 0,036$) entre C1Al/C1Cr et C4Al/C4Cr.

Chapitre III : Résultats

3. Effet des métaux sur les paramètres de croissance :

3.1.Cas des levures :

Le tableau (5) met en évidence l'évolution des différents paramètres de croissance y compris le nombre, la vitesse et le temps de génération des levures témoins et traitées aux sels d'Al, aux particules de Cr(VI) et à leur mixture.

Tableau 5 : Impact des sels d'Aluminium, du Chrome et de leur mélange sur les paramètres de croissance de *S.cerevisiae*. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

		Nombre de génération	Temps de génération	Vitesse de génération
Témoin		0,264 ±0,020	15,186 ±1,150	0,066±0,005
Al (mM)	C1 :0.05	0,207 ±0,002	19,259 ±0,223	0,051 ±0,0006
	C2 :0.1	0,146 ±0,008 (*)	27,266 ±1,559 (*)	0,036 ±0,0021 (*)
	C3 :1	0,137 ±0,0004	29,130 ±0,093 (**)	0,034 ±0,0001
	C4 :25	0,147 ±0,059	29,539 ±1,996	0,037 ±0,0149
Cr(VI) (mM)	C1 :0.05	0,227 ±0,008	17,582 ±0,691	0,0569 ±0,002
	C2 :0.1	0,109 ±0,008	36,502 ±2,856	0,0274 ±0,028
	C3 :1	0,172 ±0,0004(*)	23,764 ±0,884 (**)	0,0421 ±0,041
	C4 :25	0,127 ±0,0003(*)	29,923 ±1,912	0,0334 ±0,034
Al/Cr(VI)	C1Al/C1Cr	0,019 ±0,0006(*)	20,347 ±0,631	0,0491 ±0,001
	C2Al/C2Cr	0,026 ±0,004	14,997 ±0,258	0,0666 ±0,001
	C1Al/C4Cr	0,036 ±0,344	16,804 ±3,562	0,0608 ±0,012
	C4Al/C1Cr	0,024 ±0,272	21,068 ±3,726	0,0482 ±0,008

Chapitre III : Résultats

Chez *S.cerevisiae* , nous constatons une diminution progressive du nombre de générations où les valeurs les plus marquées sont de l'ordre de 0.137, 0.109 et 0.019 chez les cellules exposées respectivement à C3Al, C2Cr et C1Al/C1Cr par rapport aux témoins avec une valeur de l'ordre de 0.264.

Nous remarquons ainsi une augmentation du temps de génération qui atteint 29.5, 36.5 et 21.06 chez les levures traitées respectivement par C4Al, C2Cr et C4Al/C1Cr comparativement aux témoins qui ne dépassent pas une valeur de l'ordre de 15.8.

Concernant la vitesse de générations, nous constatons une diminution qui atteint des valeurs de l'ordre de 0.034, 0.027 et 0.048 chez les cellules traitées respectivement par C3Al, C2Cr et C4Al/C1Cr comparativement aux témoins dont la vitesse de générations est de l'ordre de 0.

3.2.Cas des paramécies :

Le tableau (6) met en évidence l'évolution des différents paramètres de croissance y compris le nombre, la vitesse et le temps de génération des paramécies témoins et traitées aux sels d'Al, aux particules de Cr(VI) et à leur mixture.

Chapitre III : Résultats

Tableau 6 : Impact des sels d'Aluminium, du Chrome et de leur mélange sur les paramètres de croissance des paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

		Nombre de génération	Temps de génération	Vitesse de génération
Témoin		9.306 ±0,201	7.736 ±0.167	0,129 ±0,0603
Al (μM)	C1 :5	8,255 ±0,360	8,730 ±0,381	0,114 ±0,063
	C2 :10	8,350 ±0,042	8,622 ±0,043	0,115 ±0,066
	C3 :50	7,819 ±0,338	9,216 ±0,399	0,108 ±0,060
	C4 :100	8,523 ±0,659	8,472 ± 0,655	0,118 ±0,063
Cr(VI) (μM)	C1 :5	9,146 ±0,032	7,871 ±0,441	0,127 ±0,016
	C2 :10	9,058 ±0,099	7,947 ±0,443 (*)	0,125 ±0,0001(*)
	C3 :50	8,759 ±0,240	8,105 ± 0,106	0,121 ±0,0002(*)
	C4 :100	9.029 ±0,382	8,209 ±0,014	0,125 ±0,005
Al/Cr(VI)	C1Al/C1Cr	8,900 ±0,282	8,089 ±0,063	0,123 ±0,003
	C2Al/C2Cr	8,428 ±0,161(*)	8,542 ±0,242(*)	0,117 ±0,008
	C3Al/C3Cr	8,331 ±0,163(*)	8,641 ±0,100(*)	0,115 ±0,002
	C4Al/C4Cr	6,795 ±0,209 (**)	10,591 ±0,770	0,094 ±0,042

Chapitre III : Résultats

En ce qui concerne les paramètres de croissance des paramécies (Tableau 6), nous remarquons une diminution du nombre de générations particulièrement chez les cellules exposées à C3Al, C3Cr et C4Al/C4Cr avec des valeurs respectives de l'ordre de 7.8, 8.75 et 6.7 par rapport aux témoins qui atteignent 9.3.

Nous constatons ainsi une augmentation du temps de génération qui atteint 9.2, 8.10 et 10.5 chez les paramécies traitées respectivement par C3Al, C3Cr et C4Al/C4Cr comparativement aux témoins qui ne dépassent pas 7.7.

Quant à la vitesse de générations, les résultats mettent en évidence une diminution particulière chez les cellules exposées à C4Al, C4Cr et C4Al/C4Cr avec des valeurs respectives de l'ordre de 0.118, 0.123 et 0.094 comparativement aux témoins (0.129).

4. Détermination des CI50 :

Les CI50 des sels d'Al et du Cr(VI) sont illustrées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs des CI50 (μM) de l'Al et du Cr(VI) chez les levures et paramécies.

	CI50 des levures	CI50 des paramécies
Al	16,269 mM	70,845 μM
Cr(VI)	5,141mM	61,030 μM

Le tableau (7) met en évidence les valeurs des CI50 calculées par la méthode Probit. Nous constatons que les CI50 du Chrome (VI) sont inférieures à celles du Sulfate d'Aluminium, et ce chez les deux modèles cellulaires.

5. Effet des sels d'Al, du Cr(VI) et de leur combinaison Al/Cr(VI) sur les paramètres biochimiques

5.1. Cas des levures :

a- Evolution du taux de Protéines :

L'impact des deux métaux ainsi que leur mélange sur le taux de protéines totales est représenté dans les figures (22), (23) et (24).

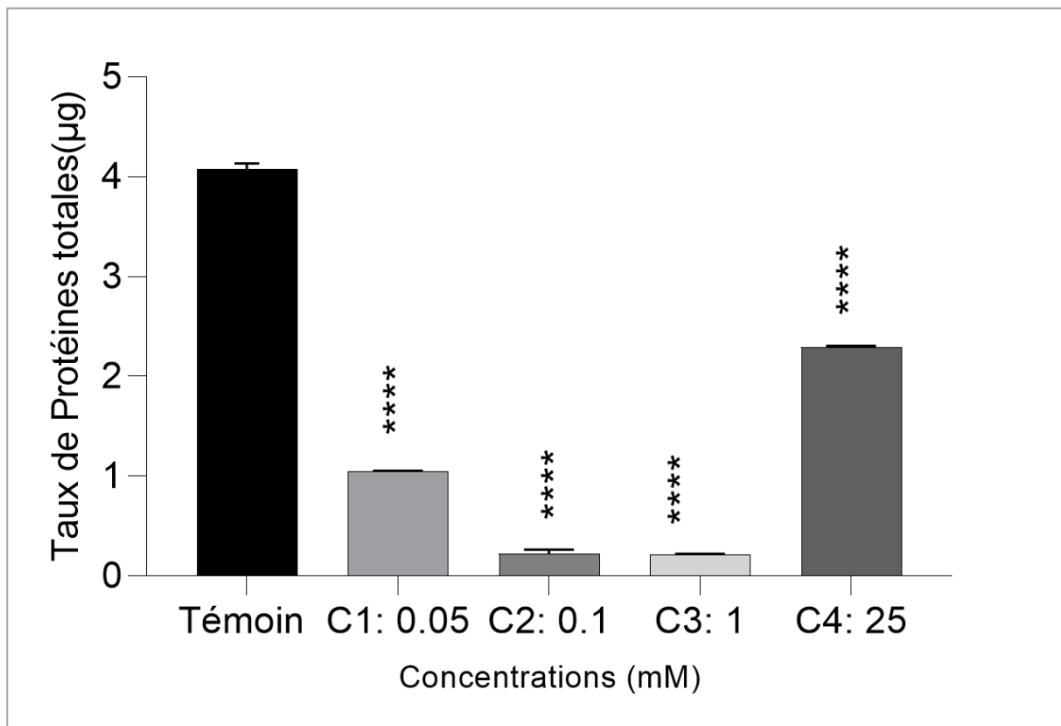


Figure 22 : Effet de l'Al sur la teneur en protéines totales (μg) chez les levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous remarquons une déplétion du taux de protéines totales chez les cellules traitées par l'Al par rapport aux témoins (Figure 22). Cette diminution est très hautement significative ($p < 0.0001$) chez les cellules traitées par toutes les concentrations particulièrement par C2 et C3 avec des valeurs respectives de l'ordre de $0.223 \mu\text{g}$ et de $0.215 \mu\text{g}$ comparativement aux témoins qui atteignent une valeur de $4.0823 \mu\text{g}$.

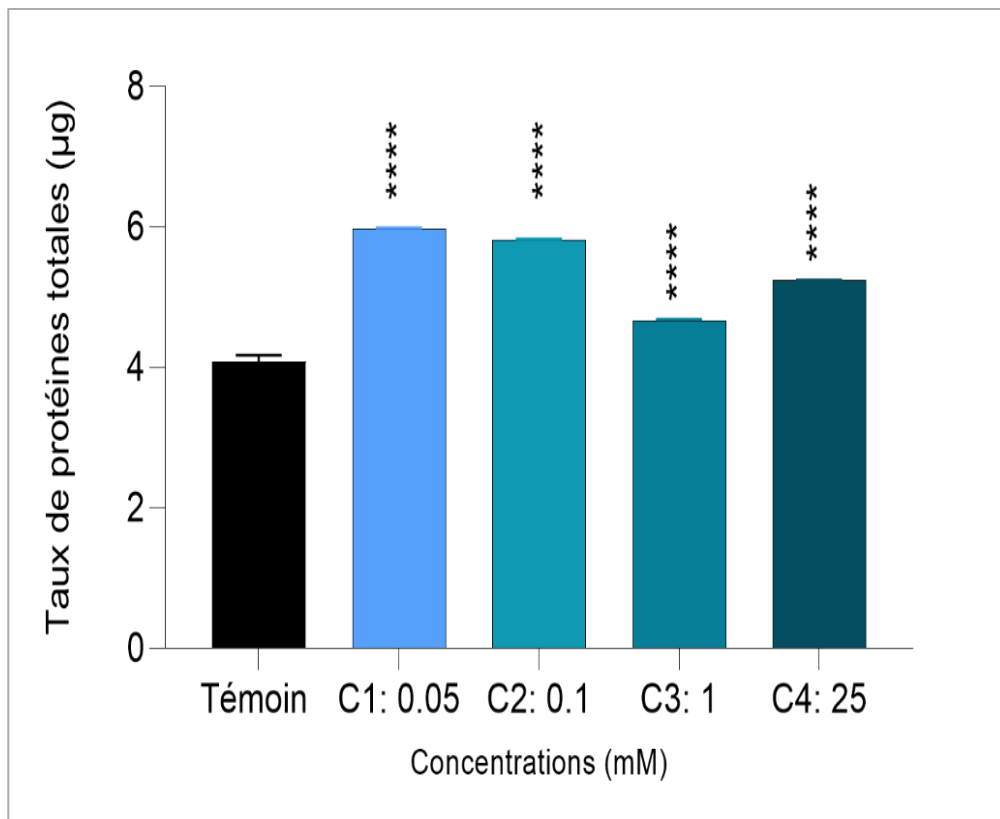


Figure 23 : Effet des concentrations croissantes du Cr(VI) sur le taux de protéines totales (μg) chez les levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

En revanche, le traitement au Cr(VI) induit une augmentation très hautement significative des protéines totales ($p < 0.0001$) où on note des valeurs allant de 5.980 μg pour C1 jusqu'à 5.240 μg pour C4 et ce comparativement aux témoins avec une valeur de 4.0823 μg (Figure 23).

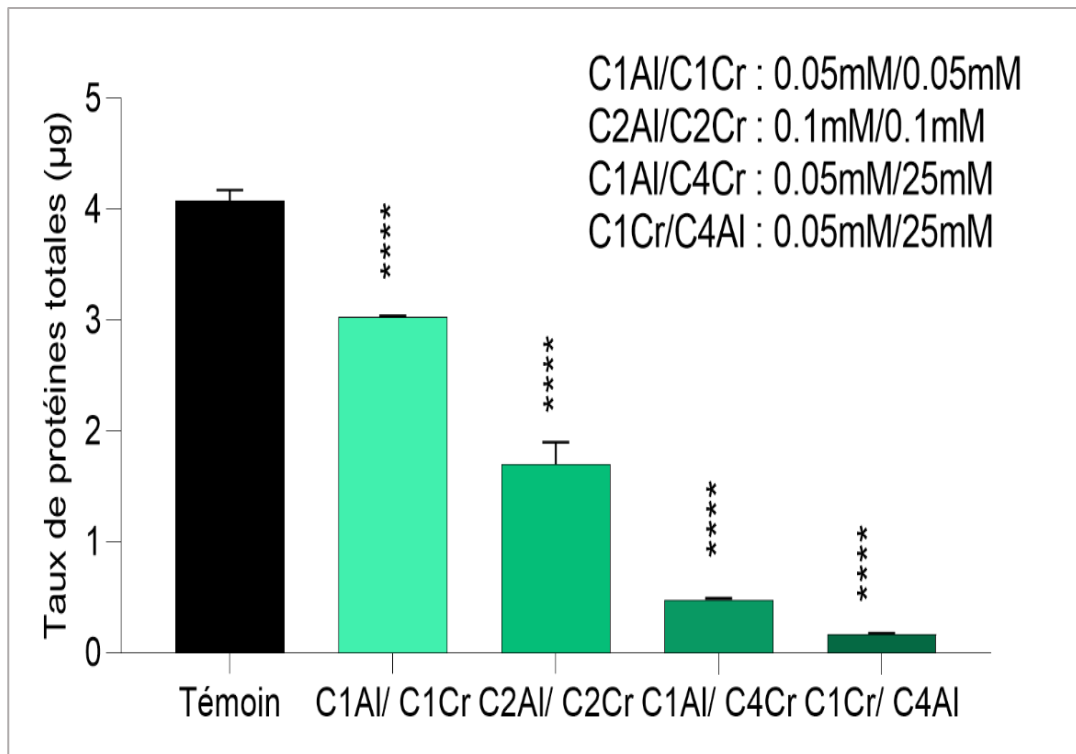


Figure 24 : Effet des différentes mixtures d'Al/Cr sur l'évolution du taux de protéines totales (µg) chez les levures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (24) illustre l'évolution du taux de protéines totales chez les levures traitées par les mixtures Al/Cr. Nous constatons une diminution très hautement significative ($p < 0.0001$) et dose-dépendante du taux de protéines totales. En effet, on constate des valeurs allant de 3.030 µg chez les cellules traitées par le mélange C1Al/C1Cr jusqu'à 0.170 µg chez les cellules exposées à la mixture (C1Cr/C4Al) contrairement aux levures témoins qui atteignent 4.0823 µg (Figure 24).

Ainsi, l'analyse de la variance ANOVA des résultats présentés précédemment indique des différences très hautement significatives ($p < 0.0001$).

b- Evolution des teneurs en lipides totaux :

Les figures (25), (26) et (27) illustrent l'effet des deux Métaux et leur mixture sur l'évolution du taux de lipides totaux.

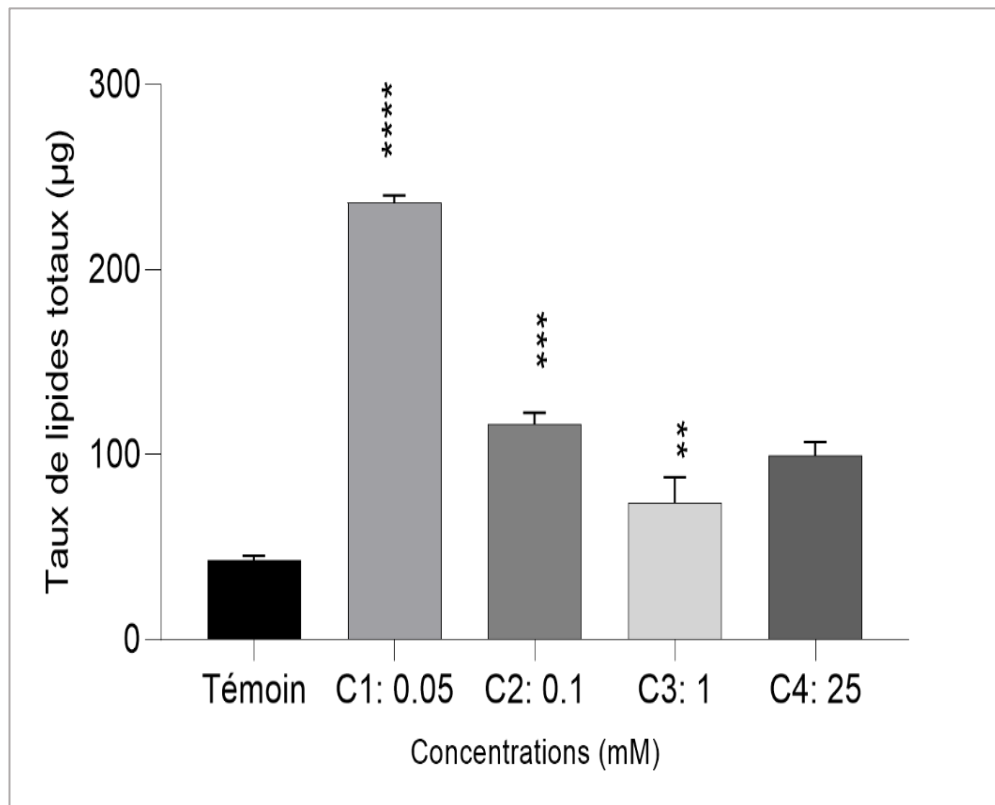


Figure 25 : Effet de l'Al sur la teneur en lipides totaux (μg) chez *S.cerevisiae*. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (25) met en évidence une augmentation très hautement significative du taux de lipides chez les cellules traitées par la plus faible concentration d'Al avec une valeur de l'ordre de $236\mu\text{g}$ ($p < 0.0001$) par rapport aux témoins qui ne dépassent pas $43\mu\text{g}$. A partir de la concentration C2, on note une augmentation hautement significative et très significative pour C4 avec des valeurs respectives de l'ordre de $116.3\mu\text{g}$ ($p = 0.0002$) et $99.2\mu\text{g}$ ($p = 0.0018$), ainsi l'analyse de variance ANOVA met en valeur une différence très hautement significative ($p < 0.0001$).

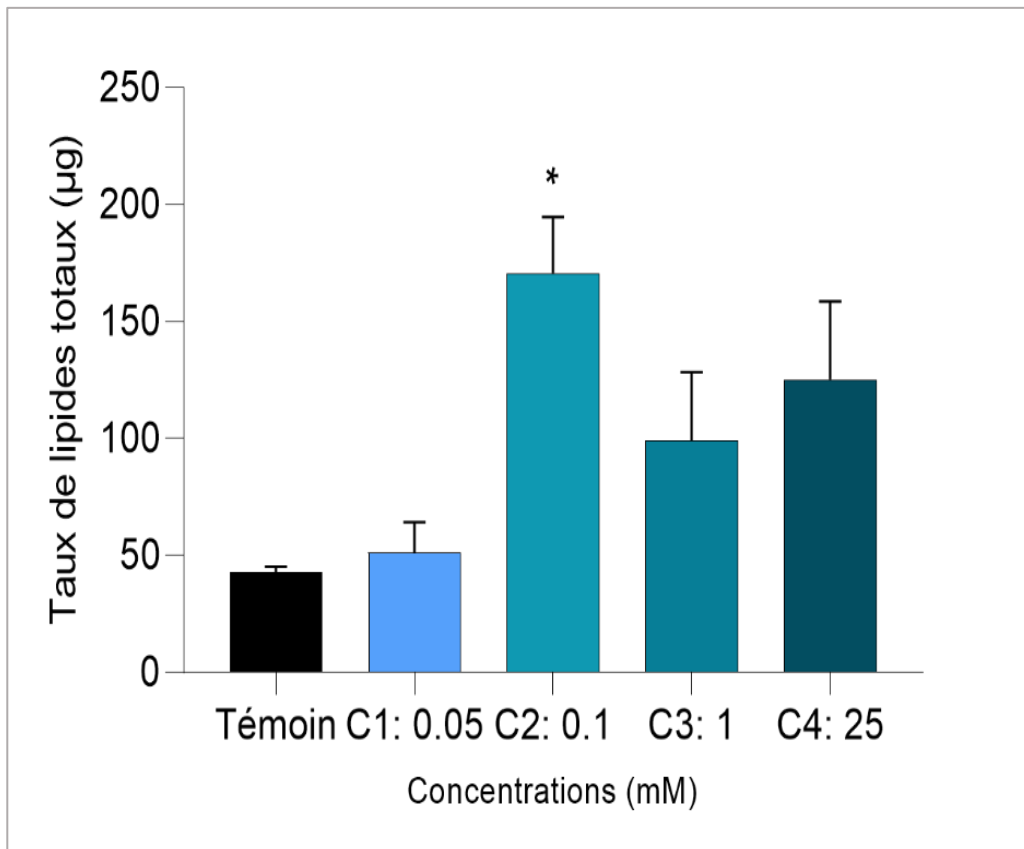


Figure 26 : Effet du Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (μg) chez *S.cerevisiae*. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Le traitement par les différentes concentrations du Cr(VI) induit une augmentation significative ($p=0.0162$) du taux des lipides totaux chez les cellules traitées par C2Cr avec une valeur de $170.6\mu\text{g}$ par rapport aux témoins ($43\mu\text{g}$) (Figure 26). Ainsi, Le test ANOVA indique des résultats significatifs ($p=0.0162$).

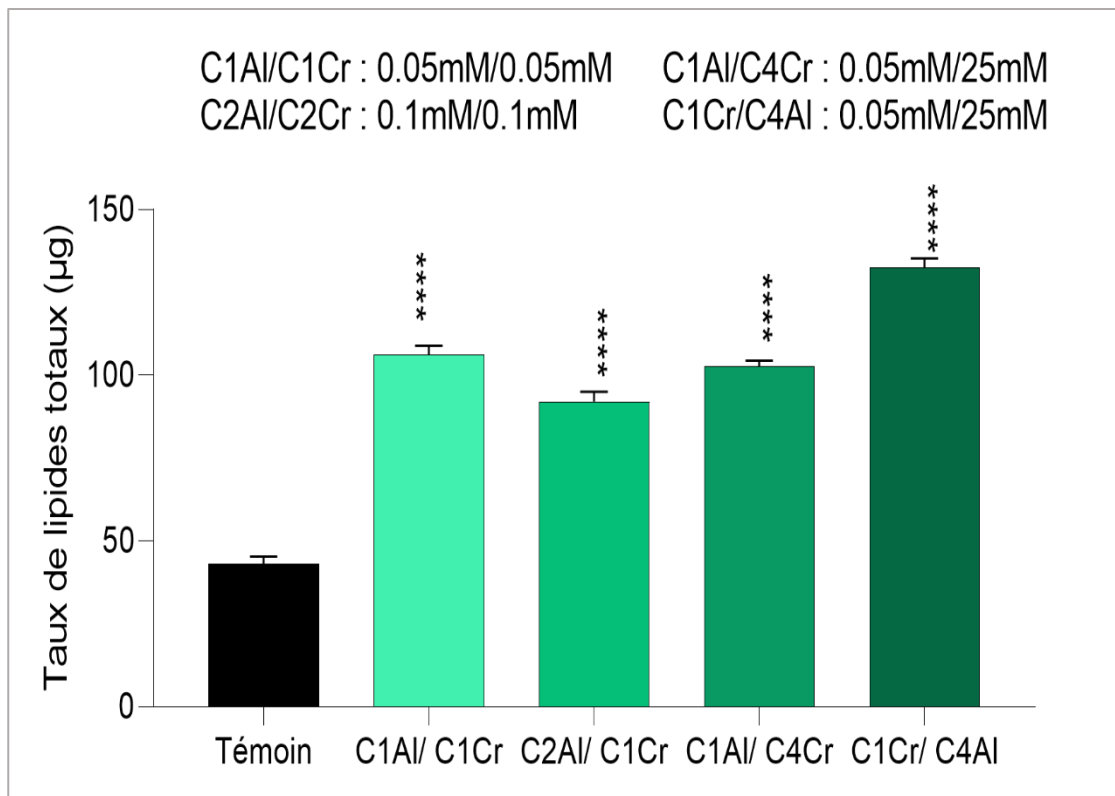


Figure 27 : Effet de la mixture de concentrations d'Al/Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (μg) chez *S.cerevisiae*. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Il en est de même concernant la mixture Al/Cr (Figure 27) où nous notons un taux 102.6 μg chez les traitées par la mixture C1Cr/C4Al et ce comparativement aux témoins dont le taux de lipides est de 43 μg . Dans ce cas, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.0001$).

5.2.Cas des paramécies

a- Evolution du taux de protéines totales :

Les figures (28), (29) et (30) montrent l'effet des concentrations croissantes d'Al, de Cr(VI) et de leur combinaison (Al/Cr(VI)) sur la variation du taux de protéines totales chez les paramécies.

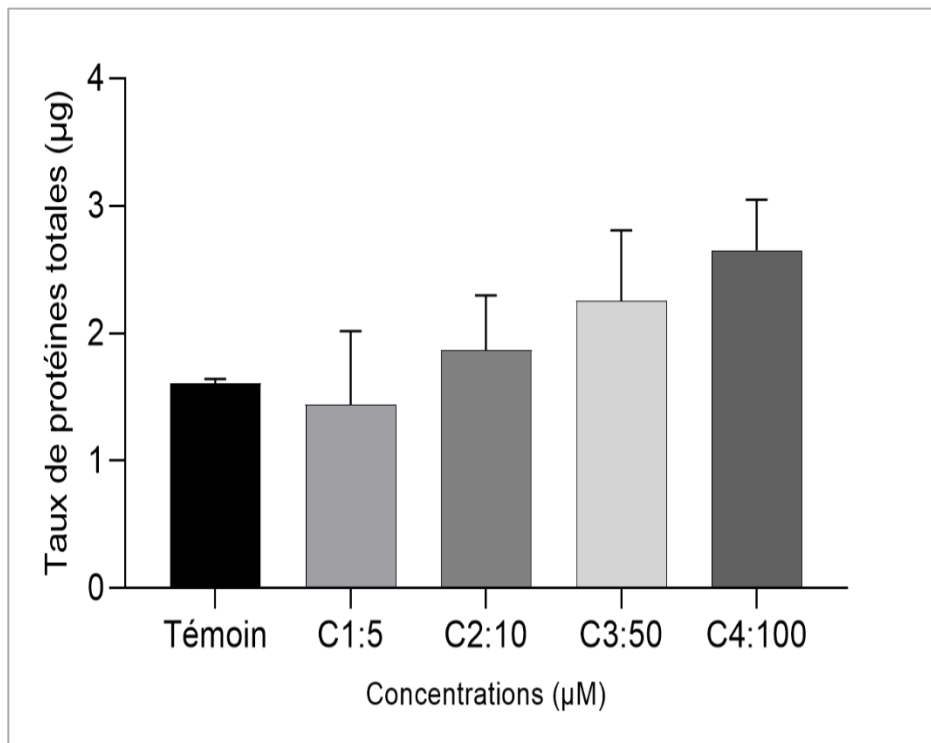


Figure 28 : Effet des concentrations croissantes des sels d'Al sur le taux de protéines totales (µg) chez les paramécies.

Nos résultats mettent en évidence une augmentation Dose-Dépendante du taux de protéines totales chez *Paramecium sp* exposées à des concentrations croissantes des sels d'Aluminium. Ainsi, pour les traitées par la plus forte concentration C4, le taux de protéines totales est de l'ordre de 2.31µg comparativement aux cellules témoins dont le taux est 1.28µg (Figure 28).

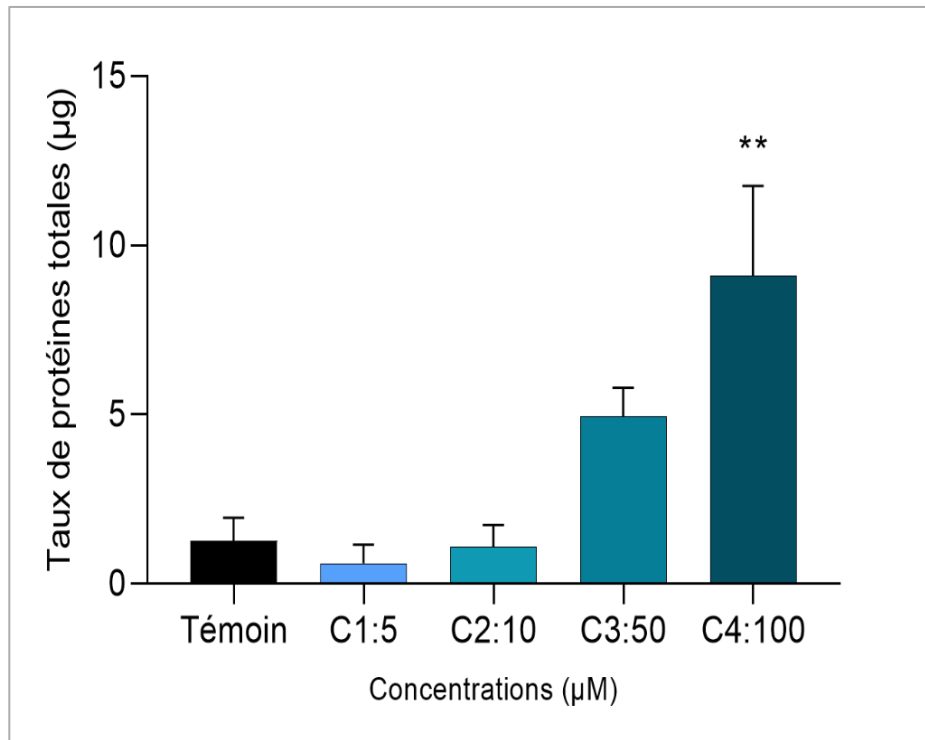


Figure 29 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur la teneur en protéines totales (μg) chez les paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Chez les paramécies traitées par les concentrations croissantes de Cr(VI), nous remarquons une augmentation du taux de protéines totales, particulièrement importante et très significative ($p = 0,0067$) chez celles exposées à la C3 et C4 avec des valeurs respectives de l'ordre de $4.95\mu\text{g}$. et $9.10\mu\text{g}$ comparativement aux témoins ($1.28\mu\text{g}$). Ainsi, l'analyse des variations ANOVA révèle une différence très significative ($p = 0.0050$) (Figure 29).

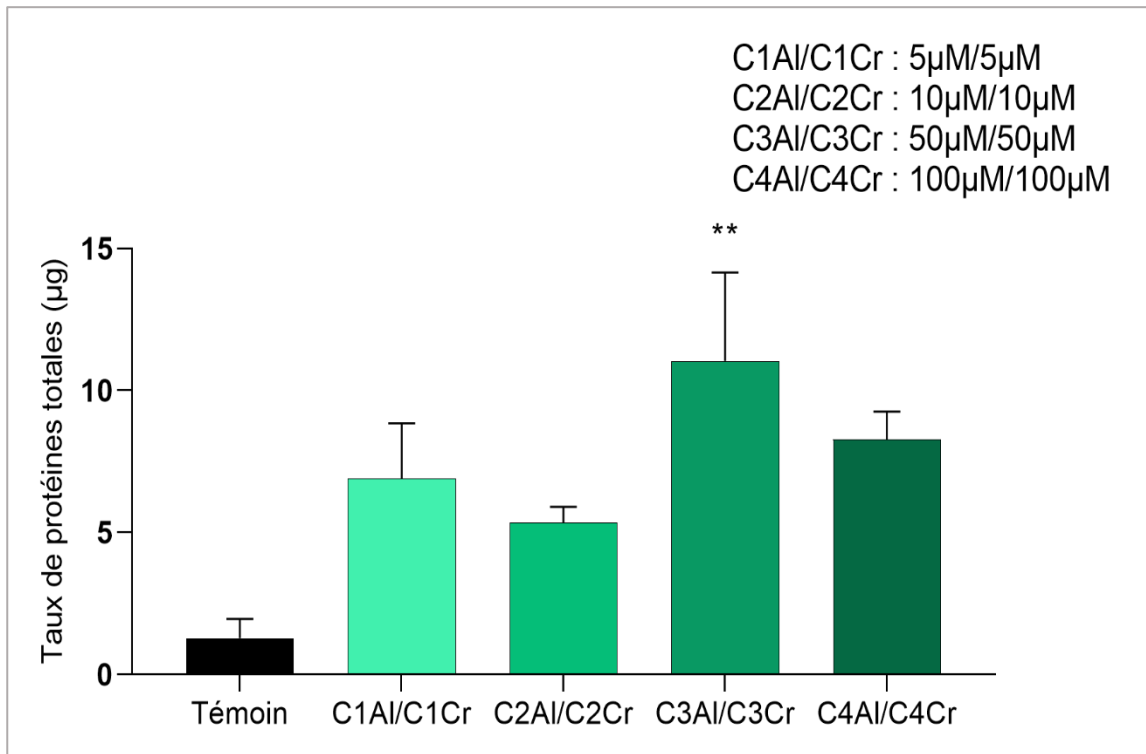


Figure 30 : Effet de la mixture de concentrations d'Al/Cr(VI) sur le taux de protéines totales (μg) chez les paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

L'évolution du taux de protéines totales chez les paramécies exposées à la mixture Al/Cr(VI) est illustrée dans la Figure (30). Nous constatons une augmentation très significative ($p = 0,0090$) chez les paramécies traitées par C3Al / C3Cr avec un taux qui atteint $11.03\mu\text{g}$ par rapport aux cellules témoins qui ne dépassent pas les $1.28\mu\text{g}$. Ainsi l'étude ANOVA indique une différence significative ($p = 0.0279$).

c- Evolution des teneurs en lipides totaux :

Les figures (31), (32) et (33) mettent en évidence l'impact de l'Al, du Cr(VI) et de leur mixture (Al/Cr(VI)) sur le taux de lipides totaux chez *Paramecium sp.*

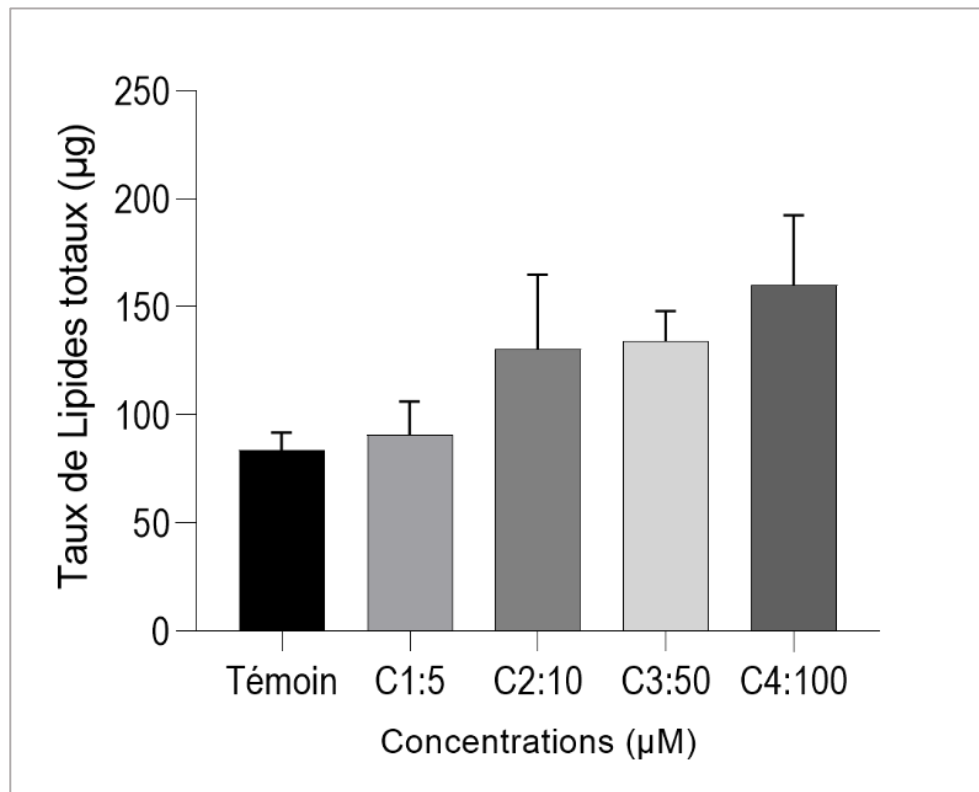


Figure 31 : Effet des concentrations croissantes d'Al sur le taux de lipides totaux (μg) chez les paramécies.

La figure (31) met en évidence une augmentation dose-dépendante du taux de lipides totaux atteignant une valeur de l'ordre de $160\mu\text{g}$ chez les cellules exposées à C4 comparativement aux cellules témoins qui atteignent un taux de l'ordre de $83.85\mu\text{g}$.

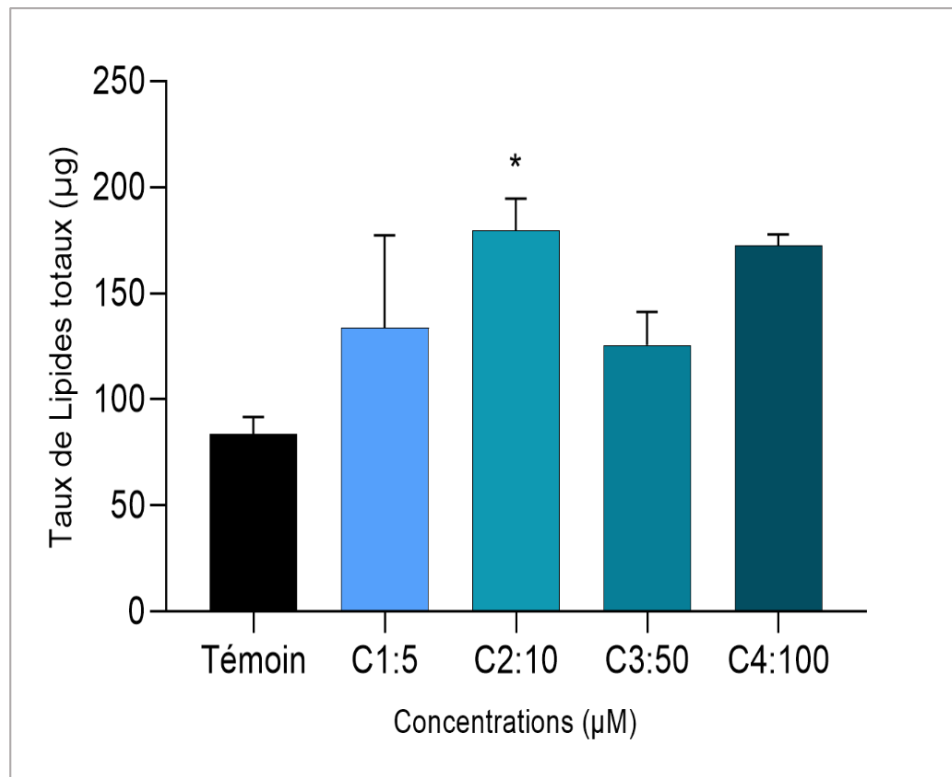


Figure 32 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (μg) chez les paramécies. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (32) met en évidence une augmentation du taux de lipides totaux chez les paramécies traitées par Cr(VI). Cette élévation est significative ($p = 0,0469$) chez les cellules exposées à C2 avec un taux de l'ordre de $179.75\mu\text{g}$ atteignant une valeur de l'ordre de $172.56\mu\text{g}$ chez celles traitées avec C4 contrairement aux témoins qui ne dépassent pas $83.85\mu\text{g}$.

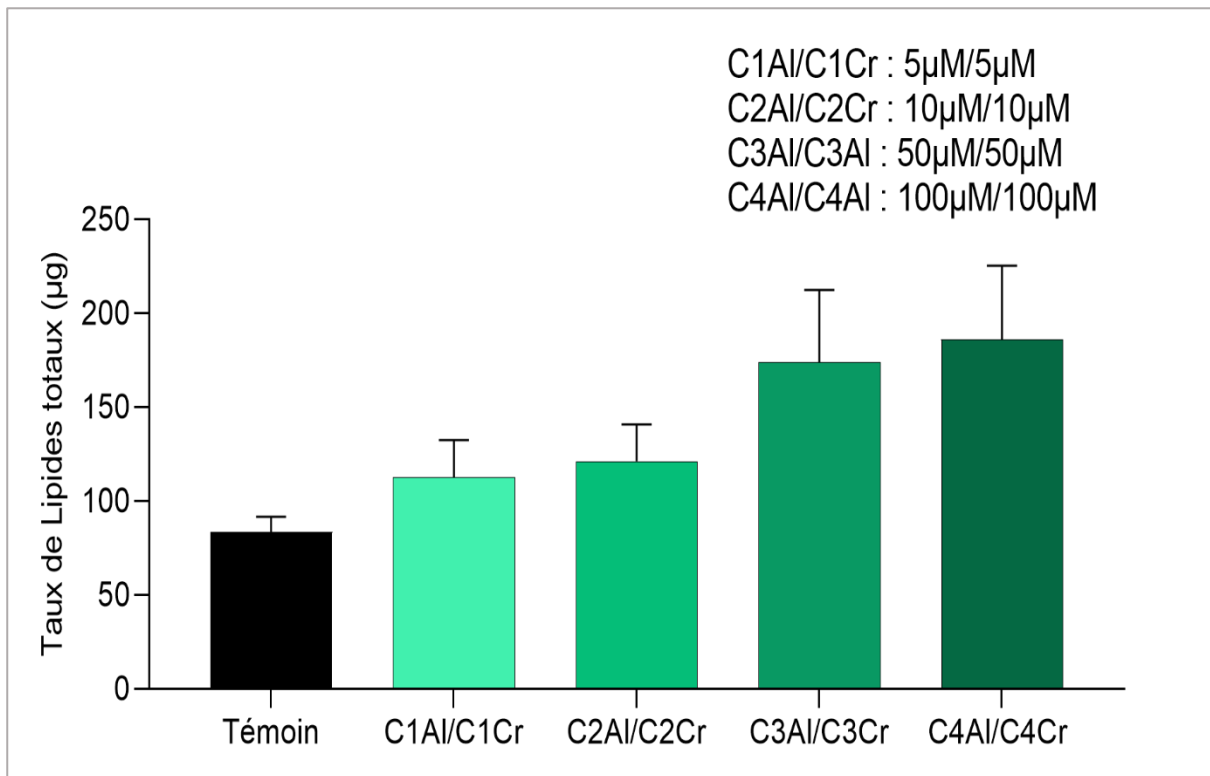


Figure 33: Effet de la mixture Al/Cr(VI) sur le taux de lipides totaux (µg) chez les paramécies.

Nous remarquons une augmentation dose-dépendante du taux de lipides totaux chez les paramécies exposées au mélange Al/Cr(VI) (Figure 33). Chez les paramécies traitées par C4Al/C4Cr le taux lipides totaux est de l'ordre de 186.41µg comparativement aux cellules témoins dont le taux n'est que de 83.58µg.

6. Effet des métaux sur l'évolution des bio-marqueurs du stress oxydatif

6.1. Cas des levures

a- Evolution de l'activité catalase (CAT) :

Les figures (34), (35) et (36) mettent en évidence l'impact des concentrations croissantes d'Al, de Cr(VI) et de leur mixture Al/Cr(VI) sur l'activité catalase (CAT) chez *Saccharomyces cerevisiae*.

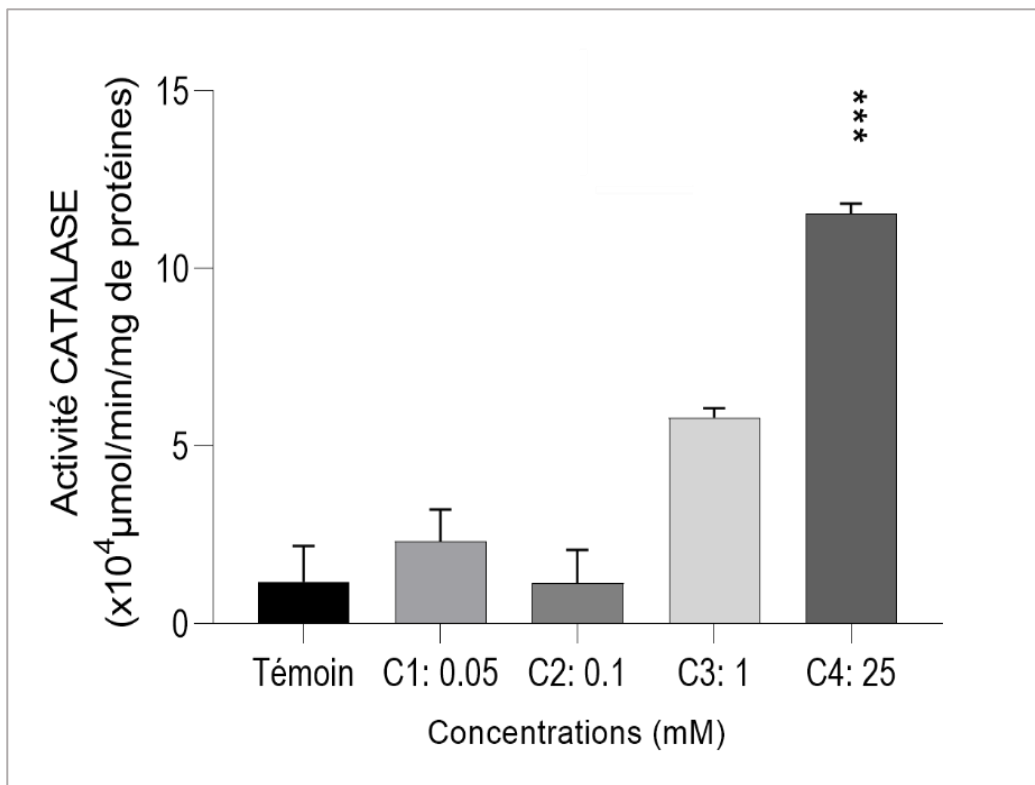


Figure 34 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par les sels d'Al ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (34) révèle une induction de l'activité catalase chez les traitées par la plus forte concentration d'Al. Cette stimulation est hautement significative ($p=0.0001$) avec une valeur de l'ordre de $11.5 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins dont l'activité catalase ne dépasse pas $1.6511.5 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. L'analyse de variance ANOVA révèle des résultats très hautement significatifs ($p < 0.0001$).

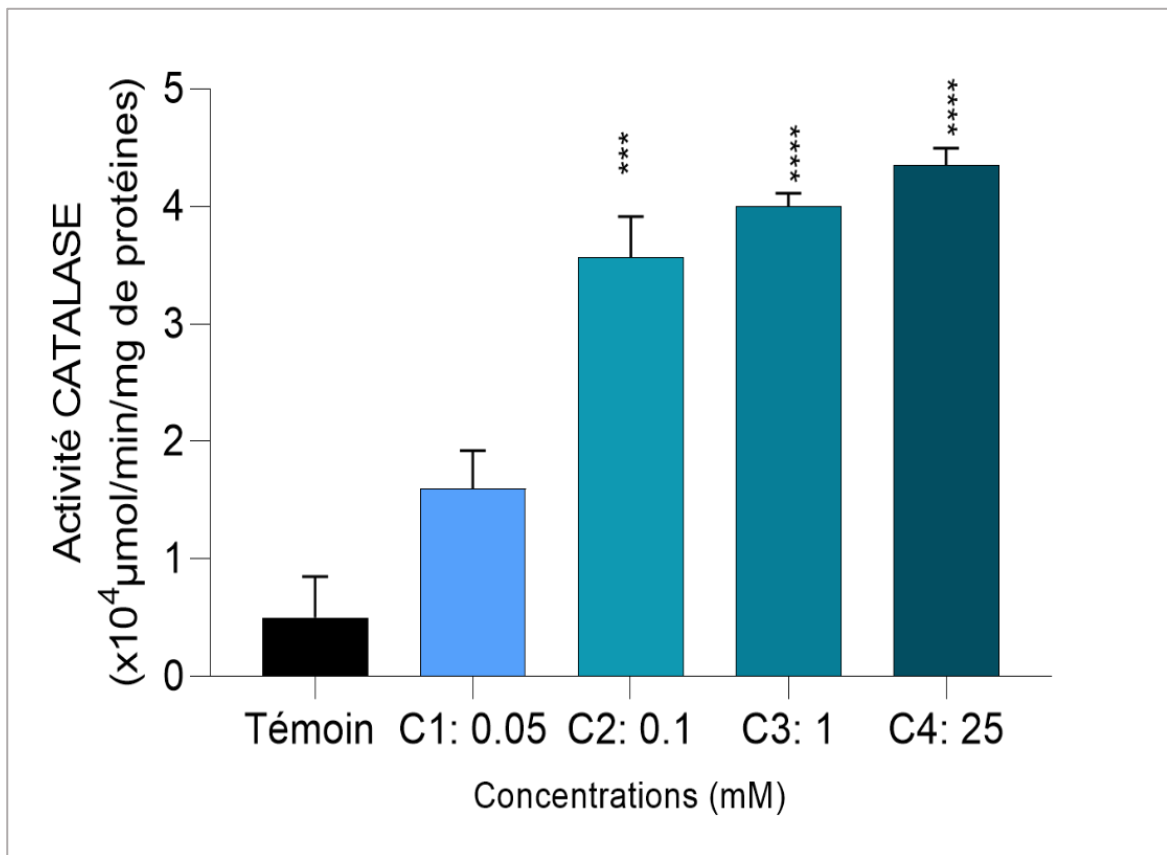


Figure 35 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par le Cr(VI) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous constatons également une stimulation dose-dépendante et hautement significative chez les traitées par C2 ($p=0.0001$) avec une valeur de $3.60 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, et très hautement significative chez les cellules exposées à C4 ($p < 0.0001$) avec une valeur de $4.35 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins ($1.6511.5 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) (Figure 35). L'analyse de variance ANOVA révèle des résultats très hautement significatifs ($p < 0.0001$).

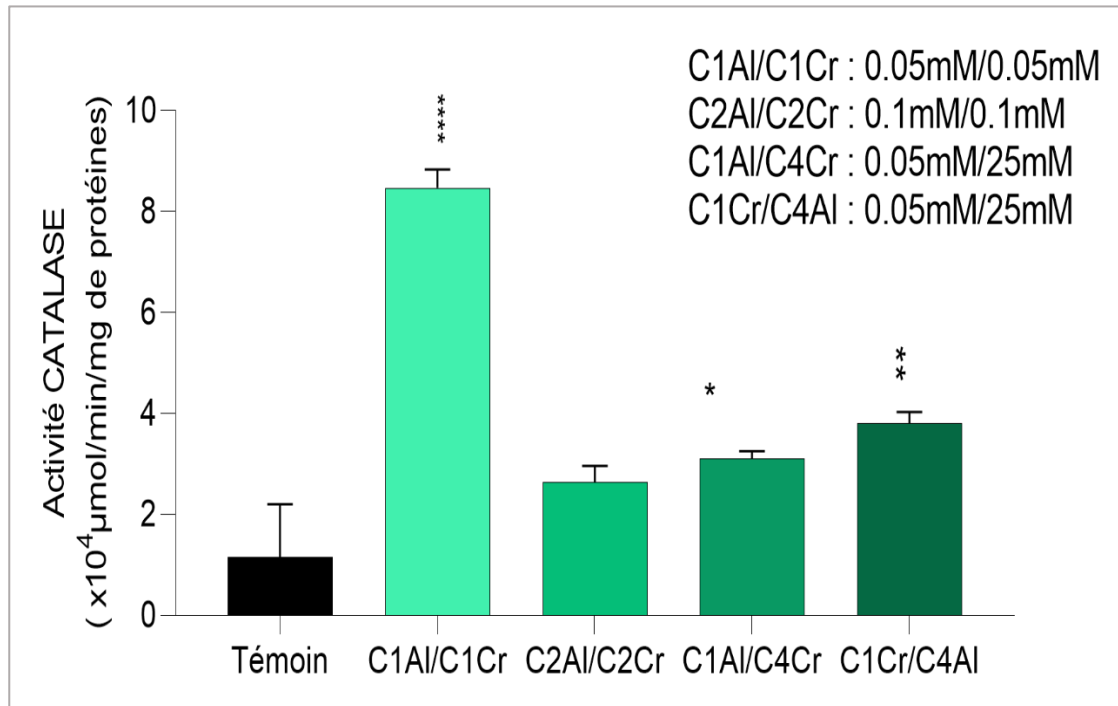


Figure 36 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les levures témoins et traitées par la mixture Al/Cr(VI) (μmol/min/mg de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La figure (36) met en évidence une stimulation très hautement significative de l'activité catalase après traitement à la combinaison C1Al/C1Cr ($p < 0.0001$) avec une valeur de l'ordre de 8.60 μmol /min/mg de protéines. Ainsi, la stimulation est significative chez les levures traitées par C1Al / C4Cr ($p = 0.0340$) et très significative pour C1Cr/ C4Cr ($p = 0.0063$) avec des valeurs respectives de 3.20 et 3.60 μmol /min/mg de protéines et ce contrairement aux témoins qui ne dépassent pas 1.65 μmol /min/mg de protéines. Ainsi, l'analyse de variance ANOVA révèle des résultats très hautement significatifs ($p < 0.0001$).

b- Evolution du taux de Glutathion (GSH) :

Les figures (37), (38) et (39) montrent l'impact d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture sur le taux de Glutathion (GSH) chez les levures traitées et témoins.

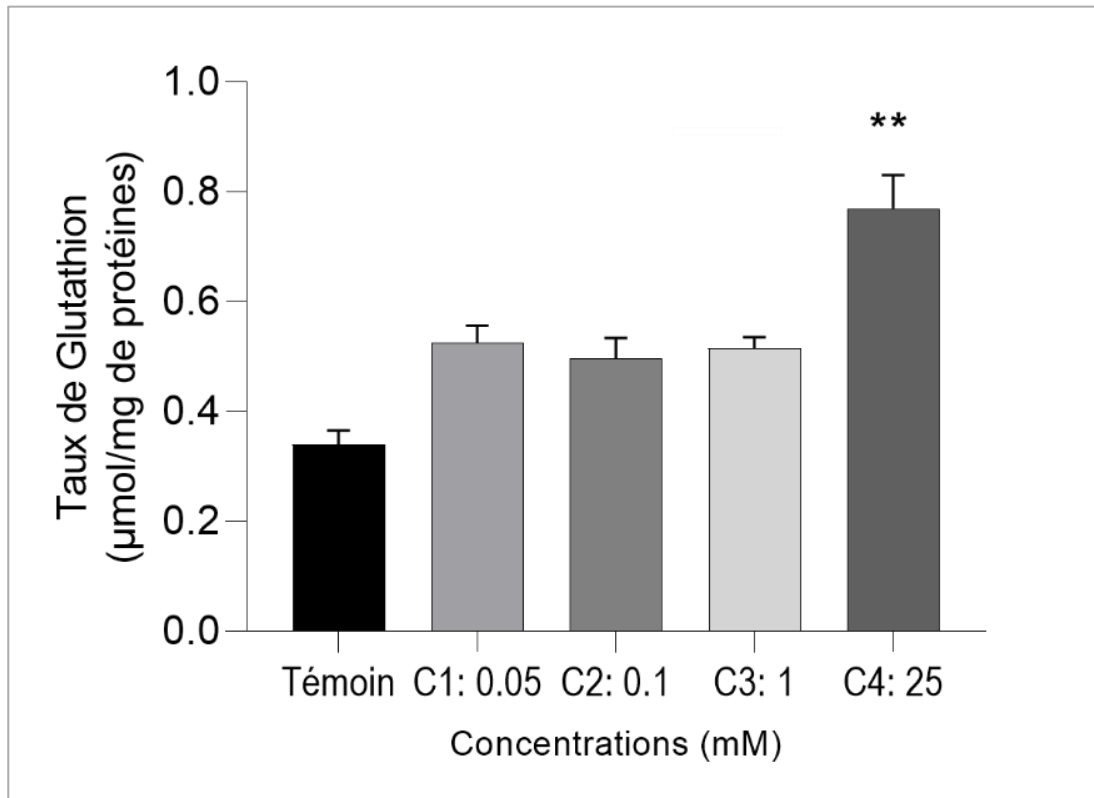


Figure 37 : Evolution du taux de Glutathion (GSH) chez les levures témoins et exposées aux sels d'Al ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous constatons une augmentation très significative ($p=0.00632$) chez les levures traitées avec la plus forte concentration C4 avec une valeur de l'ordre de $0.76 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins qui atteignent une valeur de l'ordre de $0.40 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines. Ainsi, l'étude de variance ANOVA met en évidence une différence très significative ($p=0.0002$).

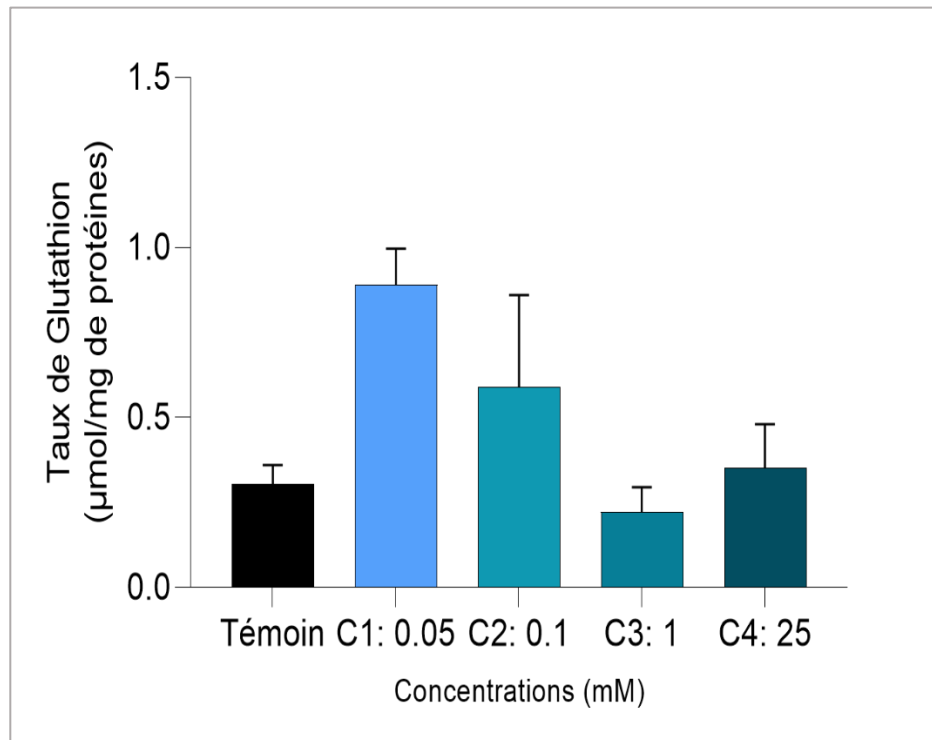


Figure 38 : Teneur en Glutathion (GSH) chez les levures témoins et traitées par le Cr (IV) ($\mu\text{mol/mg}$ de Prot).

La figure (38) met en évidence l'évolution du taux de Glutathion chez *Saccharomyces cerevisiae* témoins et traitées par le Cr(VI). Nous notons une augmentation du taux de GSH principalement chez les levures exposées à C1 et C2 avec des valeurs respectives de l'ordre de $0.890 \mu\text{mol/mg}$ de protéines et $0.920 \mu\text{mol/mg}$ de protéines. Cependant, nous remarquons une légère diminution chez les cellules traitées par C3 ($0.22 \mu\text{mol/mg}$ de protéines) et C4 ($0.352 \mu\text{mol/mg}$ de protéines), et ce par rapport aux témoins dont le taux de GSH ne dépasse pas $0.40 \mu\text{mol/mg}$ de protéines.

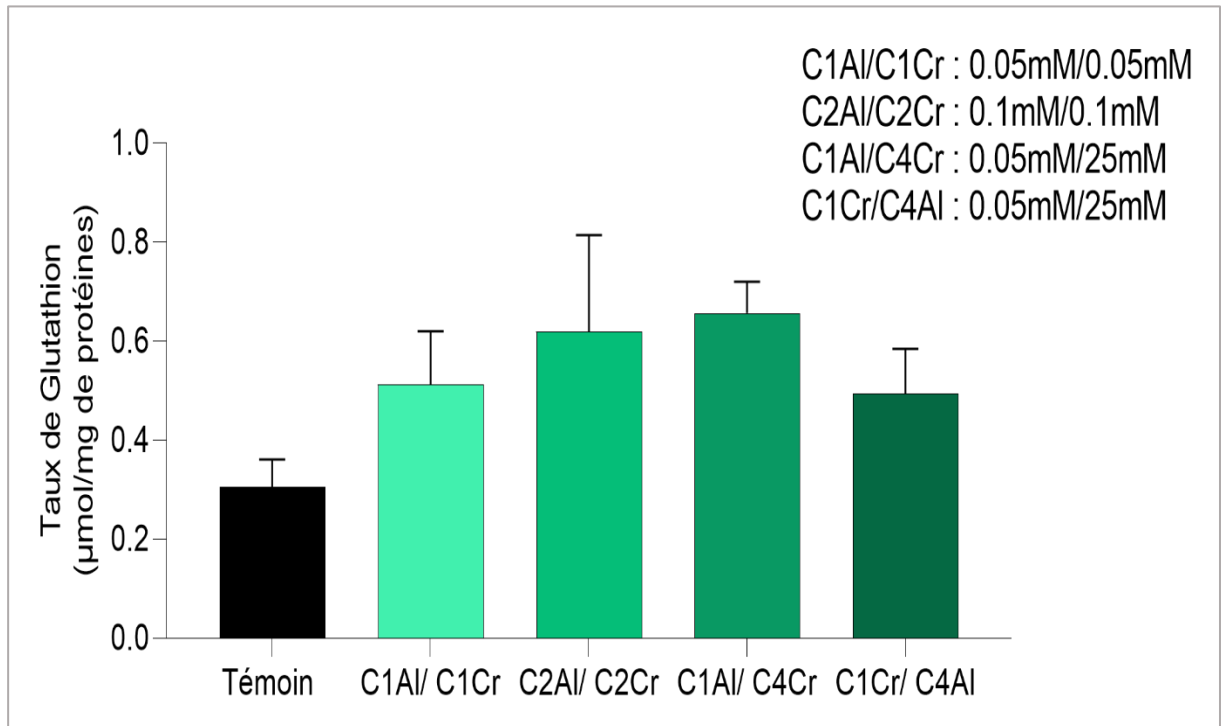


Figure 39 : Effet de la mixture Al/Cr(VI) sur le taux de Glutathion (GSH) chez les levures ($\mu\text{mol/mg}$ de Prot).

Par ailleurs, le traitement de *Saccharomyces cerevisiae* par la mixture métallique Al/Cr(VI) induit également une augmentation du taux de Glutathion (Figure39). Nous observons des valeurs élevées particulièrement à la combinaison C1Al/C4Cr avec une valeur de l'ordre de $0.657 \mu\text{mol/mg}$ de protéines contrairement aux témoins qui ne dépassent pas $0.40 \mu\text{mol/mg}$ de protéines.

c- Evolution de l'Activité Glutathion S-transférase (GST) :

Les figures (40), (41) et (42) mettent en évidence l'évolution de l'activité GST chez les levures témoins et exposées respectivement à l'Al, au Cr(VI) et à leurs mélanges

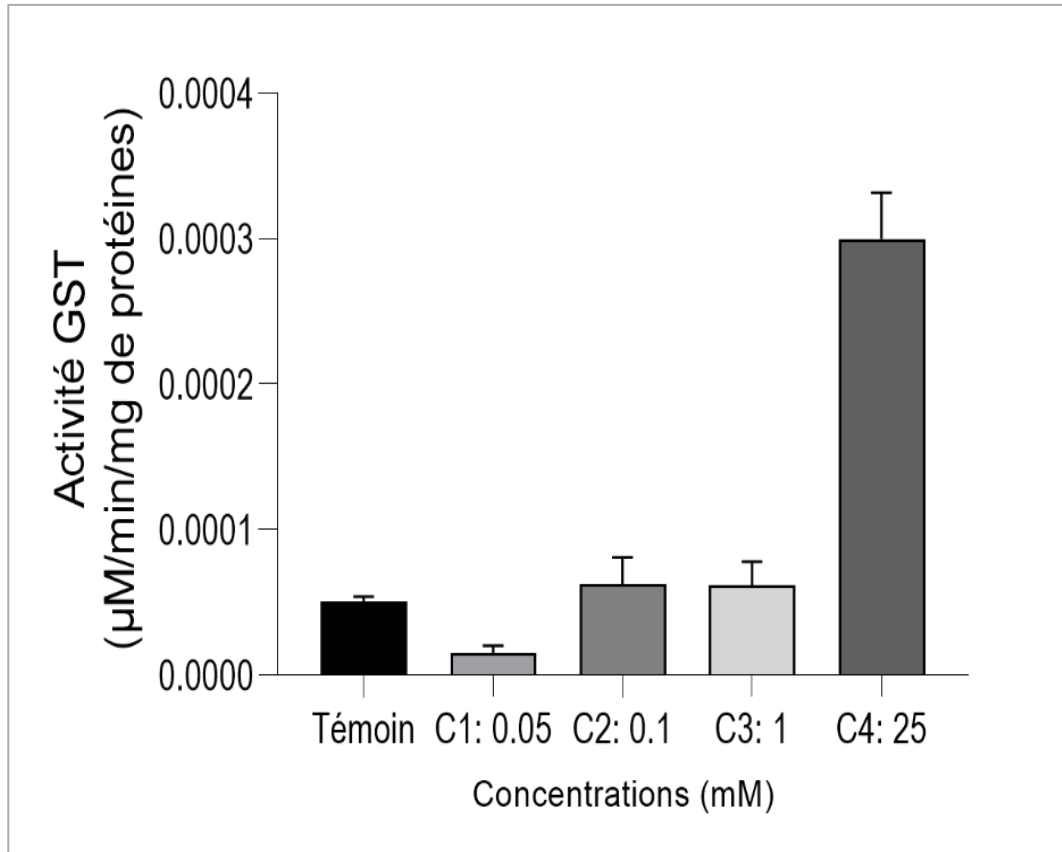


Figure 40 : Evolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes d'Al (µM/min/mg de Prot).

Nous constatons une augmentation de l'activité Glutathion S-transférase chez les cellules traitées les concentrations d'Al (Figure 40) particulièrement pour par la plus forte concentration C4 atteignant une valeur de l'ordre de 0.000303 µmol/mg de protéines comparativement aux témoins qui ne dépassent pas 0.000082 µmol/mg de protéines. L'étude de variance ANOVA révèle une différence très hautement significative ($p < 0.0001$).

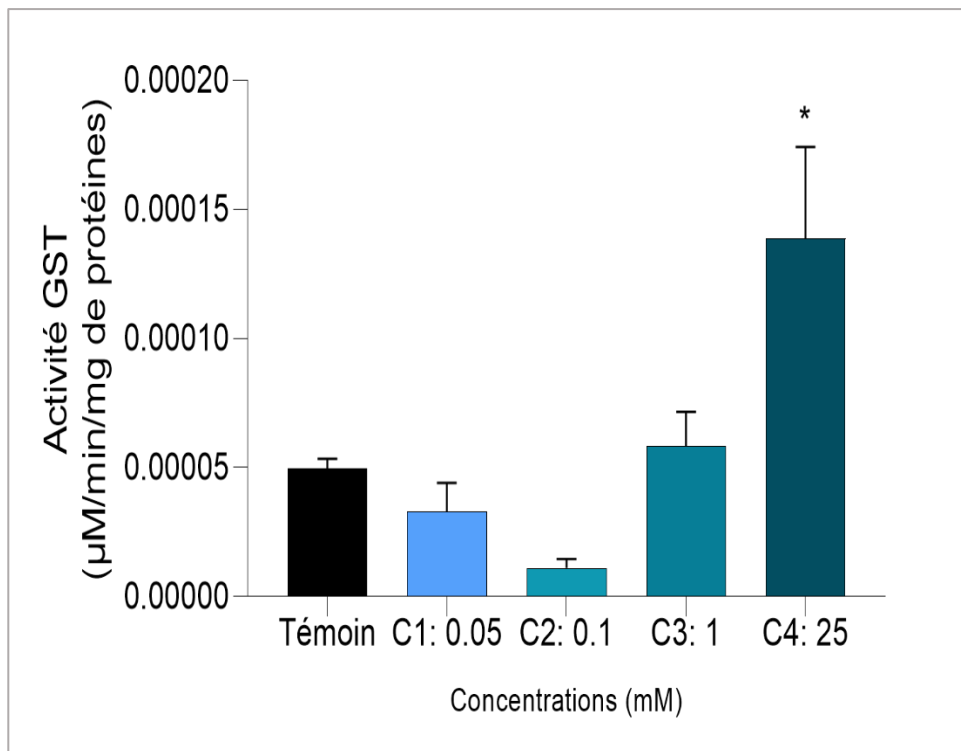


Figure 41 : Evolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes de C(IV) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Le traitement de *Saccharomyces cerevisiae* par des concentrations croissantes de Cr(VI) (Figure 41) révèle une stimulation significative ($p = 0.122$) de l'activité GST chez les levures traitées par la plus forte concentration C4 avec une valeur de l'ordre de $0.000397 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins dont l'activité GST ne dépasse pas $0.000082 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines. L'étude de variance ANOVA indique une différence très significative ($p = 0.0071$).

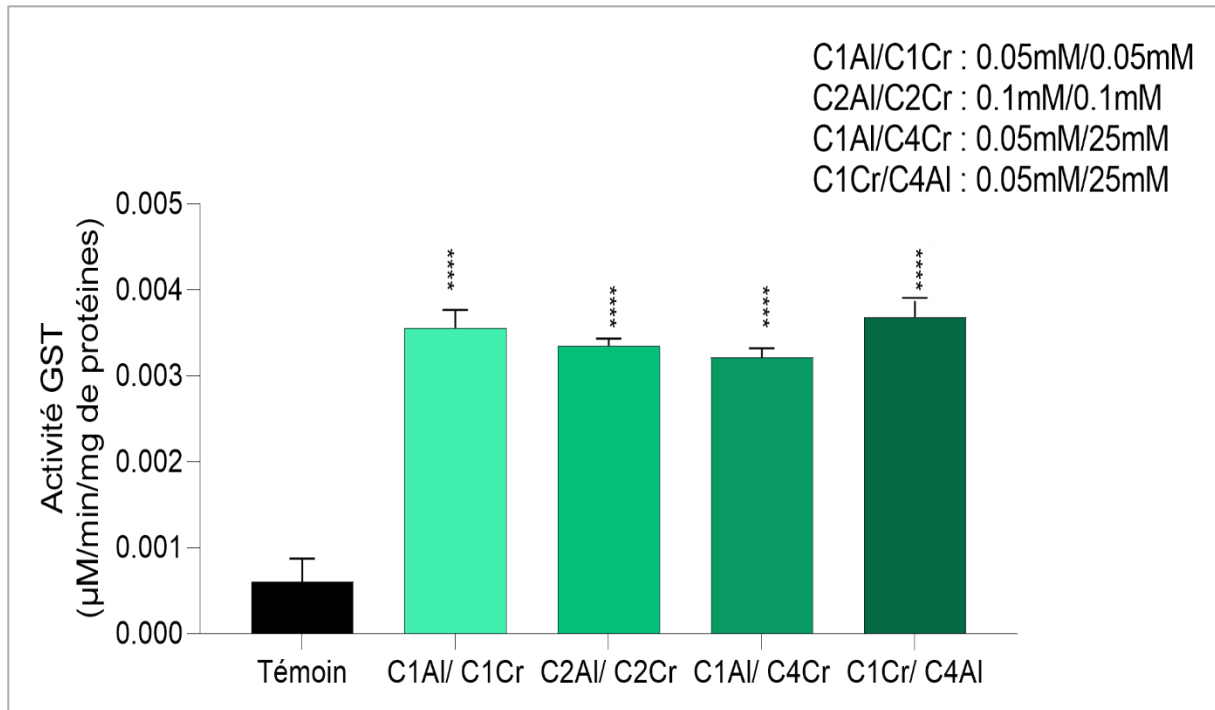


Figure 42 : Evolution de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) chez les levures témoins et traitées par les mixtures (Al/Cr(VI)) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

L'exposition des levures au mélange Al/Cr(VI) a induit une augmentation très hautement significative ($p < 0.0001$) de l'activité GST chez les cellules traitées par toutes les combinaisons, où nous remarquons que la valeur la plus élevée est notée chez les cellules traitées par la combinaison C1Cr/ C4Al avec une valeur de l'ordre de $0.002043 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines par rapport aux témoins dont l'activité GST ne dépasse pas $82 \times 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

Ainsi, l'analyse de variance ANOVA révèle une différence très hautement significative ($p < 0.0001$).

d- Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) :

Les figures (43), (44) et (45) montrent l'évolution du taux de Malondialdéhyde chez les cellules témoins et traitées par les deux métaux et leurs mixtures.

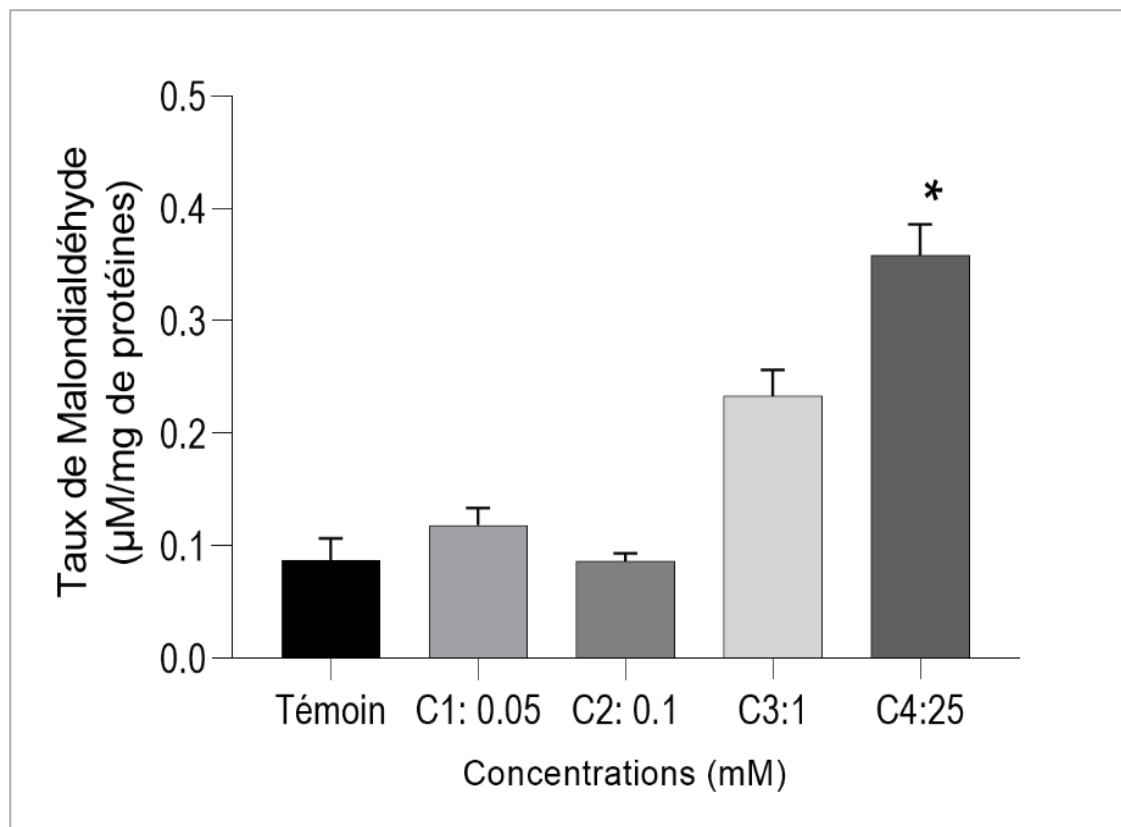


Figure 43 : Teneur en Malondialdéhyde (MDA) chez les levures témoins et traitées par les sels d'Al ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous remarquons une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les levures traitées par la plus forte concentration d'Al (C4) avec un taux de l'ordre de $0.358 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines et ce par rapport aux cellules témoins dont le taux ne dépasse pas $0.087 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. De plus, l'analyse de la variance ANOVA révèle une différence très hautement significative ($p < 0.0001$).

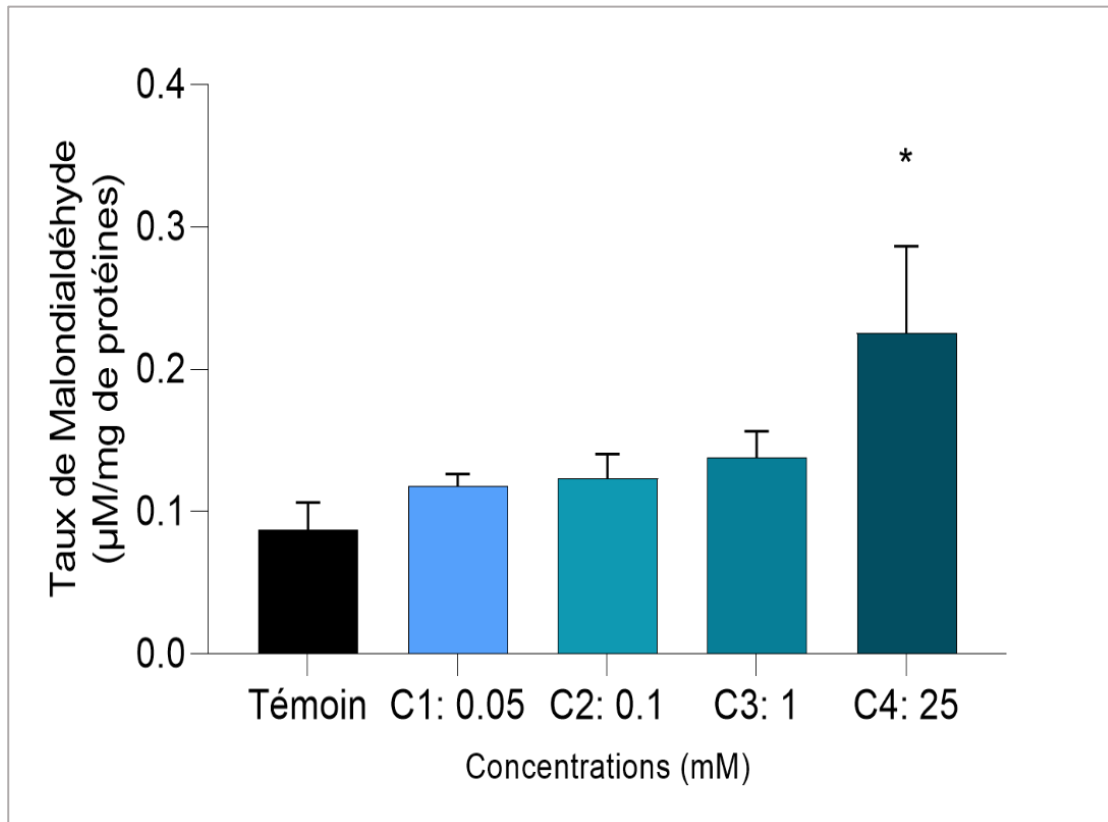


Figure 44 : Evolution du taux de MDA chez les levures témoins et traitées par les concentrations croissantes de Cr(VI) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La Figure (44) met en évidence une augmentation significative ($p=0.0326$) chez les traitées par C4 avec un taux de l'ordre de $0.225 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins dont le taux ne dépasse pas $0.087 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines.

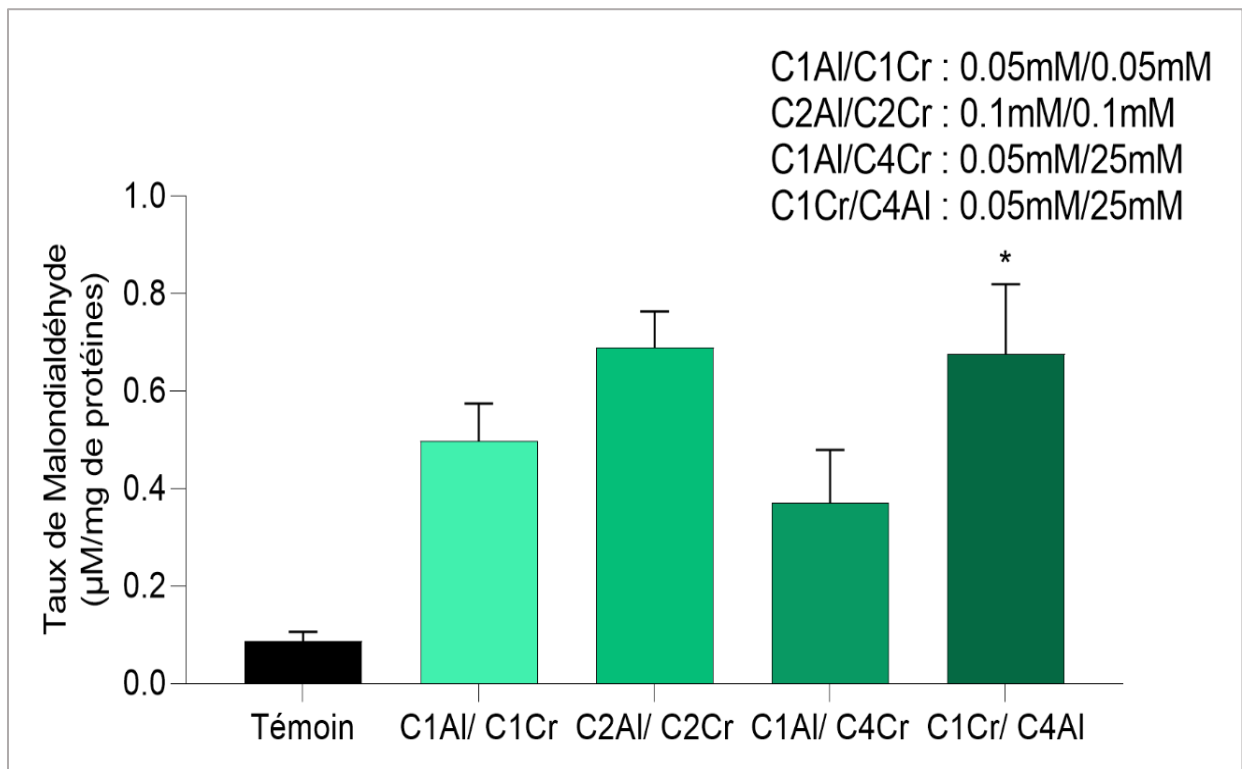


Figure 45 : Evolution du taux de MDA chez les levures témoins et traitées avec les mixtures de concentrations d'Al/Cr ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La figure (45) met en évidence une augmentation du taux de Malondialdéhyde (MDA) chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nous constatons que la valeur la plus élevée est notée chez les levures exposées à C1Cr/C4Al ($p=0.016$) contrairement aux témoins dont le taux de MDA est de l'ordre de $0.087\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. Ainsi, l'étude ANOVA révèle des résultats très significatifs ($p=0.0407$).

6.2.Cas des paramécies

a- Evolution de l'activité catalase (CAT):

Les figures (46), (47) et (48) mettent en évidence l'impact des concentrations croissantes d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture (Al/Cr(VI)) sur l'activité catalase chez *Paramecium sp.*

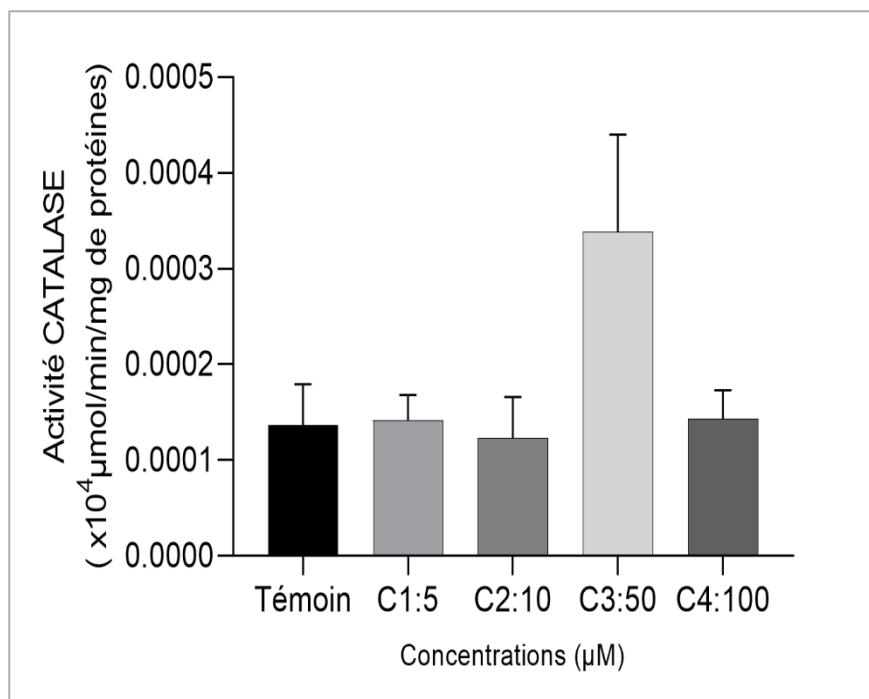


Figure 46 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies témoins et en présence de concentrations croissantes d'Al ($\mu\text{mol/min/mg de Prot}$).

Les résultats illustrés dans la Figure (46) mettent en évidence une induction de l'activité catalase particulièrement chez les paramécies traitées avec C3 avec une valeur qui atteint $0.00033 \times 10^4 \mu\text{mol/min/mg de protéines}$ comparativement aux cellules témoins qui ne dépassent pas une valeur de l'ordre de $0.00013 \times 10^4 \mu\text{mol/min/mg de protéines}$.

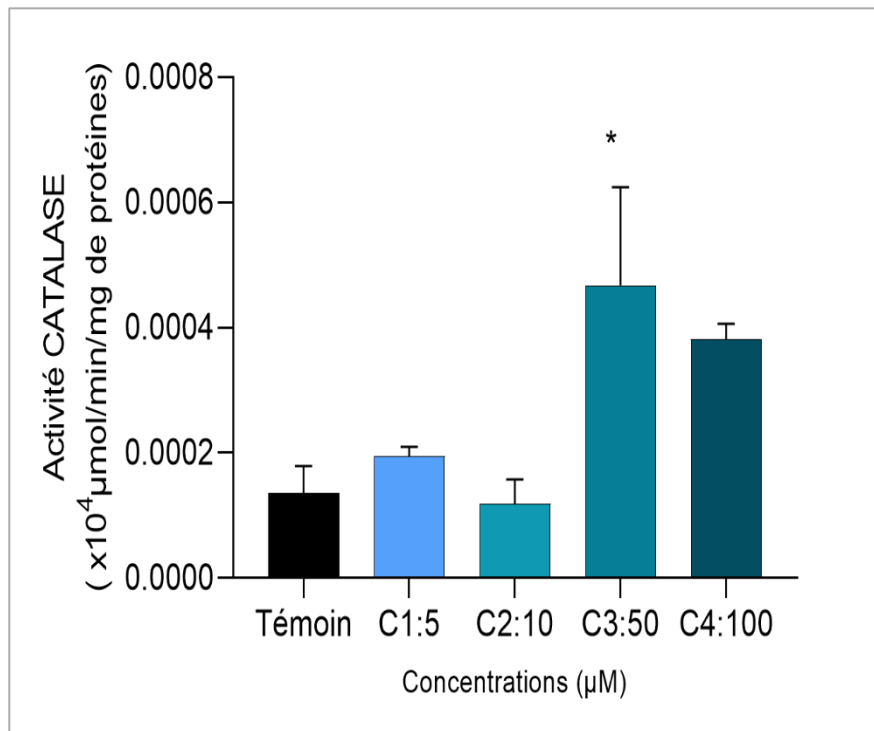


Figure 47 : Evolution de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies témoins et traitées avec les concentrations de Cr(VI) (μmol/min/mg de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Nous constatons que le traitement par les concentrations croissantes de Cr(VI) a provoqué également une stimulation de l'activité catalase, cette induction est significative ($p=0.036$) chez les cellules exposées à C3 avec une valeur de l'ordre de $0.00046 \times 10^4 \mu\text{mol/min/mg}$ par rapport aux témoins qui ne dépassent pas $0.00013 \times 10^4 \mu\text{mol/min/mg}$ de protéines (Figure 47). L'étude de variances ANOVA révèle une différence très significative ($p=0.0293$).

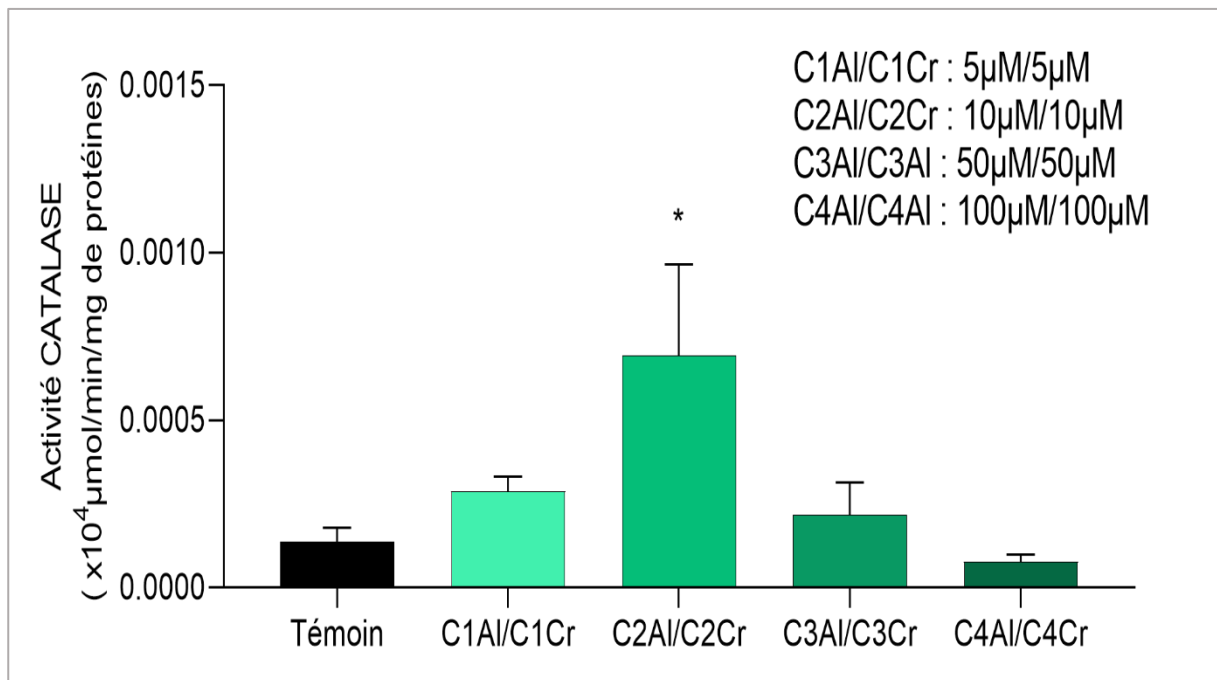


Figure 48 : Suivi de l'activité catalase (CAT) chez les paramécies en présence des différentes mixtures Al/Cr(VI) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (48) met en évidence une stimulation de l'activité catalase après exposition à la mixture Al/Cr, et ce particulièrement significative chez les cellules exposées à C2Al/C2Cr avec une valeur de l'ordre de $0.0068 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins dont la valeur est $0.00013 \times 10^4 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

b- Le taux de Glutathion (GSH) :

Les figures (49), (50) et (51) montrent l'impact des concentrations croissantes d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture (Al/Cr(VI)) sur le taux de Glutathion (GSH) chez *Paramecium sp*

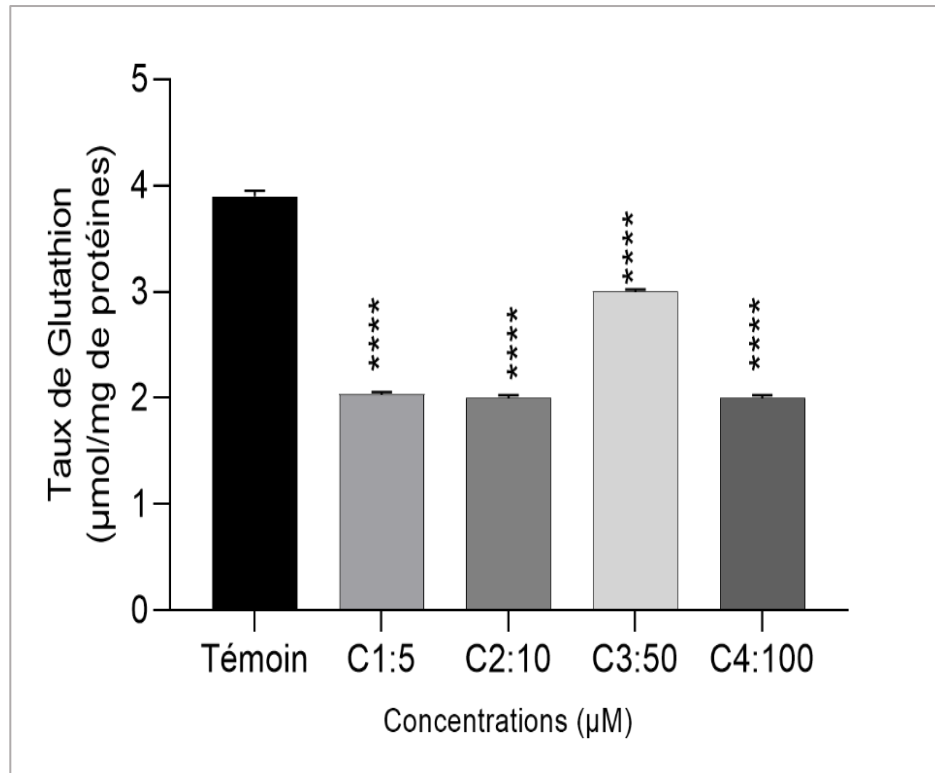


Figure 49 : Effet des sels d'Al sur le taux de Glutathion (GSH) chez les paramécies (µmol/mg de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (49) illustre une diminution du taux de Glutathion chez les paramécies traitées par les sels d'Aluminium. En effet, cette déplétion est très hautement significative ($p < 0.0001$) chez les paramécies exposées à toutes les concentrations d'Al. Où la valeur la plus élevée est notée chez les cellules traitées par C3 avec une valeur de l'ordre de 3 µmol/mg de protéines comparativement aux témoins qui atteignent 3.89 µmol/mg de protéines. Ainsi, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.0001$).

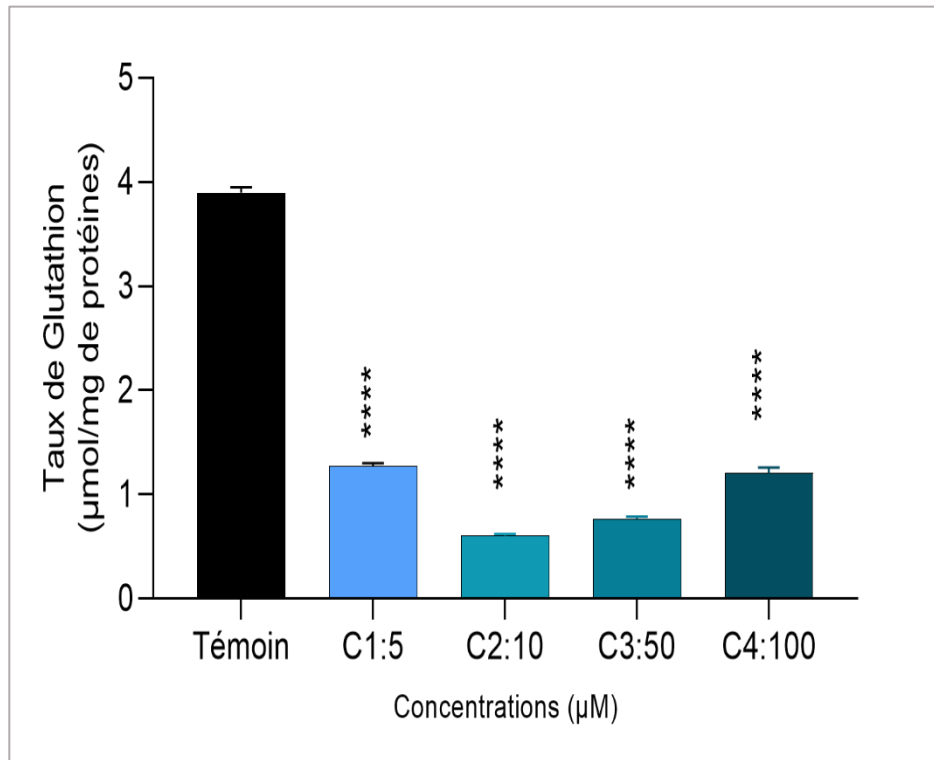


Figure 50 : Effet du Cr(VI) sur la teneur en Glutathion (GSH) chez les paramécies ($\mu\text{mol/mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

De plus, nous remarquons une diminution très hautement significative ($p < 0.0001$) du taux de GSH chez les cellules exposées à toutes les concentrations du Cr(VI). Chez les traitées par la plus forte concentration (C4), le taux de GSH atteint une valeur de l'ordre de $1.206 \mu\text{mol/mg}$ de protéines comparativement aux témoins avec un taux de $3.89 \mu\text{mol/mg}$ de protéines. L'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.0001$).

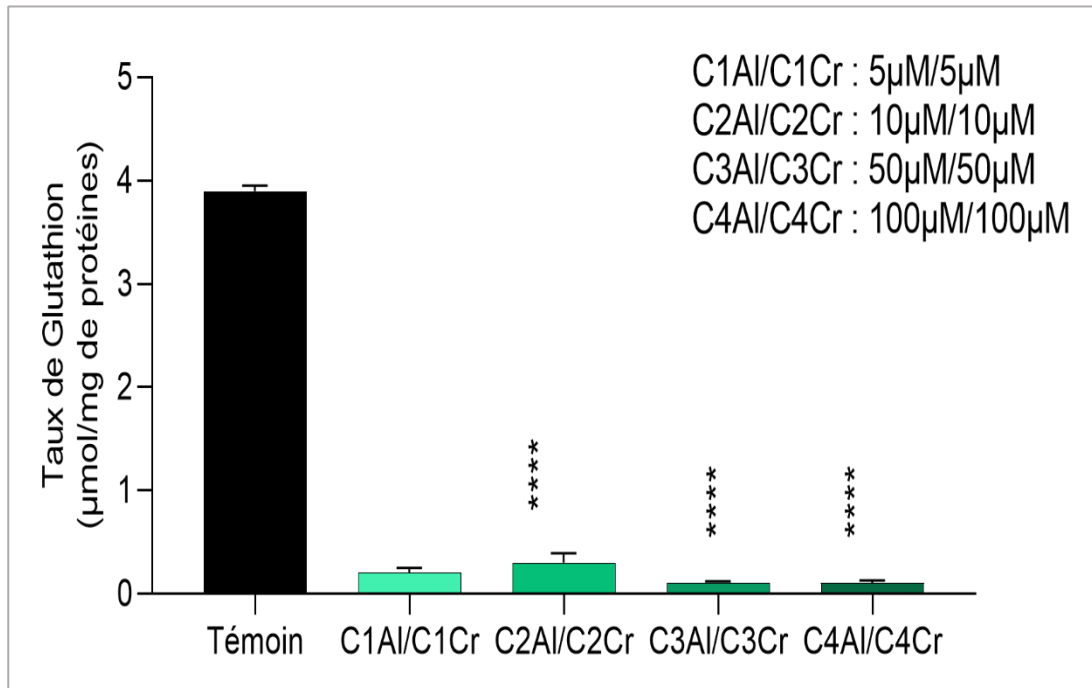


Figure 51 : Effet du mélange de concentrations Al/Cr(VI) sur le taux de Glutathion (GSH) chez les paramécies ($\mu\text{mol/mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous observons une diminution très hautement significative ($p < 0.0001$) chez les paramécies exposées aux différentes mixtures de concentrations. Cette déplétion est particulièrement notée chez les cellules exposées à C4Al/C4Cr avec une valeur de l'ordre de $0.107 \mu\text{mol/mg}$ de protéines comparativement aux témoins avec un taux de $3.89 \mu\text{mol/mg}$ de protéines. De plus, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatives ($p < 0.0001$).

c- Evolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) :

Les figures suivantes (52), (53) et (54) mettent en évidence l'impact des concentrations croissantes des métaux et leur combinaison sur l'évolution de l'activité GST des paramécies.

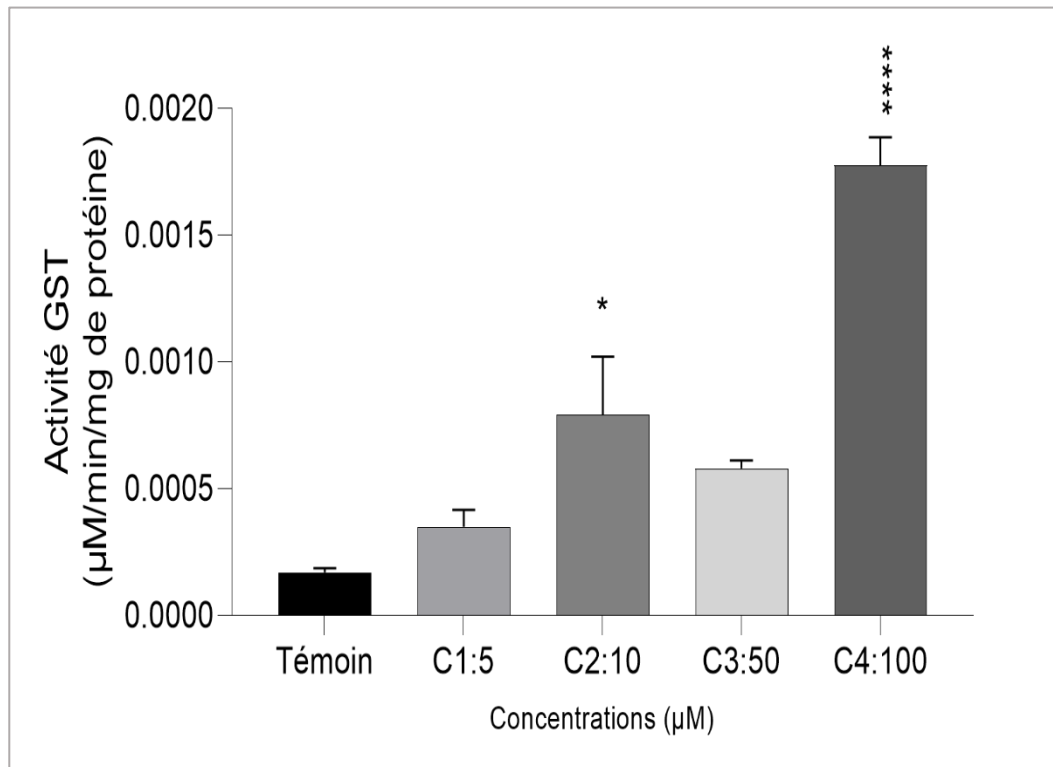


Figure 52 : Effet des concentrations croissantes d'Al sur le suivi de l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les paramécies ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Les résultats illustrés dans la figure (52) mettent en évidence une induction significative ($p = 0,0136$) de l'activité GST chez les paramécies traitées par C2 atteignant une valeur de l'ordre de $0,00079 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$. Cette stimulation est très hautement significative chez les paramécies exposées à la plus forte concentration (C4) ($P < 0,0001$) avec une valeur de l'ordre de $0,0017 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ comparativement aux témoins qui ne dépassent pas $0,00017 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$.

De plus, l'analyse de variance ANOVA indique une différence très hautement significative ($p < 0,0001$).

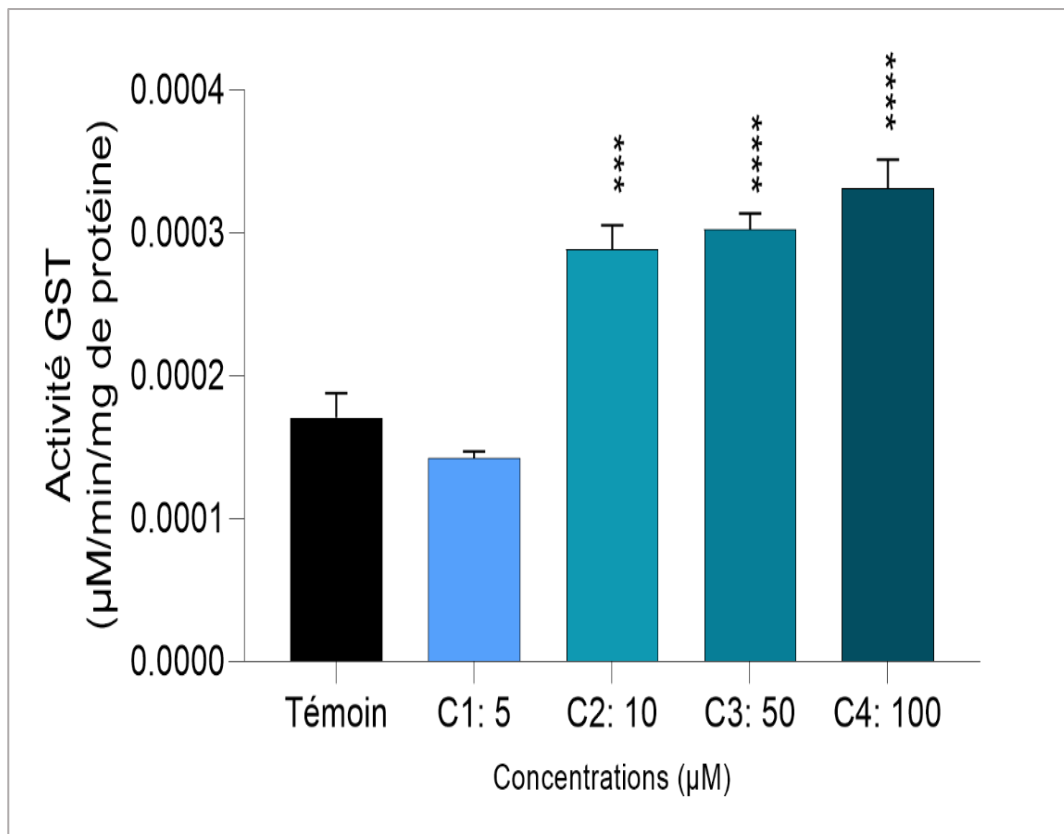


Figure 53 : Effet des concentrations croissantes de Cr(VI) sur l'activité Glutathion S-transférase (GST) chez les paramécies (µM/min/mg de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Concernant l'effet du Cr(VI) sur l'activité GST représenté dans la Figure 53, nous constatons que cette stimulation est hautement significative ($p = 0,0008$) chez les paramécies traitées par C2 et très hautement significative chez les paramécies traitées par C3 et C4 atteignant ainsi des valeurs respectives de l'ordre de 0,00028, 0,00030 et 0,00033 µM/min/mg comparativement aux témoins (0,00017 µM/min/mg). L'analyse de variance ANOVA révèle une différence très hautement significative ($p < 0,0001$).

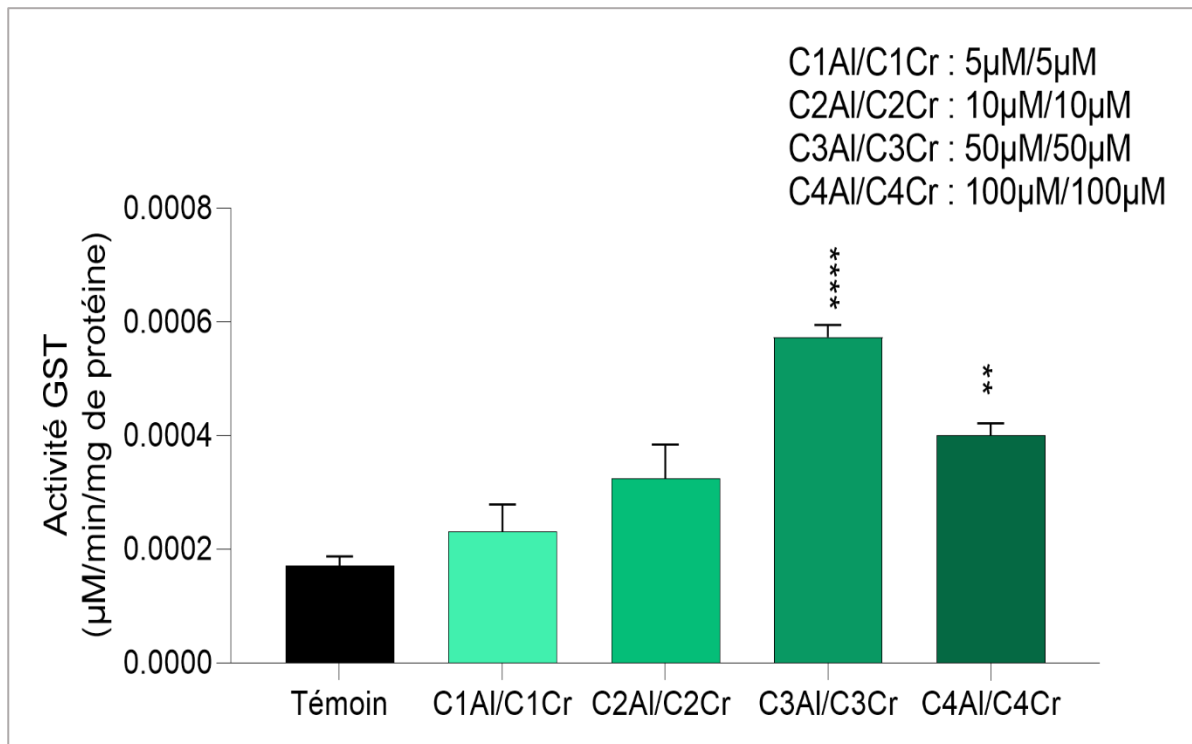


Figure 54 : Effet des mixtures d'Al/Cr(VI) sur l'évolution de l'activité Glutathion S-transférase (GST) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La figure (54) met en évidence une stimulation de l'activité GST d'une manière très hautement significative ($p < 0,0001$) chez les cellules traitées par C3Al/C3 Cr et très significative ($p = 0,0051$) chez les paramécies exposées à C4 Al/ C4 Cr avec des valeurs respectives de l'ordre de 0,00057 et 0,00040 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ comparativement aux témoins (0,00017 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$)

Ainsi, l'étude de variance ANOVA indique une différence hautement significative ($p = 0,0002$).

d- Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) :

Les figures (55), (56) et (57) illustrent l'impact des concentrations croissantes d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture sur le taux de Malondialdéhyde (MDA) chez *Paramecium sp.*

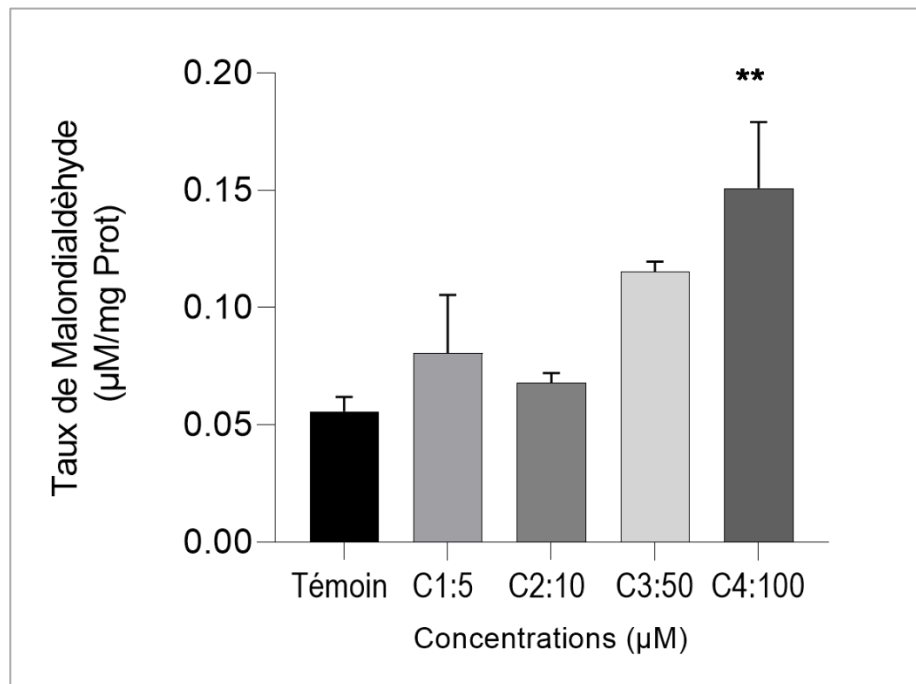


Figure 55 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et traitées par les concentrations croissantes d'Al ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

Nous constatons une augmentation du taux de MDA chez les cellules exposées aux sels d'Al représentée dans la figure (55). Cette augmentation est très significative ($p = 0.0095$) chez les cellules traitées par C4 avec une valeur de l'ordre de $0.000328 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins dont le taux est $0.000458 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines. L'analyse de variance ANOVA révèle des différences significatives ($p = 0.0167$).

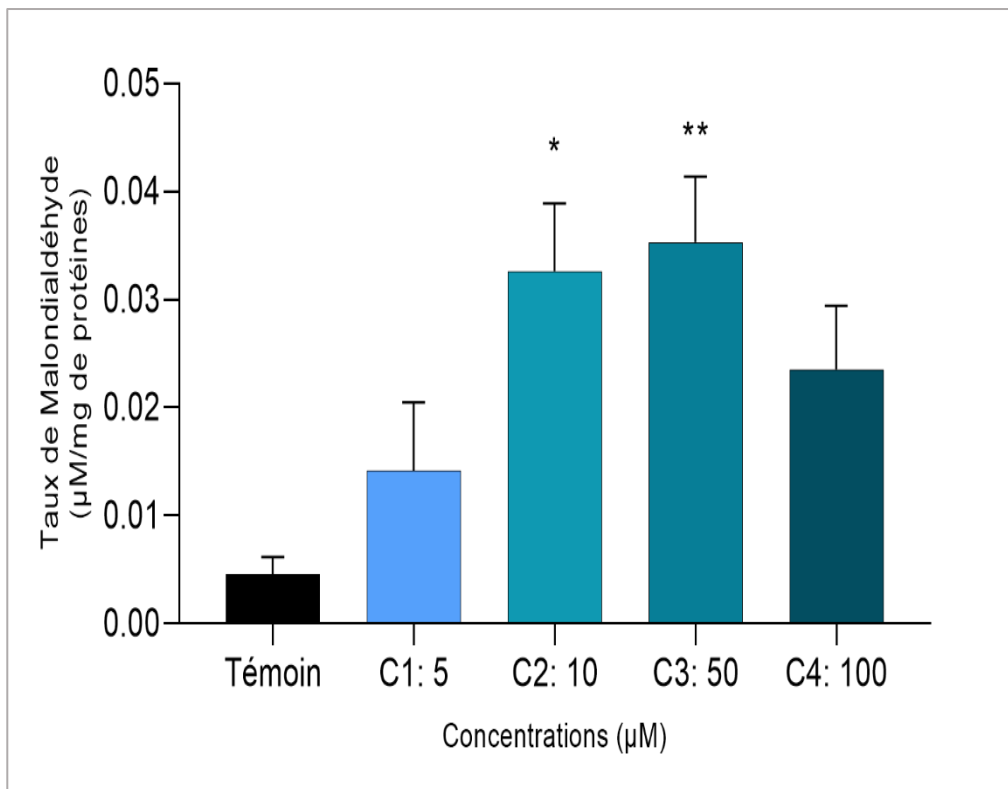


Figure 56 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et exposées au Cr(VI) ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous remarquons une augmentation du taux de MDA chez les cellules exposées aux Cr(VI) (figure 56), particulièrement significative ($p=0.016$) chez les cellules traitées par C2 et très significatives ($p=0.0093$) chez les paramécies exposées à C3 avec des valeurs respectives de l'ordre de $0.032 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines et $0.035 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines comparativement aux témoins ($0.000458 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines). Ainsi, l'analyse de variance ANOVA indique des différences significatives ($p=0.0142$).

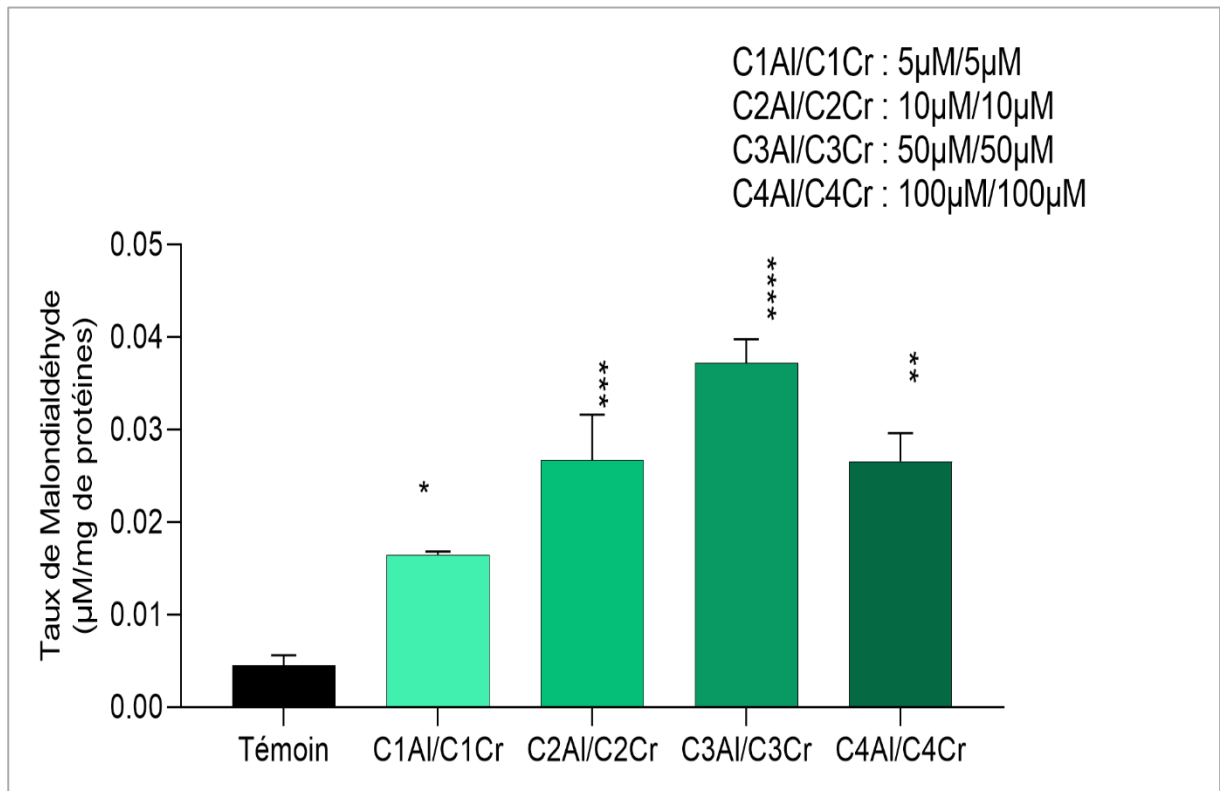


Figure 57 : Taux de Malondialdéhyde (MDA) chez les paramécies témoins et en présence de mixtures de Concentrations Al/Cr(VI) (µM/mg de Prot). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0,0001$ (très hautement significative)

La figure (57) met en évidence une augmentation du taux de MDA d'une manière très hautement significative ($p < 0,0001$) chez les paramécies exposées à C3Al/C3Cr atteignant une valeur de l'ordre de 0.037 µM/mg de protéines comparativement aux témoins qui ne dépassent pas 0.000458 µM/mg de protéines.

Dans ce cas, l'analyse de variance ANOVA met en évidence une différence très hautement significative ($p < 0,0001$).

7. Impact de la toxicité d'Al et du Cr sur la structure cellulaire :

7.1. Cas des levures

Les planches (1) et (2) illustrent l'état des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* observées par microscopie optique et ce après traitement à l'Al, le Cr(VI) et leur mixture.

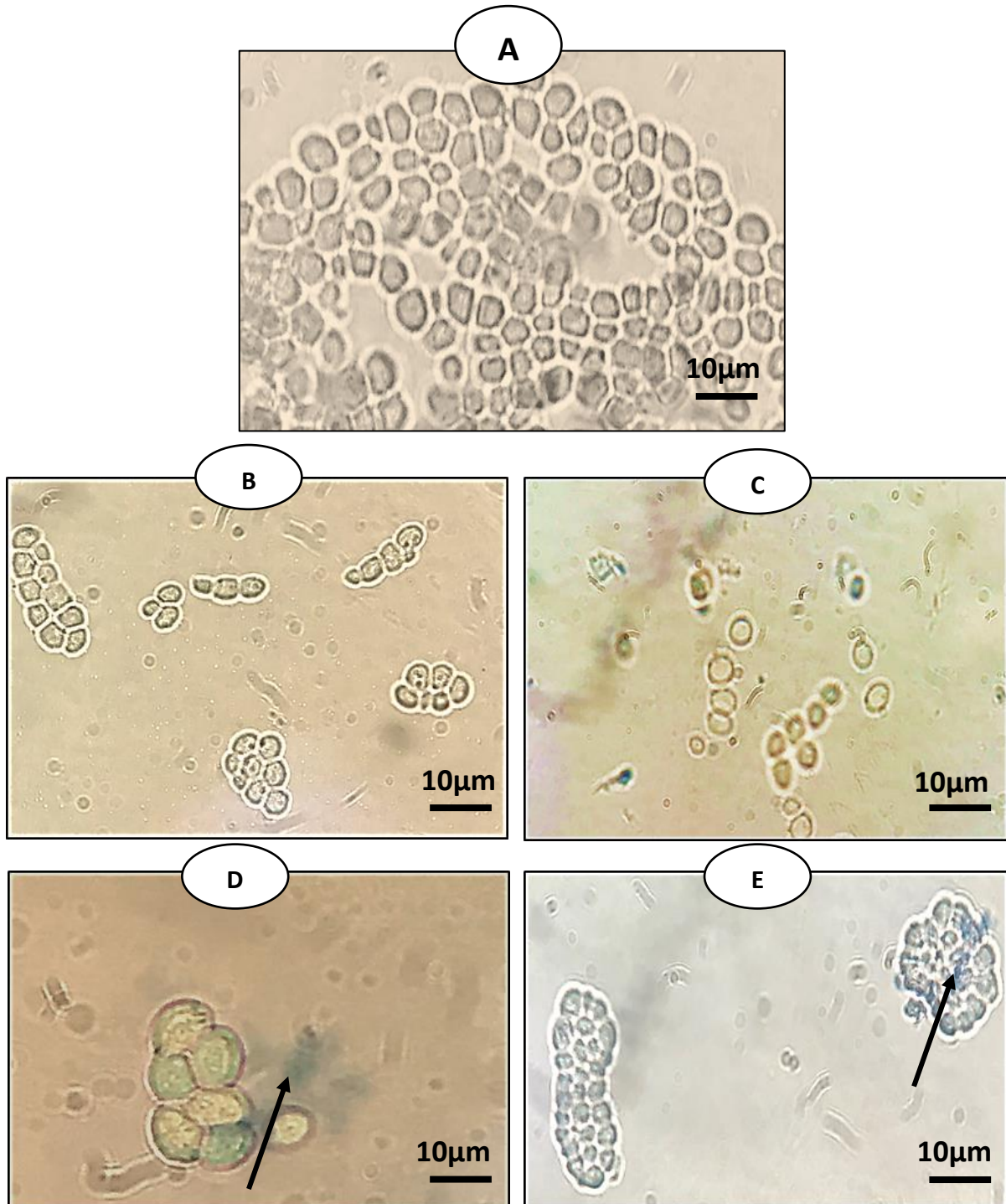


Planche 1: Observations microscopiques (Grx100) des levures témoins (A) et traitées aux sels d'Aluminium (B) : C1Al, (C) : C4Al ainsi qu'aux particules de Chrome (D) : C1Cr, (E) : C4Cr.
(→ Débris de cellules signe d'une nécrose cellulaire)

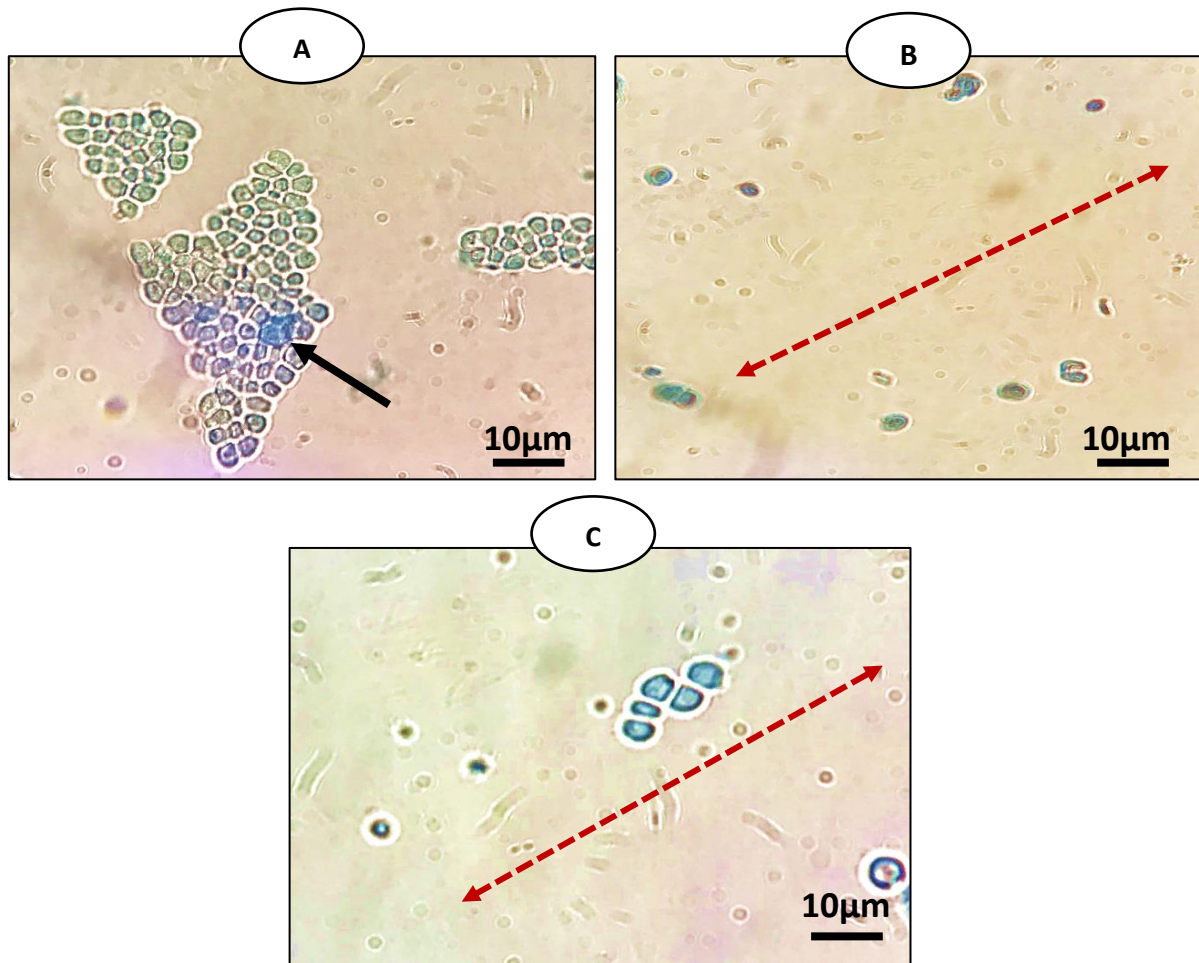




Planche 2: Observations microscopiques (Gr x100) des levures exposées aux mélange Al/Cr
(A) : C1Al/C1Cr, (B) : C1Al/C4Cr et (C) : C1Cr/C4Al.

( Déplétion importante du nombre des levures  Nécrose cellulaire)

Nous remarquons une différence entre les cellules témoins et traitées aux métaux lourds. En effet, les levures témoins (Planche 1, A) apparaissent en grands nombre formant une colonie soudée où la coloration bleue est claire à l'intérieur de la cellule faisant apparaître la membrane plasmique d'une couleur foncée.

Nous notons une diminution importante du nombre des cellules traitées (Planche 1, B, C, D, E et Planche 2, A, B, C) dont le plus faible nombre est constaté dans le cas d'exposition aux mixtures C1Al/C4Cr et C1Cr/C4Al. De plus, nous remarquons que les cellules sont séparées et la coloration bleue est plus intense par rapport aux témoins.

7.2.Cas des paramécies

La figure (58) met en évidence une observation microscopique (Grx20) d'une paramécie témoin en phase exponentielle. Ainsi, les planches (3) et (4) qui suivent représentent les différentes observations des cellules exposées aux sels d'Aluminium, aux particules de Chrome et leur combinaison.

En premier lieu, nous observons une structure normale des paramécies témoins (Figure 58) apparaissant d'une manière symétrique et bien organisée. Contrairement aux cellules traitées par les métaux (planche 3) où nous constatons un allongement cellulaire suite à l'exposition aux faibles concentrations de Al et Cr(VI), l'apparition d'une forme stéroïdes chez celles traitées (C2Al, C3Al et C3Cr). Ainsi nous remarquons une certaine asymétrie de morphologie (C3Cr), l'apparition de noircissement, condensation du contenu cellulaire dans tous les cas. Ainsi, l'exposition à la mixture (Planche 4) a également révélé des atteintes morphologiques manifestées par une forme asymétrique, déformation membranaire et apparition de noircissement. Il est à noter que toutes les altérations citées sont marquées en rouge sur les images ci-dessous.



Figure 58 : Paramécie témoin observée par microscope optique après une fixation au Formol (4%) au Gr x20.

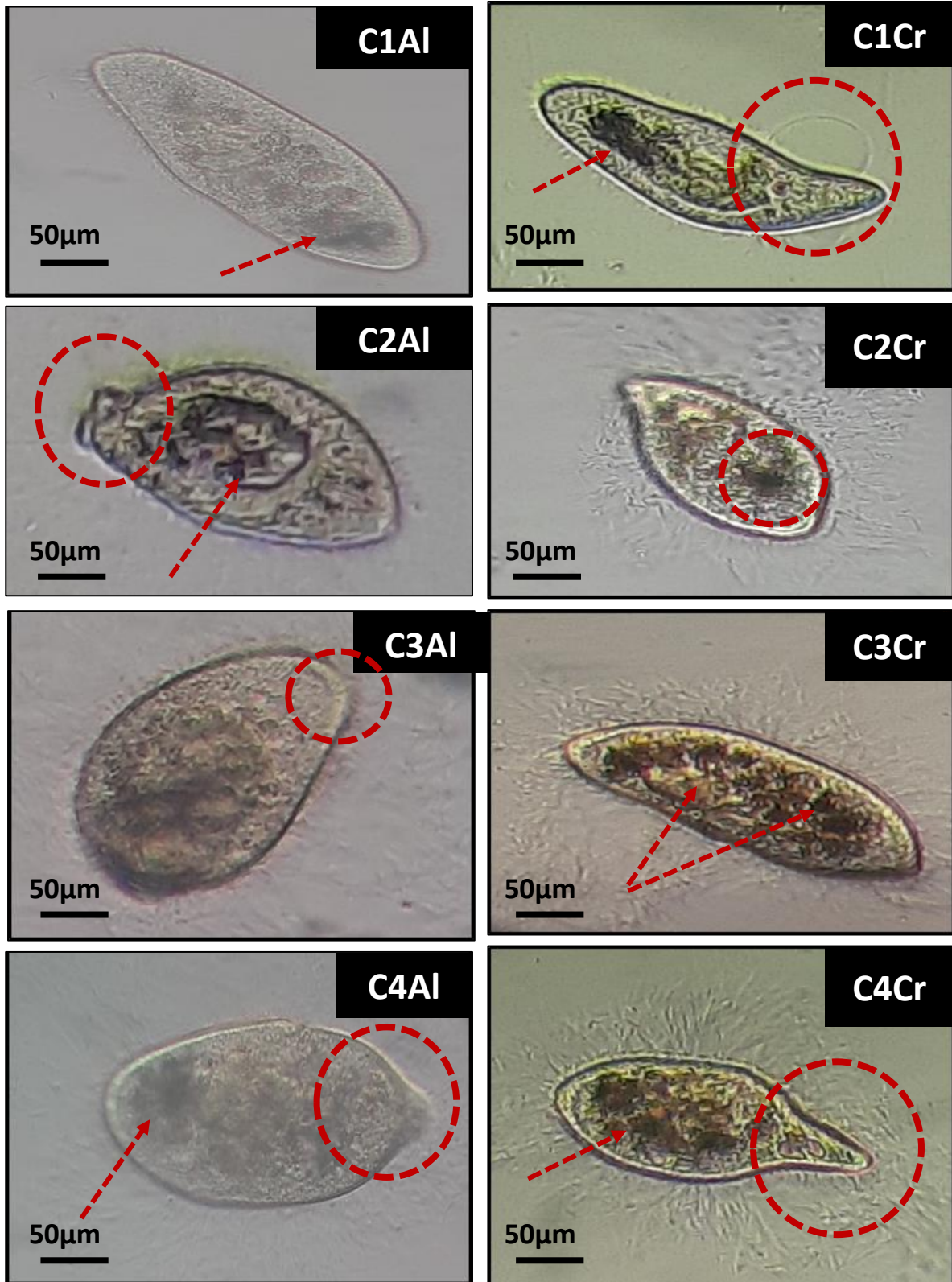


Planche 3: Paramécies exposées aux différentes concentrations d'Al (C1Al, C2Al, C3Al et C4Al) et au Cr (C1Cr, C2Cr, C3Cr et C4Cr) observées au microscope optique après une fixation au Formol (4%) (Grx20).

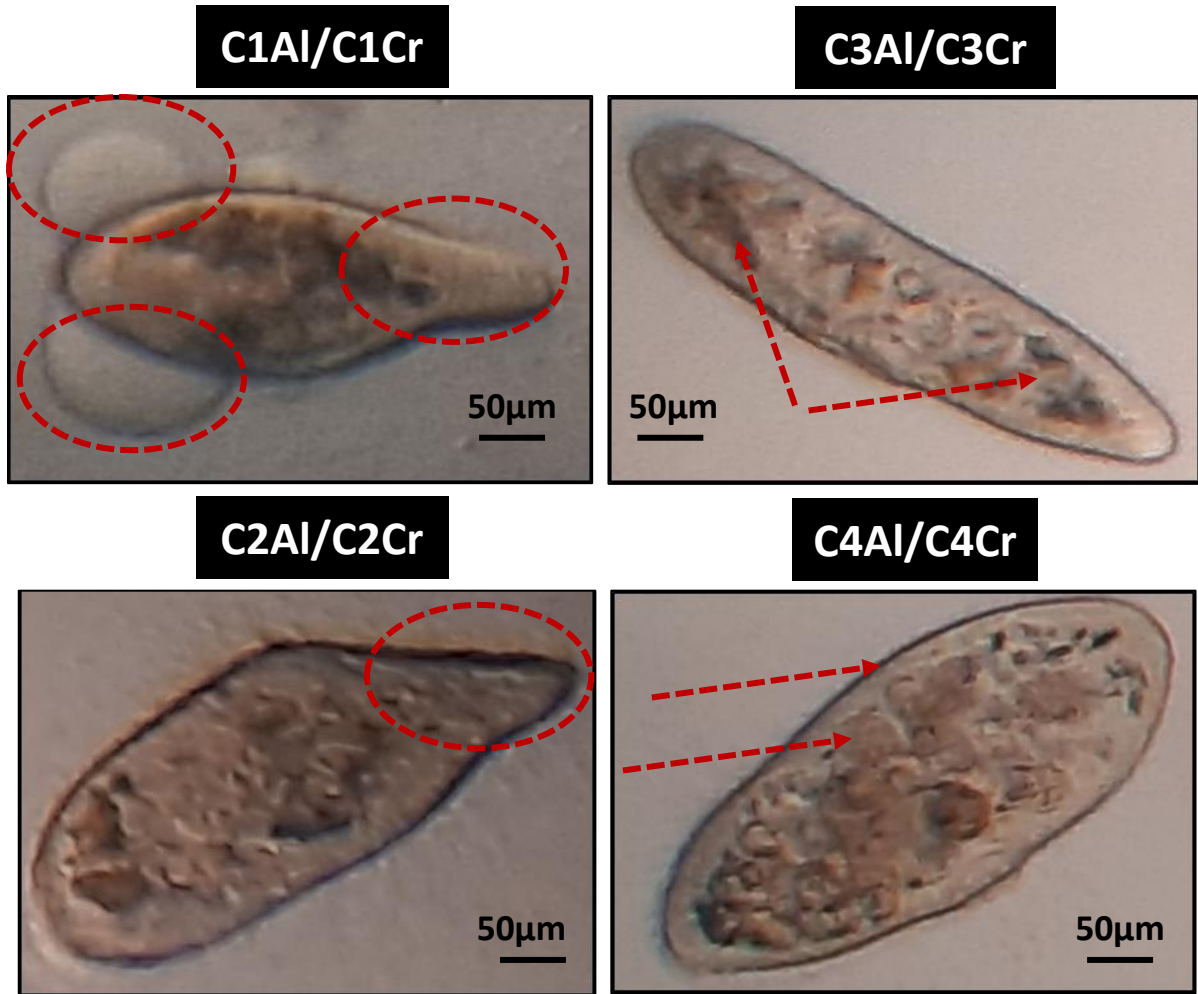




Planche 4: Paramécies en présence de mélanges d'Al/Cr C1Al/C1Cr, C2Al/C2Cr, C3Al/C3Cr et C4Al/C4Cr observées au microscope optique (Grx20).

Légende :

- Anomalies cellulaires internes 
- Anomalies morphologiques externes 

8. Effet des métaux sur le mouvement cellulaire :

8.1. Trajectoire :

La figure (59) montre la trajectoire d'une paramécie témoin et la planche (5) met en valeur les différentes trajectoires des cellules exposées aux fortes concentrations des sels d'Aluminium, des particules de Chrome et de leur combinaison.

Nous constatons un changement de la trajectoire de déplacement chez les paramécies exposées aux métaux.

Tous d'abord nous remarquons que les cellules témoins suivent une trajectoire linéaire d'une manière hélicoïdale autour d'un axe longitudinal. Ce mouvement direct est assuré par les vagues créés grâce aux battements ciliaires. (Figure 59)

Cependant, dans le cas d'exposition aux métaux, nous notons une perte de linéarité représentée (planche 5). Où on peut constater des trajectoires désordonnées suivant une forme de ZigZag, une forme circulaire ou un changement brutal de direction accompagnée par des nages en arrière appelées Backward swimming. En effet, toutes ces altérations sont manifestées surtout chez les cellules traitées par C4 des sels d'Al (A), C4 des particules de Cr(VI)(B) ainsi par la combinaison des fortes concentrations (C).

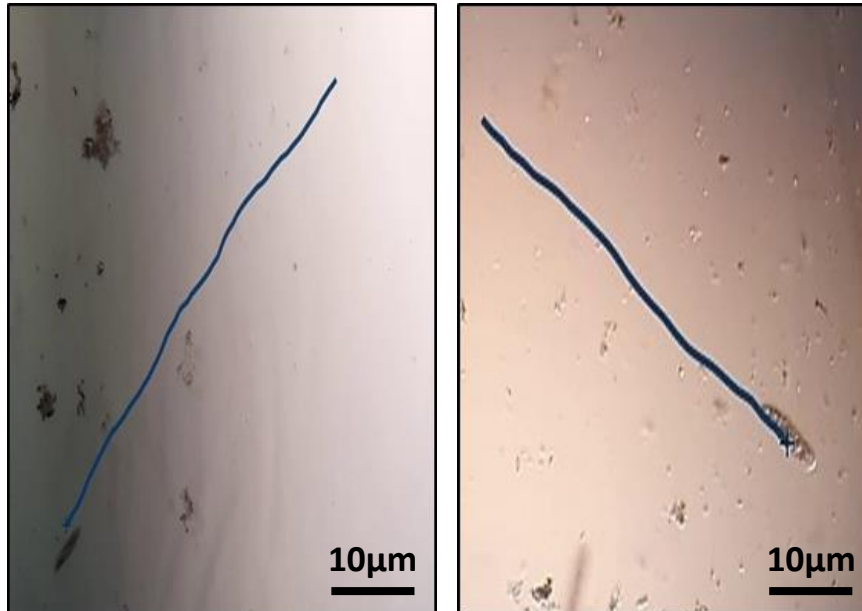


Figure 59 : Trajectoires des paramécies témoins tracées par le logiciel Kinovea et indiquées en ligne bleue (Grx4).

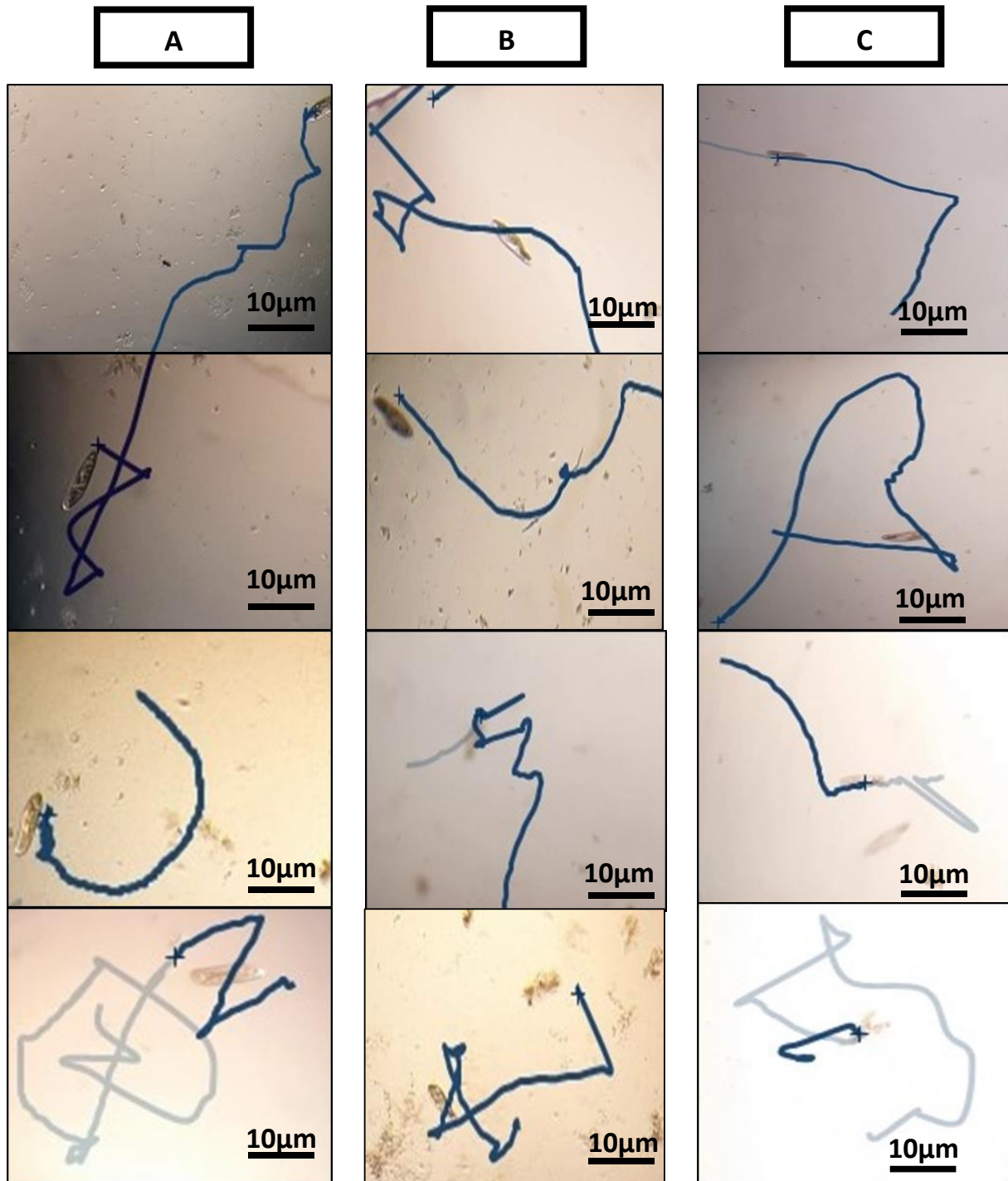


Planche 5: Trajectoires des paramécies filmées au Grx4 et traitées par les plus fortes concentrations d'Al (C4 : A), du Cr(VI) (C4 : B) et de leurs mélanges (C4A/C4Cr : C) tracées en ligne bleue par le logiciel Kinovea.

8.2. Vitesse de déplacement des paramécies :

Le tableau (8) illustre l'impact des métaux ainsi que leur mélange sur la vitesse de déplacement des paramécies.

Tableau 8 : Vitesse de déplacement des paramécies témoins et traitées à l'Al, Cr(VI) et à la combinaison. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

		Vitesse de Déplacement (mm/s)
Témoin		175.501 ±2.63
Al (µM)	C1 :5	139.72 ± 2.03
	C2 :10	174.69 ±18.46
	C3 : 50	175.789 ± 17.89
	C4 : 100	196.68 ±0.590
Cr(VI) (µM)	C1 : 5	176.76 ± 14.5
	C2 : 10	171 ± 11.68
	C3 : 50	164.9 ± 21.33
	C4 : 100	188.4 ±22.9
Al/Cr(VI)	C1Al/C1Cr	143.49 ±12.38(*)
	C2Al/C2Cr	130.65± 9.17 (**)
	C3Al/C4Cr	125.78± 2.27 (**)
	C4Al/C4Cr	128.85± 4.46 (**)

Nous constatons tout d'abord une augmentation de la vitesse de déplacement chez les cellules traitées particulièrement par C4Al avec une valeur de l'ordre de 196 mm/s par rapport aux témoins (175 mm/s).

Nous constatons que le traitement des paramécies par les concentrations croissantes de Cr(VI) a induit une augmentation de la vitesse de déplacement. Ce résultat est particulièrement observé chez les cellules traitées par la plus forte concentration (C4) atteignant une valeur de l'ordre de 188.4mm/s par rapport aux témoins (175mm/s).

Cependant, nous remarquons une diminution significative ($p= 0,0456$) chez les paramécies traitées par C1Al/C1Cr avec une valeur de l'ordre de 143.49mm/s et très significative pour les cellules exposées à C2Al/C2Cr, C3Al/C3Cr et C4Al/C4Cr atteignant des valeurs respectives de l'ordre de 130 mm/s ($p= 0,0061$), 125 mm/s ($p= 0,0029$) et 128 mm/s ($p= 0,0046$) comparativement aux témoins (175mm/s). Dans ce cas, l'analyse de variance ANOVA met en évidence des différences très significatives ($p=0.0040$).

9. Effet des inhibiteurs mitochondriaux sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* comparativement au traitement aux métaux (Sulfate d'Aluminium et Chromate de Potassium)

Afin de mieux étayer l'effet des métaux testés sur l'induction d'un stress oxydant, nous avons opté pour l'utilisation de molécules connues pour leur rôle dans l'inhibition de l'activité mitochondriale telles que :

- La TMZ dont la cible mitochondriale est le coenzyme A 3-ketoacyl CoA thiolase.
- La PDN qui perturbe le génome mitochondrial responsable de la production d'ATP.
- Le KCN qui inhibe le cytochrome c oxydase.

9.1 Cas des sels d'Al :

La figure (60) montre l'impact des trois molécules (TMZ, PDN et KCN) sur la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* comparativement aux témoins et aux levures traitées avec 50 μ M de sel d'Al et ce pendant 24h d'exposition.

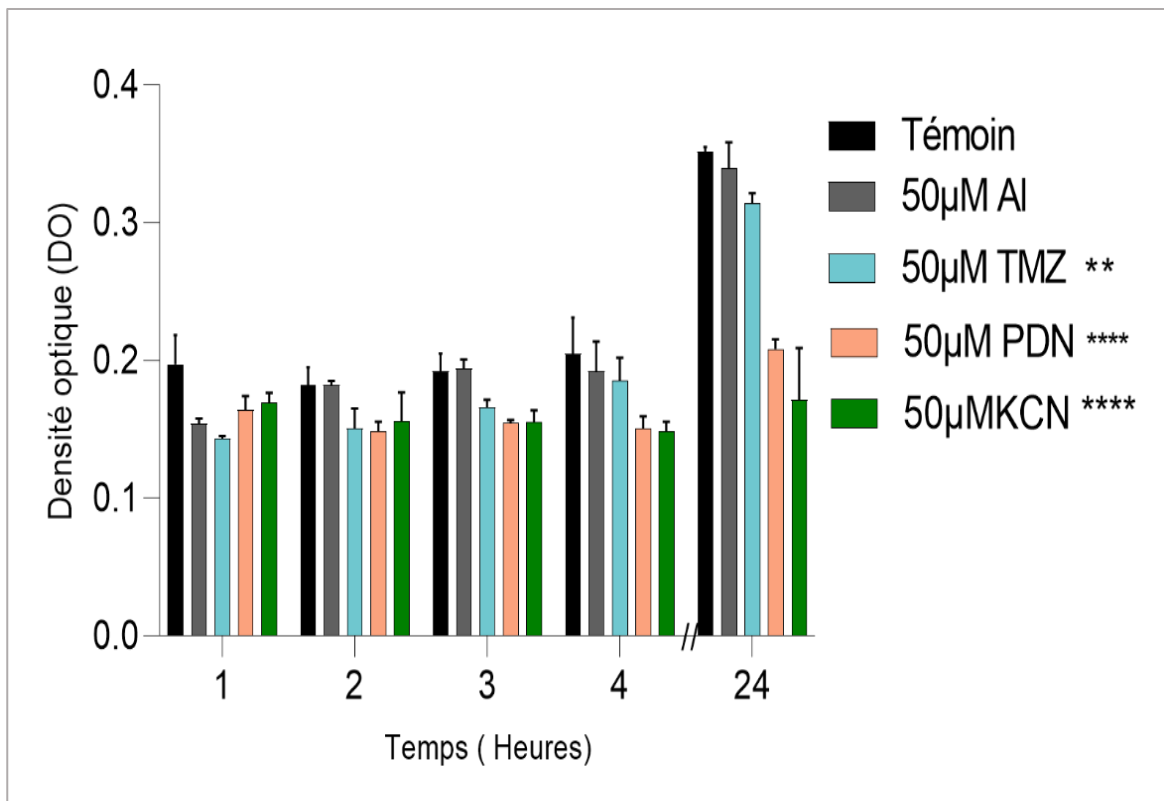


Figure 60 : Suivi de la cinétique de croissance des levures exposées à la Trimetazidine, Prednisolone et aux Cyanures comparativement aux cellules témoins et celles traitées avec les sels d'Aluminium pendant 24heures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous constatons qu'après 24heures de traitement les molécules PDN et KCN induisent une inhibition très hautement significative de la croissance ($p < 0.0001$) avec des valeurs respectives de l'ordre de 0.208 et 0.171 par rapport aux témoins (0.351) et les traitées par l'Al (0.339) et la TMZ (0.314).

Ainsi, l'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatifs ($p < 0.0001$).

9.2. Cas des particules de Cr(VI) :

La figure (61) illustre l'effet des trois molécules (TMZ, PDN et KCN) sur la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* comparativement aux témoins et aux levures traitées avec 50µM de chromates de potassium et ce pendant 24h.

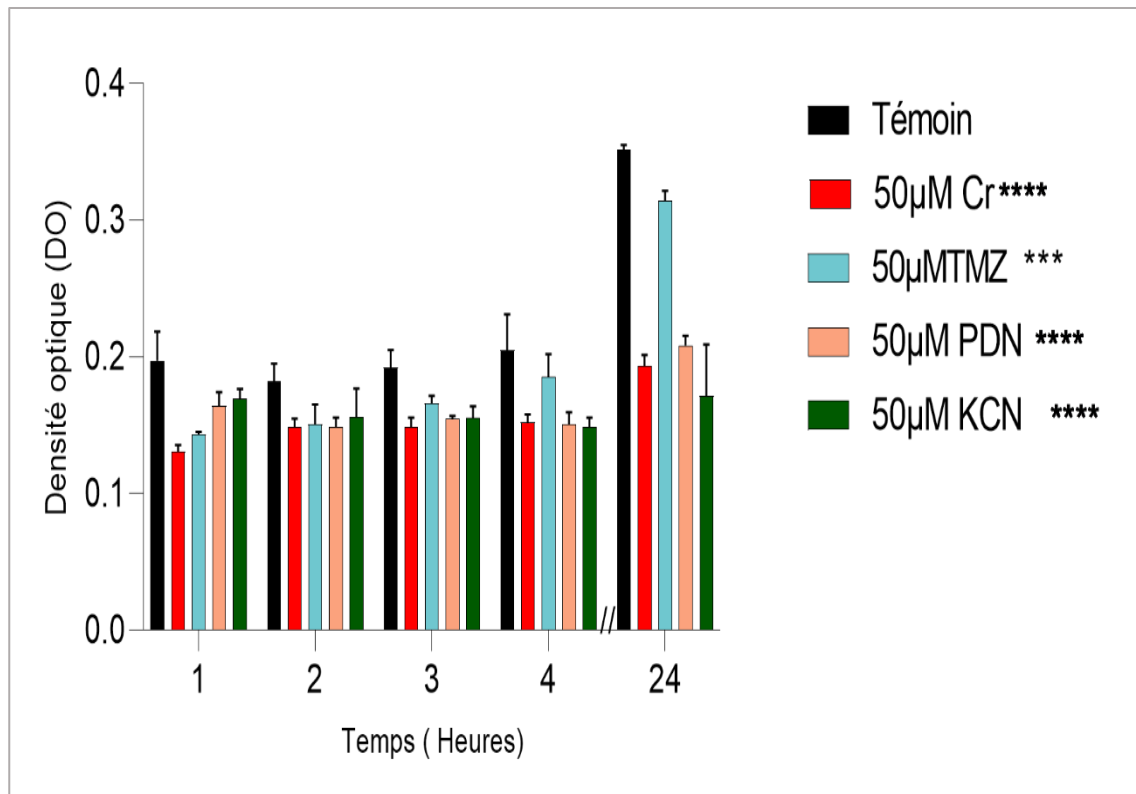


Figure 61 : Suivi de la cinétique de croissance des levures exposées à la Trimetazidine, Prednisolone et aux Cyanures comparativement aux témoins et aux cellules traitées par le Cr(VI) pendant 24heures. * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

La figure (61) met en évidence une inhibition de la croissance cellulaire des levures exposées aux trois molécules (TMZ, PDN, KCN) et au Cr par rapport aux témoins. Cependant, Cette inhibition est très hautement significative chez les cellules traitées par le Cr(VI), PDN et les KCN ($p < 0.0001$) atteignant des valeurs respectives de l'ordre de 0.193, 0.208 et 0.171 contrairement aux cellules témoins dont la DO dépasse 0.192 après 24heures. L'analyse de variance ANOVA révèle des différences très hautement significatifs ($p < 0.0001$).

9.3. Evolution des pourcentages de réponse :

La figure (62) met en évidence l'évolution des pourcentages de réponse de *Saccharomyces cerevisiae* traitées avec les trois molécules (TMZ, PDN et KCN) comparativement à celles traitées par le Sulfate d'Al et le Cr(VI).

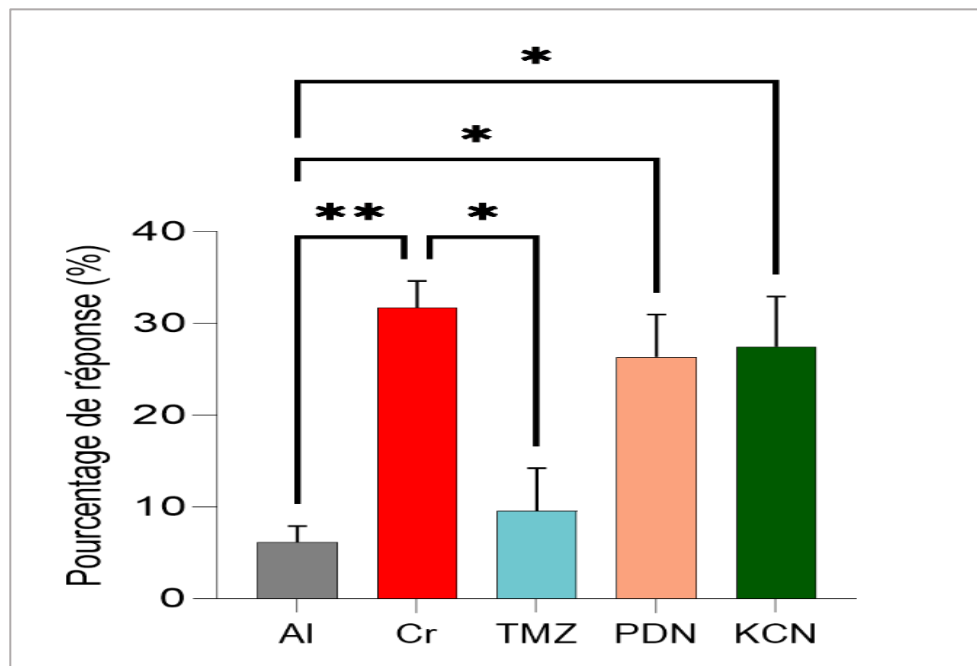


Figure 62 : Pourcentage de réponses de *S.cerevisiae* traitées avec TMZ, PDN, KCN , Al et Cr(VI). * : $P \leq 0,05$ (significative), ** : $P \leq 0,01$ (très significative), *** : $P \leq 0,001$ (hautement significative) et **** : $P < 0.0001$ (très hautement significative)

Nous remarquons que les pourcentages de réponse sont tous positifs indiquant l'effet inhibiteurs de toutes les molécules testées. Nous remarquons également que le pourcentage de réponse de l'Al semble proche de celui des cellules traitées par TMZ avec des valeurs respectives de 6,178 % et de 9,593% et celui du Cr(VI) est plutôt proche de celui des traitées par PDN et KCN avec des valeurs de l'ordre de 31,70%, 26,341% et de 27,47% (Figure 62).

L'analyse de l'ANOVA par comparaison multiple révèle qu'il existe une différence très significative entre l'Al et le Cr(VI) ($p = 0,0093$), significative entre l'Al et le PDN ($p = 0,0383$) et les KCN ($p = 0,0283$) et significative entre le Cr(VI) et la TMZ ($p = 0,0228$).

CHAPITRE IV : Discussion

Chapitre IV : Discussion

Depuis ces dernières décennies, la pollution par les métaux constitue un problème majeur qui nécessite une évaluation du risque approfondie à l'aide de plusieurs espèces aquatiques (**Esmaeili, 2018**). De ce fait, la recherche d'outils de surveillance ainsi que l'utilisation des organismes alternatifs bio indicateurs s'avèrent essentielles dans le but d'évaluer l'impact induit par ces molécules potentiellement toxiques. En effet, les métaux lourds sont les polluants les plus couramment trouvés à des concentrations élevées dans les eaux usées industrielles (**Wang et Chen, 2009**). Pouvant contaminer les eaux de surface et souterraines et altérer l'équilibre des écosystèmes (**Eliott, 2001**), Ces métaux deviennent plus nocifs à des concentrations plus ou moins élevées en raison de leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants. Leur bioaccumulation dépend par ailleurs de divers facteurs, l'Aluminium, par exemple, est un métal qui peut être accumulé dans l'organisme soit par son insolubilisation sous forme de phosphate, dans des organites limités par une membrane tels que les lysosomes et les granules pigmentaires des mélanocytes. Ou par la formation de volumineux dépôts extra-cellulaires, atteignant 100 µm de long et entraînant la destruction du tissu. Ces mécanismes sont exploités à travers les recherches de **Chassard-Bouchaud et al. (1992)** sur la microanalyse des organes de la truite *Salmo trutta fario* exposée à l'Al.

La présence de métaux toxiques, comme le Cadmium, l'Argent et l'Aluminium, peut compromettre la qualité de l'habitat aquatique. Pour un organisme cible, les effets physiologiques et toxiques d'un métal dépendront de sa spéciation qui sera déterminée en grande partie par la concentration totale du métal, le pH, la salinité ainsi que la concentration de ligands complexants. Ces effets sont également plus ou moins intensifiés par divers facteurs environnementaux (**Bouilly, 2004**).

En raison de l'importance de leur impact quotidien sur les différents niveaux de la chaîne trophique, de nombreuses études sont menées sur la toxicité de plusieurs composés de l'Aluminium et du Chrome en utilisant une multitude d'organismes vivants tels que les poissons, algues, drosophiles, truites de mer, micro-organismes...etc. (**Rybak et al., 2017 ; Bayliak et al., 2017**)

Néanmoins, l'étude de leur combinaison reste plus au moins obscure. Dans la plupart des cas, les recherches visent toujours à évaluer la toxicité des xénobiotiques pris isolément. Alors

Chapitre IV : Discussion

qu'il est primordial d'étudier les perturbations induites par leur mélange étant donné que l'homme ainsi que tous les organismes vivants sont quotidiennement exposés à des mélanges de molécules différentes qui peuvent agir de façon additive, antagoniste ou synergique.

Dans ce travail, nous nous sommes penchés vers l'impact cytotoxique de deux métaux ainsi que leur mixture sur le pouvoir générateur du stress oxydatif en étudiant les différents paramètres physiologiques, enzymatiques et biochimiques de deux modèles cellulaires : la levure et la paramécie. Et ce à travers d'une part l'étude du comportement et des malformations cellulaires des paramécies exposées à Al/Cr(VI), et d'autre part, la comparaison entre l'effet d'Al et du Cr(VI) avec trois molécules inhibitrices des complexes mitochondriaux des levures dans le but de comprendre leur cible cellulaire ainsi que leur mécanisme d'action.

L'évaluation de la toxicité potentielle des molécules Al, Cr et Al/Cr(VI) sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp* est rarement évoquée dans les études antérieures. Depuis très longtemps, ces deux organismes sont excellents en termes de fiabilité de leurs réponses biologiques faisant l'objet de plusieurs recherches dans le domaine de surveillance de la qualité des milieux tout en fournissant des données analytiques quantitatives et qualitatives. Il en est ainsi des travaux de **Madoni (2000)** et **Fensk et al. (2001)** qui ont choisis *Paramecium sp* comme modèle bioindicateur de la pollution générée par les métaux lourds, où ceux de **Zaoui et al. (2011)** qui a utilisé *Saccharomyces cerevisiae* pour évaluer le potentiel toxique du Cadmium, un métal très répandu au niveau environnemental.

Quels sont les effets de l'Al, du Cr(VI) et leur mixture sur la viabilité et la croissance des microorganismes ?

Pour répondre à cette première problématique, nous nous sommes focalisés sur l'évaluation de l'impact des xénobiotiques sur la cinétique de croissance cellulaire. Cette dernière est un paramètre clés confirmant l'influx des molécules étrangères à l'intérieur de la cellule (**Azzouz, 2012**) tout en reflétant l'état du métabolisme interne (**Perez-Rama, 2001 ; Kasmets et al., 2009**). En effet, il s'est avéré que les sels d'Aluminium et le Chrome induisent une inhibition de la croissance cellulaire aussi bien que chez les levures que chez les paramécies.

Chapitre IV : Discussion

D'un côté, l'Aluminium semble agir particulièrement aux faibles concentrations chez les levures, contrairement aux chromates de potassium qui ont provoqué une inhibition dose-dépendante de la croissance alors que la mixture (Faible/Forte concentrations) est à l'origine d'une forte inhibition de la croissance cellulaire. Nos résultats sont en accord avec ceux d'**Adam et al. (2006)** qui ont observé une inhibition de 90% de la croissance de *B.subitilis* (bactérie Gram positive) dès la concentration de 10 µg de ZnO. Ou ceux de **Cherait (2015)** qui a constaté une inhibition de la croissance de *S.cereviciae* suite à une exposition à un antagoniste calcique : la Nifedipine. Ce résultat est également signalé dans les travaux de **Khebbeb (2015)** portant sur l'impact des Nanoparticules (ZnO) et ceux de **Sousa et al. (2019)** qui a travaillé sur différents métaux (Al_2O_3 , Mn_3O_4 , SiO_2 et SnO_2) et leur cytotoxicité chez les levures. Il en est de même pour les travaux de **Bayliak et al. (2019)** qui confirment la capacité de l'Aluminium à perturber l'homéostasie cellulaire et ceux **Chen et al. (2020)** qui évaluent l'effet de l'Al sur la croissance de plusieurs souches de levures.

Concernant les paramécies, nos résultats mettent en évidence une perturbation de la croissance des traitées avec l'Al, le Cr(VI) et leur combinaison en accord avec les travaux d'**EiniCker-Lamas et al. (2002)** qui a évalué la toxicité potentielle du zinc et du cuivre sur une algue chlorophilienne *Euglema gracilis*, et ceux de **Angerville (2007)** qui rapporte une perte de mobilité des daphnies traitées par un mélange de trois métaux lourds Zn, Cd et Cu. Où encore les travaux de **Kungang et al. (2012)** qui ont noté une cytotoxicité chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes de nanoparticules d'oxydes métalliques. **Benlaifa (2016)** a également constaté une perturbation de la cinétique de croissance chez les paramécies traitées par une combinaison de Métal (Cd) /pesticide, où ceux de **Bouraiou (2022)** qui soulignent l'effet inhibiteur de la croissance d'un mélange de Nanoparticules/ Pesticides sur *Paramecium Tetraurelia*.

Selon **Parent (1991)** qui a étudié la biodisponibilité de l'Aluminium dans les eaux douces sur *Chlorella pyrenoidosa*, plus le pH est élevé dans le milieu (pH 4.0 à 6.0) plus l'aluminium est toxique et ce à des concentrations retrouvées en milieu naturel. Il en est de même pour les travaux de **Coté (2003)** qui a évalué l'effet de l'Al sur *Chlorella pyrenoidosa*, ainsi que ceux de **Haelliwell et al. (1983)** qui soulignent qu'une concentration faible d'aluminium à pH 6.1 pouvait diminuer de moitié le taux de croissance de l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*. Nos résultats corroborent tous ces travaux cités puisque nous avons travaillé dans la même marge de pH.

Chapitre IV : Discussion

De nombreux travaux consacrés à la toxicité de l'aluminium sont en utilisant des milieux de culture contenant de grandes quantités de sels ajoutés (silicates, hydroxydes ferriques colloïdaux, citrate, phosphate, etc.) pouvant former des complexes ou des précipités avec l'Aluminium et en diminuer sa toxicité (**Gensemer et Playle, 1999**).

Les travaux de **Wong et al. (1982)** ont mis en évidence un effet toxique des sulfates de chrome sur deux espèces de carpes (*Cyprinus carpio* et *Aristichthys nobilis*) particulièrement aux faibles concentrations (100 mg/l). Ceux de **Jouany et al. (1982)** ont rapporté une inhibition de la croissance de *Chlorella vulgaris* et *Daphnia magna* parallèlement à des taux de mortalité plus au moins élevés chez les daphnies à court (24h) et moyen terme (28j) où aucun effet cumulatif n'a été observé.

En revanche, les travaux de **Roy (1997)** sur l'effet de la combinaison Aluminium/Zinc sur le saumon *Salmo salar* en conditions acides, révèlent une toxicité additive confirmée par le fait que le Zn s'accumule dans les branchies du saumon indépendamment aux concentrations d'Al testées. L'auteur conclut que les deux métaux agissent sur différents sites au niveau de la membrane branchiales.

Cet effet inhibiteur de la croissance observé après traitement avec l'Aluminium, le Chrome et de leur combinaison serait dû à leur action directe sur la structure membranaire constituée essentiellement d'acides gras provoquant ainsi la déstabilisation du métabolisme interne des cellules induisant par conséquent la mort cellulaire (**Mountassif et al., 2007**). De plus, **Bignucolo et al. (2012)** expliquent que les métaux, tels que l'Al, sont capables de relâcher des ions de Fe contenus dans les enzymes afin d'interagir avec les facteurs qui régulent l'homéostasie cellulaire.

Dans le but de confirmer le potentiel inhibiteur des deux métaux et leur mélange, il nous semblait essentiel d'évaluer les paramètres de croissance incluant le pourcentage de réponse ainsi que le nombre, vitesse et temps de générations. Ces mesures représentent une estimation du degré d'altération d'un xénobiotique vis-à-vis d'un modèle cellulaire. **Miyoshi et al. 2003** rapporte que les polluants peuvent affecter les organismes unicellulaires de différentes manières non seulement en dégradant leur membrane cellulaire pouvant ainsi causer la mort de la cellule mais également par la perturbation de leur métabolisme basal. Cet effet sur la croissance cellulaire se répercute sur la population cellulaire et provoque ainsi sa réduction. Nos résultats révèlent des pourcentages de réponses positives chez les levures et paramécies confirmant l'effet inhibiteur de croissance.

Chapitre IV : Discussion

Par ailleurs, nos données mettent en avant une perturbation du nombre, de la vitesse et du temps de générations des levures et paramécies exposées aux métaux lourds confirmant bel et bien l'atteinte et la sensibilité du cycle biologique des cellules. Ces résultats sont en accord ceux de **Azzouz *et al.* (2011)** qui a mis en évidence des altérations de la prolifération des paramécies ainsi qu'une perturbation des paramètres de croissance suite à l'exposition à un pesticide **Ammamra (2015)** et **Bouraiou (2022)** expliquent cette perturbation par la capacité des xénobiotiques à pénétrer dans le milieu interne de la cellule, à perturber l'orientation des phospholipides induisant ainsi des changements dans la fluidité membranaire.

Quels sont les mécanismes impliqués ?

La perturbation de la cinétique de croissance est un indicateur en amont de la cytotoxicité et d'une atteinte du métabolisme basal (protéines et lipides) notamment. Les xénobiotiques peuvent interagir avec les macromolécules en induisant des dommages structuraux et fonctionnels déclenchent ainsi le système de défense cellulaire (**Ho *et al.*, 2013 ; Joy *et al.*, 2017**). Ainsi, lipides et protéines sont des éléments structurels entrant dans la composition des membranes cellulaires et jouant divers rôles primordiaux dans le métabolisme général, et leur altération constitue un signe précoce d'une atteinte métabolique (**Abdel-Daim *et al.*, 2015**).

Nos résultats révèlent une perturbation du taux de protéines totales chez les levures et paramécies exposées à l'Al, au Cr(VI) et au mélange Al/Cr(VI).

Chez les levures, nos résultats indiquent une diminution du taux de protéines chez les traitées par les sels d'Aluminium seuls et par la mixture Al/Cr(VI) et paradoxalement une augmentation de ce taux chez les traitées par le Cr(VI) seul. En revanche, chez les paramécies la teneur en protéines tend à augmenter chez les traités par les deux métaux et leur mélange.

La diminution du taux de protéines totales chez *S.cerevisiae* est rapportée par **Padmaja *et Rao* (1999)** qui ont expliqué cette diminution de protéines chez les escargots d'eaux douces par la mise en place de deux mécanismes d'action à savoir la formation des lipoprotéines destinées à la réparation des cellules et organites endommagés ou bien l'utilisation directes par les cellules afin de combler leur besoin énergétiques. Il en est de même pour les travaux de **Radwan *et al.* (2008)** qui ont signalé une baisse du taux de protéines après exposition de

Chapitre IV : Discussion

certaines invertébrés aux pesticides due à une attaque radicalaire étant donné que les protéines sont considérées parmi les cibles privilégiées des ERO (**Djekoun, 2012**).

Cependant, l'augmentation du taux de protéines observée chez les paramécies est corroborée avec les travaux de **Massaya et al. (2002)** qui ont noté une augmentation des protéines après exposition à un stress chimique chez plusieurs modèles biologiques (y compris les protistes ciliés). Il en est ainsi des travaux de **Benbouzide (2012)** qui a constaté une augmentation du taux de protéines totales chez *Paramecium sp* traitées par les phosphoramides, et ceux de **Xiaohui et al. (2012)** qui ont révélé une induction de la teneur en protéines chez des vers de terre traités avec des concentrations croissantes de cadmium. **Khebbeb (2015)**, **Grara et al. (2016)** et **Benlaifa (2016)** ont travaillé respectivement sur le ZnO, le Cd et des poussières métalliques d'origine industrielles et ont constaté également une augmentation du taux de protéines.

La stimulation de la teneur en protéines totales est un signe précoce de la mise en place du système de défense antioxydante afin de neutraliser les ERO issus d'une attaque chimique par exemple (**Lagadic et al., 1997**). En effet, ces molécules possèdent une taille réduite et une grande affinité aux métaux grâce aux groupement thiols (SH) situés sur les acides aminés qui sont capables de séquestrer et/ou de bloquer les métaux lourds (**Bustamante et al., 2002**).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une induction du taux de lipides totaux que ce soit chez les levures où chez les paramécies, en accord travaux de **Belhamzaoui (2023)** qui a ont montré une augmentation de la teneur en lipides totaux chez *D.magna* traitée avec une hormone progestative de synthèse. Ce résultat suggère la mobilisation des réserves lipidiques à l'intérieur de l'organisme dans le but de garder une certaine homéostasie lors d'un état de stress (**De Coen et Janssen, 2003**).

Cependant, plusieurs travaux ont signalé une déplétion du taux de lipides totaux à l'origine de leur oxydation et leur interaction avec les ERO en produisant des molécules telles que les produits de la peroxydation lipidiques y compris le Malondialdéhyde (**Ayala et al., 2014**). Cependant, La teneur en lipides peut augmenter dans le cas où le xénobiotique étudié tend à stimuler l'absorption des lipides provenant du milieu environnant, ou à perturber les voies métaboliques cellulaires. Ce qui pourrait conduire à une accumulation des lipides dans la cellule. Ainsi, ces effets sont observés en cas de stress ou les radicaux libres endommagent les membranes. En effet, lorsque les niveaux de lipides sont élevés, le taux du substrat pour la peroxydation lipidique augmente et vice versa c'est à dire que cette dernière peut aggraver

Chapitre IV : Discussion

l'accumulation des lipides en altérant la structure et la fonction membranaire. (**Yin *et al.*, 2012 ; Fan, 2014**)

L'effet des sels d'Aluminium et du Chrome seuls ou combinés sur la cinétique de croissance ainsi que sur le métabolisme biochimique nous a incités à construire notre hypothèse sur le mécanisme d'action des métaux testés qui est rarement évoqué dans la littérature. Nos données suggèrent que l'Al et le Cr perturbent le cycle cellulaire en inhibant la croissance des paramécies et des levures. Ainsi, cet effet est accompagné par l'atteinte des protéines et le déclenchement du système de défense cellulaire parallèlement à une accumulation des lipides conduisant à une peroxydation lipidique. Cet effet est significativement plus important dans le cas de l'exposition au mélange (Al/Cr) soulignant ainsi un effet synergique des métaux sur le métabolisme cellulaire.

Quel est l'effet de la mixture Al/Cr(VI) sur les biomarqueurs du stress oxydatif ?

En général, les micro-organismes disposent d'un système de défense face aux xénobiotiques capable de surmonter les conditions de stress, de maintenir l'homéostasie cellulaire et d'éviter la détérioration des structures cellulaires (**Wassmann *et al.*, 2004 ; Mouneyrac *et al.*, 2011) Burgeot *et al.*, 2020**). L'activation de ce mécanisme de défense implique les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, qui servent de bio-marqueurs du stress oxydatif, dont le suivi constitue une méthode fiable pour surveiller l'exposition des organismes vivants aux contaminants environnementaux (**Huggett *et al.*, 2004 ; Tlili, 2012 ; Marín *et al.*, 2023**).

Dans le but d'élucider l'implication du stress causé par l'Aluminium, le Chrome et leur mixture chez les levures et les paramécies, et afin d'étudier les réponses physiologiques de ces deux modèles cellulaires dans des conditions défavorables, nous nous sommes intéressées au suivi de l'activité catalase, première ligne de défense radicalaire. Parallèlement à la quantification de la teneur en GSH, agent essentiel à la neutralisation des ERO (**Yu *et al.*, 2022**). Ou encore, au suivi de l'activité GST, enzyme de la phase II de la biotransformation (**Gunderson *et al.*, 2018**), et à l'évaluation du taux de MDA, produit final de la peroxydation lipidique (**Huang *et al.*, 2023**).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une induction significative de l'activité catalase chez les cellules traitées par l'Al et le Cr(VI) seuls et combinés. Nos

Chapitre IV : Discussion

résultats sont en accord avec ceux de **Barata et al. (2005)** qui ont mis en valeur une induction de l'activité CAT chez *Daphnia magna* en présence du cadmium et du cuivre soulignant ainsi leur potentiel à générer les radicaux libres, et ceux de **Yang et al. (2012)** qui ont travaillé sur l'exposition de ver de terre à divers métaux lourds.

La catalase (CAT) est une enzyme péroxysomale dont le rôle majeur est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par le peroxyde d'hydrogène (**Ighodaro et al., 2018**). En fait, cette enzyme est sensible aux contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme certains pesticides (**Livingstone et al., 1993**) et surtout les métaux (**Labrot et al., 1996**). Cependant, sa réponse est considérée comme irrégulière *in vivo* car les résultats indiquent soit une stimulation et soit une baisse de cette activité (**Di Giulio et al., 1993**).

Nos résultats révèlent une augmentation du taux de Glutathion après l'exposition des cellules aux métaux seuls et mélangés. Cet effet corrobore les résultats de **Besnaci et al. (2019)** qui a noté une augmentation du GSH chez *Helix aspersa* traité par Fe₂O₃. En fait, l'interaction des métaux toxiques avec le métabolisme du GSH est une partie essentielle de la réponse de nombreux métaux (**Hultberg et al., (2001)**). Lorsque le GSH est appauvri par n'importe quel métal, les systèmes de synthèse du GSH commencent à produire plus de GSH à partir de la cystéine via le cycle g-glutamyl. (**Quig, 1998**). En revanche, divers études ont mis en valeur une déplétion de la teneur en GSH en état de stress. Notamment **Radwan et al. (2010)** qui expliquent la diminution du taux de GSH par son utilisation pour la conjugaison des composés électrophiles par la GST pendant l'exposition aux contaminants parallèlement à son utilisation dans la formation de complexes de thiols spécifiques avec les ions métalliques.

Nous avons évalué la teneur du Glutathion (GSH) chez les levures et paramécies traitées aux métaux et leur mixture. Le GSH joue un rôle fondamental dans le processus de défense intracellulaire (**Arrigo, 1999**), il neutralise le peroxyde organique, aide à éliminer les hydrocarbures par conjugaison au groupement thiol, et se lie aux ions métalliques (**Adam et al., 2005**). Ainsi, toute déficience en GSH expose les cellules à un risque élevé du stress oxydant (**Droge, 2002**) du fait de implication dans l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST) (**Kizek et al., 2004**).

Dans notre cas, l'augmentation de la teneur en Glutathion est expliquée par la présence d'une certaine affinité entre le GSH et les métaux, ce qui conduit à la formation de complexes

Chapitre IV : Discussion

d'oxydation du GSH. De plus, la contribution du GSH dans la synthèse des métallothionines, responsables dans la chélation des métaux, explique également son induction. (Regoli *et al.*, 1995).

Nos résultats révèlent une induction de l'activité GST chez les levures et paramécies traitées par les concentrations croissantes d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture. Ce résultat est en accord avec les travaux de Cherait (2015) et Khebbab (2015) qui ont constaté une stimulation de l'activité GST chez *S.cerevisiae* exposée respectivement à la Nifedipine et aux nanoparticules ZnO.

Le suivi de l'activité GST nous a semblé essentiel. Cette enzyme appartient à une famille d'enzymes de la phase II de biotransformation qui détoxifie les substrats exogènes par voie de conjugaison avec le GSH pour produire des composés solubles moins toxiques (Wu *et al.*, 2006). En plus, elle joue un rôle primordial dans la protection contre le stress oxydatif (Zheng *et al.*, 2013).

Nos résultats mettent en évidence une augmentation de la teneur en MDA chez les deux modèles cellulaires étudiées et suite à l'exposition aux deux métaux et leur mélange. Il en est de même pour les travaux de Radwan *et al.* (2010) qui ont noté une induction significative du MDA après 48 h d'exposition chez les escargots *T. pisana* contaminés par le Cadmium et le Zinc.

L'évaluation du taux de MDA nous a permis d'étudier le phénomène de la peroxydation lipidique considérée comme la conséquence la plus remarquable suite à une atteinte radicalaire (Favier, 2003). En cas de stress oxydant, la membrane plasmique est la cible la plus privilégiée des radicaux libres. Où les lipides qui la constituent s'oxydent et se dégradent en donnant comme produit final : le Malondialdéhyde, qui représente alors un bio-marqueur précoce d'une peroxydation des lipides (Viarengo *et al.*, 2007). Avec pour conséquence une perte de la perméabilité et du potentiel membranaire, une inactivation des récepteurs et des enzymes membranaires (Pampanin *et al.*, 2005) entraînant des dommages de l'ADN et une mort cellulaire (Marnett, 2002).

Chapitre IV : Discussion

Nos résultats confirment l'idée que l'induction des bio-marqueurs enzymatiques et non-enzymatiques est un signe d'une atteinte mitochondriale après exposition aux métaux. Ce qui est en accord avec les travaux de **Wu *et al.* (2012)** et de **Iglesias-González *et al.* (2017)** puisqu'ils affirment qu'une exposition fréquente à l'Aluminium est souvent accompagnée par un dysfonctionnement de la mitochondrie. Il en est de même pour ceux de **Kumar *et al.* (2009)** qui ont travaillé sur diverses espèces animales et qui ont déduit que le traitement à l'Aluminium induit fortement le phénomène du stress oxydant, de même que les travaux de **Chen *et al.* (2020)** qui ont mis en évidence une génération des ERO après traitement de *S.cereviciae* par l'Aluminium causant ainsi l'induction de l'activité Superoxyde dismutase (SOD) et Catalase (CAT). Par ailleurs, nos résultats concordent avec les travaux d'**Alayat (2015)** qui confirme la toxicité du Chrome et son pouvoir générateur d'ERO chez trois types de céréales (blé dur, blé tendre et orge) conduisant par conséquent à divers perturbations biochimiques, enzymatiques, physiologiques et morphologiques chez les plantes.

Quel effet s'est manifesté au niveau morphologique ?

La détection d'anomalies morphologiques qui se manifestent chez les organismes d'eau douce constitue un outil privilégié pour la bio-surveillance des milieux aquatiques. En effet, elle permet ainsi d'améliorer la compréhension globale des mécanismes susceptibles d'engendrer des altérations au niveau cellulaire (**Moumeni, 2016**).

En effet, le cytosquelette est indispensable pour le soutien mécanique des cellules ; il lui fournit une certaine rigidité et permet la fixation des organites en stabilisant la morphologie cellulaire (**Azzouz, 2012 ; Bouraiou, 2022**). Dans des conditions défavorables, la relation membrane-cytosquelette peut être affectée en provoquant des dommages structuraux et conduisant à une mort cellulaire (**Friedl, 2003**).

Selon **Pudpong et Chantangsi (2015)**, les métaux lourds peuvent induire des altérations membranaires, entraînant une désorganisation osmotique qui provoquera par conséquent une vacuolisation cellulaire (**Smith 1983**). En fait, divers recherches ont démontrés que certains métaux lourds peuvent interagir sur l'actine et la tubuline (**Liu *et al.*, 2009**) qui représentent les principaux composants du cytosquelette et fonctionnent comme des échafaudages cellulaires afin de maintenir la morphologie. L'effet des métaux se manifeste dès la mise en contact avec les cellules. Cet effet se traduit essentiellement par une rupture cellulaire suggérant ainsi une

Chapitre IV : Discussion

toxicité élevée résultant de l'accumulation des métaux dans la membrane plasmique induisant ainsi une lyse cellulaire. (Madoni *et* Romeo, 2006)

Dans un premier temps, l'observation de *S.cereviciae* nous a permis de confirmer un taux de mortalité élevé chez les traitées par les fortes concentrations d'Aluminium, du Chrome et de leur combinaison.

Dans un second temps, l'observation des paramécies exposées aux concentrations d'Al, du Cr(VI) et de leur mixture nous a permis de détecter une multitude d'anomalies structurales, rejoignant les études de Mortimer *et al.* (2010) qui affirme que les protistes ciliés d'eau douce sont très sensibles aux contaminants environnementaux du fait qu'ils sont dépourvus de paroi cellulaire protectrice. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Boulassel (2013) et Moumeni (2016) qui ont enregistré des altérations structurales des paramécies suites à l'exposition respectives aux Paracétamol et Ibuprofène et à la Cycloxydime

Il en est de même pour les travaux de Bouraiou (2022) qui s'est intéressée à la caractérisation des atteintes morphologiques observées chez *Paramecium tetraurelia* suite aux traitements à divers combinaisons (CuO/Pesticide).

Sergeeva (2013) explique que ces dommages structuraux sont exclusivement attribuables à l'altération de l'interaction cytosquelette-membrane qui contribue à l'édification et à la stabilisation de la morphologie cellulaire, ce qui se traduit par l'émergence d'anomalies morphologiques. En revanche Mayne *et al.* (2018) suggèrent que l'altération morphologique de *Paramecium caudatum* traitées aux nanoparticules de magnétite est due à l'accumulation de ces molécules dans les vésicules intracellulaires et le cytoplasme.

Quel impact sur le comportement cellulaire ?

Avant de répondre à cette interrogation, il est nécessaire de savoir que les paramécies sont des protistes qui possèdent la capacité d'adapter leur comportement et leur mode de déplacement en présence d'un agent exogène. Ce qui les rend un modèle privilégié en termes de recherche en toxicologie et en éco-toxicologie. En fait, toute perturbation de leur

Chapitre IV : Discussion

comportement est un signe de la présence d'un agent contaminant dans leur milieu. (Shunmugam *et al.*, 2021).

Van Houten et Preston (1988) confirment la capacité des paramécies à détecter la présence de nombreuses substances chimiques dans leur milieu. Ainsi, elles peuvent réagir face à ces stimuli en changeant leur comportement natatoire. L'ensemble de ces modifications des voies de migration ou des trajectoires de déplacement impliquent une augmentation et/ou une diminution de la vitesse de nage, des altérations de l'amplitude ou la fréquence de rotation accompagnées par des changements brusques de direction de migration.

Machemer (2001) et **Azzouz (2012)** affirment que les trajectoires des paramécies sont généralement hélicoïdales autour d'un axe rectiligne. Cependant, en présence de plusieurs stimuli, ces trajectoires peuvent changer. Ces cellules avancent tout droit lorsqu'elle ne rencontre aucun obstacle, si un objet se situe sur son axe, elle change de direction. De plus, lorsque le stimulus provient de tous les côtés, la paramécie suit alors une direction aléatoire avec des changements brutaux de trajectoires.

Nos résultats mettent en évidence une perturbation de la trajectoire ainsi qu'un ralentissement de la vitesse de déplacement des cellules exposées aux deux métaux ainsi que leur combinaison. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bernal et Ruvalcaba (1996)** qui ont rapporté une perturbation du mouvement natatoire chez les paramécies en présence de concentrations élevées de plomb. Ou encore ceux de **Armus et al. (2006)** qui ont montré une réduction soudaine de la motilité suivie d'une lyse cellulaire immédiate chez *P. caudatum* exposées à des concentrations croissantes de nanoparticules d'oxyde de graphène (GO).

Zagata et al. (2015) parle d'une diminution de la vitesse de déplacement, d'une nage vers l'arrière, d'un phénomène de pivotement, d'encerclement et d'un mouvement vers l'avant dans une nouvelle direction suite à l'exposition de *Paramecium bursaria* aux Chlorure de Nickel. Nos résultats sont également en accord avec ceux de **Tarkington et al. (2016)** qui ont noté une perturbation de la vitesse de déplacement des paramécies après les avoir mis en contact avec les nanoparticules d'argile, et ceux de **Bouraiou (2022)** qui a mis en évidence une perte de la mobilité accompagnée de mouvements désordonnés et une perturbation de la vitesse de nage chez *Paramecium tetraurelia* exposée à la mixture nanoparticules CuO/Pesticides..

Plattner et al. (2001) et **Scarpelli et al. (2021)** rapportent que le changement de mouvement des paramécies est un signe d'une altération membranaire qui résulte d'une perturbation de l'écoulement du flux calcique aux seins des canaux Ca^{2+} et K^+ . Alors que

Chapitre IV : Discussion

Garza Amaya et al. (2023) expliquent la perturbation du comportement des paramécies traitées avec une mixture de métaux (Nickel/Cobalt) par l'accumulation de ces métaux à l'intérieur des cellules perturbant ainsi leurs fonctions cellulaires.

Quelle est la cible cellulaire du sulfate d'Aluminium et des Chromate de potassium ?

La mitochondrie est le siège principal de la respiration cellulaire, qui s'effectue au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Assaly, 2012**). Dans le cas d'une atteinte chimique exogène ou endogène, la perturbation de la respiration cellulaire provoque la formation des espèces réactives de l'oxygène. Ces ERO endommagent les structures cellulaires et peuvent entraîner la mort cellulaire (**Zorov et al., 2014**).

Le dysfonctionnement mitochondrial peut être induit par des molécules spécifiques ciblant les complexes et les enzymes mitochondriales. La trimétazidine, la prednisolone et les cyanures, interfèrent directement avec la fonction normale des mitochondries et perturbent la chaîne de transport d'électrons (**Huzar et al., 2013**).

La trimetazidine est une molécule qui inhibe la B oxydation plus précisément l'enzyme 3-ketoacyl CoA thiolase (**Xiao et al., 2023**). Une récente étude réalisée par **Al-Shorbagy et al. (2021)** a montré que la TMZ possède un effet thérapeutique bénéfique en atténuant les dommages oxydatifs, réduisant l'apoptose neuronale et en préservant l'intégrité cellulaire.

Le prednisolone est un glucocorticoïde qui agit en régulant l'expression du génome mitochondrial impliqué dans la glycolyse ou la production d'ATP, ce qui perturbera en conséquence le fonctionnement mitochondrial (**Kokkinopoulou, 2021**). Les travaux de **Karra et al. (2022)** ont révélé la présence de récepteurs de glucocorticoïdes dans les mitochondries hépatiques des rats soutenant l'hypothèse que ces molécules peuvent interagir directement avec le génome mitochondrial.

Les cyanures inhibent le cytochrome c oxydase (complexe IV) de la chaîne respiratoire mitochondriale et qui est relativement indispensable au passage des électrons et à la formation d'ATP (**Gandhirajan et al., 2018**). Ainsi, les travaux de **Turrens (2003)**, **Suzuki et al. (2011)** et **Deffieu et al. (2012)** confirment que le traitement des levures avec une concentration non létale de certains inhibiteurs tels le KCN accompagné par des conditions respiratoires limitées entraînent des dommages mitochondriaux avec la surproduction d'ERO. De plus, **Rydstrom**

Chapitre IV : Discussion

Lundin *et al.* (2017) démontrent que l'ajout de KCN aux mitochondries des levures de type sauvage entraîne une réduction complète de l'hème (a).

L'utilisation de ces molécules pharmacologiques connues comme inhibitrices de la mitochondrie nous a paru indispensable afin d'identifier les cibles intracellulaires des métaux étudiés (Al et Cr(VI)).

Nos résultats montrent que la croissance de *S.cerevisiae* est fortement inhibée après le traitement par la plus faible concentration du PDN et du KCN par rapport aux cellules exposées à la faible concentration de TMZ. Ces effets sont confirmés à l'aide des pourcentages de réponses, révélant des valeurs positives importantes et confirmant leur effet inhibiteur de croissance comparable à celui d'Al et du Cr(VI).

Il s'est avéré que le degré d'inhibition de la croissance des levures exposées à l'Al semble être similaire à celui de la TMZ. Tandis que l'exposition des levures au Cr a provoqué une inhibition de croissance qui semble être proche de celle induite par la PDN et les KCN.

Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action d'Al est proche de celui de la TMZ (inhibition de l'enzyme 3-ketoacyl CoA thiolase) alors que le Cr(VI) agit comme la PDN (atteinte du génome mitochondrial) et le KCN (inhibition du cytochrome c oxydase).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les modèles biologiques utilisés dans ce travail représentent un outil incontournable pour la biosurveillance de l'environnement. C'est dans cette optique que nous nous sommes penchés vers l'évaluation de la toxicité individuelle et mixte de l'Aluminium et du Chrome, considérés parmi les métaux les plus abondants dans le milieu naturel.

Nous avons choisis d'étudier les différentes atteintes physiologiques chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp.* Nos résultats ont montré : une inhibition de la croissance cellulaire accompagnée par des pourcentages de réponses positifs. Cependant, les levures semblent être plus résistantes que les paramécies connues pour leur sensibilité envers tout stress chimique.

Une induction du taux de protéines totales accompagnées par une déplétion de la teneur en lipides totaux. Cet effet nous renseigne sur l'atteinte des macromolécules biologiques et le déclenchement d'un système de réparation et/ou d'adaptation cellulaire.

Une stimulation de l'activité CAT et de GST parallèlement à l'augmentation du taux de GSH indiquent le déclenchement du processus de défense radicalaire.

Une augmentation de la teneur en MDA qui témoigne d'une atteinte membranaire. Ces effets sont plus prononcés lors de l'exposition à la combinaison (Al/Cr(VI)), créant un effet additif où la toxicité des deux métaux est renforcée lorsqu'ils sont associés, et dépasse celle observée pour chaque métal séparément.

Une altération de la morphologie des paramécies exposées aux métaux et leur mixture confirmant l'interaction directe de ces molécules avec les organites cellulaires causant une mort cellulaire.

Une perturbation du comportement des paramécies exposées à ces métaux montrant qu'ils affectent leur motilité, notamment en perturbant la structure et la fonction des cils membranaires, ce qui altère le flux calcique et confirme leur toxicité potentielle.

Ainsi, notre hypothèse est que ces molécules pourraient se lier aux sites des récepteurs membranaires, en modifiant ainsi leur conformation et leur capacité à reconnaître et se lier à leurs ligands originaires ce qui perturbera par conséquent les voies de signalisation entraînant des réponses cellulaires anormales.

D'un autre côté, l'évaluation de l'impact des molécules inhibitrices de la mitochondrie sur la prolifération de *Saccharomyces cerevisiae* indique bel et bien une atteinte mitochondriale. Leurs effets sont comparés à ceux induits par l'Aluminium et le Chrome révélant une certaine ressemblance du mécanisme d'action entre l'Aluminium et la Trimetazidine parallèlement à une concordance entre l'effet du Chrome et celui de la Prednisolone et des Cyanures. Ces résultats permettent de déduire la possibilité d'une réaction directe des métaux étudiés avec la mitochondrie, entraînant ainsi son implication dans la génération d'un stress oxydatif et de la mort cellulaire.

Perspectives :

Ces résultats suggèrent l'importance d'explorer davantage les effets de ces métaux sur les organismes vivants et leur environnement. Ouvrant ainsi la voie à des recherches futures dans cet axe de bio-surveillance afin de prévenir les impacts néfastes de la contamination métallique.

Plusieurs interrogations demeurent obscures nécessitant des études plus amples dans ce domaine. En général, il est crucial d'approfondir ces recherches en se focalisant sur :

- L'étude du métabolisme respiratoire des cellules exposés aux métaux avec et sans introduction de molécules inhibitrices de mitochondrie.
- L'exposition des modèles cellulaires alternatifs à des combinaisons complexes de métaux (plus de 2 molécules)
- L'évaluation de la toxicité de ces métaux sur des organismes supérieurs bio-indicateurs de pollution aquatique et terrestre végétales et animales afin d'estimer leur impact sur une large gamme d'organismes vivants.
- La modélisation des résultats afin de prédire les effets de ces molécules à long terme.
- Le développement d'une stratégie de bio-remédiation afin d'atténuer les impacts des métaux sur les écosystèmes.
- Concernant les paramécies en particulier, il serait judicieux d'étudier l'impact des métaux sur la structure des cils contractiles, ces derniers sont les premiers responsables à la motilité et la capture alimentaire de ces protistes.
- Il serait également important d'étudier les atteintes morphologiques des levures à l'aide de la microscopie électronique par exemple.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdalla R.P., Kida B.M.S., Pinheiro J.P.S., Oliveira L.F., Martinez C.B.F., Moreira R.G., 2019. Exposure to aluminum, aluminum+manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 215,33.

Abdel-Daim M. M., Abdelkhalek N. K., Hassan A. M., 2015. Antagonistic activity of dietary allicin against deltamethrin-induced oxidative damage in freshwater Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 111, 146-152.

Acceituno F.E.A., 2013. Systematic characterization of the oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* ec1118 in oenological conditions. Thèse de Doctorat. Pontificia Universidad Catolica de Chile. 124.

Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J., 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19): 3527–3532.

Adli C., 2016. Quantification des éléments traces métalliques (cadmium, plomb et mercure total) de certains produits de la pêche débarqués dans la zone Essaouira-Dakhla : Evaluation des risques sanitaires. Thèse de Doctorat. Univ. Ibn Zohr. Maroc. 91.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry., 2008. Toxicological profile for Aluminum. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Alayat A., 2015. Etude de l'Impact toxicologique de certains agents chimiques sur la qualité des céréales: cas du Blé et de l'Orge, Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba, Algérie.

Allaf M.M., Trick C.G.,2015. Yeast Cell as a Bio-Model for Measuring the Toxicity of Fish-Killing Flagellates. *Toxins (Basel)*. 13 (11), 821.

Al-Shorbagy Y.M., Wadie W., El-Tanbouly D.M., 2022. Trimetazidine Modulates Mitochondrial Redox Status and Disrupted Glutamate Homeostasis in a Rat Model of Epilepsy, *Front. Pharmacol.* 12:735165.

Amamra R., Djebar M. R., Moumeni O., Azzouz Z., Zeriri I., Atailia A., Berrebbah H., 2015. Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 6(4), 115-123.

Angerville R., 2009. Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau : Application à une ville française et à une ville haïtienne, Thèse de Doctorat, L'institut National Des Sciences Appliquées De Lyon, France.

Références bibliographiques

- Anselmetti J., 2017.** Etude de l'exposition professionnelle au chrome dans une aciérie produisant des aciers inoxydables, Thèse de Doctorat, Université Grenoble Alpes, France.
- ANSES., 2010.** Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel. Les composés du chrome hexavalent. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Maisons-Alfort: Anses.
- Aranguren M. M. S., 2008.** Contamination en métaux lourds des eaux de surface et des sédiments du Val de Milluni (Andes Boliviennes) par des déchets miniers Approches géochimique, minéralogique et hydrochimique. Thèse de Doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France. 490.
- Armus H. L., Montgomery A. R., Jellison J. L., 2006.** Discrimination learning in paramecia (*P. caudatum*). The Psychological Record, 56, 489-498.
- Arrigo K. R., Robinson D. H., Worthen D. L., Dunbar R. B., DiTullio G. R., VanWoert M., Lizotte M. P., 1999.** Phytoplankton community structure and the drawdown of nutrients and CO₂ in the Southern Ocean. Science, 283(5400), 365-367.
- Assaly R., 2012.** Protection du myocarde ischémique et pore géant mitochondrial : applications pharmacologiques, Thèse de Doctorat, Université Paris SUD11, France.
- Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S., 2014.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative medicine and cellular longevity.
- Azzouz Z., Berrebbah H., Djebbar M. R., 2011.** Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. African Journal of Microbiology Research, 5(20), 3243-3250.
- Azzouz, Z., 2012.** Etude des effets toxiques d'un fongicide (Amistar Xtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba.
- Babich H., Stotzky G., 1980.** Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms, Crit. Rev. Microbiol. 8, 991-145.
- Barabasz, W., Albinska, D., Jaśkowska, M., Lipiec J., 2002.** Ecotoxicology of Aluminium. Polish Journal of Environmental Studies, 11.
- Barata C., Varo I., Navarro J. C., Arun S., Porte C., 2005.** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 140(2), 175-186.
- Batiste E., 2014.** L'aluminium, un produit dangereux pour la santé présent en thérapeutique et en cosmétique : mythe ou réalité ?, Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.
- Bayliak M.M., Lylyk M.P., Gospodaryov D.V., Kotsyubynsky V.O., Butenko N.V., Storey K.B., 2019.** Protective effects of alpha-ketoglutarate against aluminum toxicity in *Drosophila melanogaster*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.

Références bibliographiques

- Beal D.L., Anderson R.V.,1993.** Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 51, 551–556.
- Beaumont A., Cassier P., 1998.** Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3ème édition DUNOD, 123-143.
- Becaria, A., Campbell A., Bondy S. C., 2002.** Aluminum as a toxicant. Toxicology and Industrial Health, 18 (7):309-320.
- Belabed S., 2010.** Contribution à l'Etude de la Pollution Métallique du Sol et de la Végétation au Niveau des Décharges publiques non Contrôlées à Mostaganem. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. 173.
- Belhamzaoui K., Djebar M-R., Tichati L., Laouabdia Sellami M., Berrebbah H., Rouabhi R., 2023.** Response Against Ethinyl Estradiol and Levonorgestrel of *Daphnia Magna*: Immobilization and Oxidative Stress Assessment, Journal of Chemical Health Risks, 13(6), 145-157.
- Ben Khelil, M., Ben Said, O., Nefzi, R., Ben Abdelmalek, J., Aïss, P., 2012.** Étude expérimentale de l'évolution en microcosme du chrome (VI) dans l'eau de mer et de ses effets sur la macrofaune et les bactéries indigènes de la Lagune de Bizerte (Tunisie). Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, 25(3), 221–234
- Benbouzid H., 2012.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie ,87.
- Benguedda-Rahal W., 2012.** Contribution à l'étude de la bioaccumulation métallique dans les sédiments et différents maillons de la chaîne trophique du littoral extrême ouest Algérien. Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen, Algérie.
- Benlaifa M., 2015.** Evaluation de la toxicité à court terme générée par une pollution mixte « Pesticides/ Métaux lourds » sur un modèle unicellulaire alternatif : *Paramecium sp*, Thèse de Doctorat, Université de Annaba, Algérie.
- Benyettou B., Kharoubi O., Hallal N., Benyettou H.A., Tair K., Belmokhtar M. Aoues A., Ozaslan M., 2017.** Aluminium-Induced Behavioral Changes and Oxidative Stress in Developing Rat Brain and the Possible Ameliorating Role of Omega-6/Omega-3 Ratio. Journal of Biological Sciences, 17,106.
- Bernal J., Ruvalcaba S., 1996.** Pharmacological prevention of acute lead poisoning in *Paramecium*. Toxicology, 108(3), 165-173.
- Berrebbah H., 1990.** Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VII.
- Bertazzi D., 2012.** Analyse des mécanismes cellulaires responsables de maladies neurodégénératives dans le modèle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : analyse

Références bibliographiques

fonctionnelle de myotubularines responsables de pathologies humaines. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, France.

Besnaci S., Bensoltane S., Djekoun M., 2019. Oxidative stress and histopathological changes induced by the nno-Fe₂O₃ in *Helix aspersa*. Scientific Study & Research. 20(2).119-133

Bignucolo A., Lemire J., Auger C., Castonguay Z., Appanna, V., Appanna V. D., 2012. The molecular connection between aluminum toxicity, anemia, inflammation and obesity: therapeutic cues. Anemia. InTech, 403-424.

Biney A.T., Amuzou A.T., 1994. Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain. F.A.O. Document technique du C.P.C.A., N° 25, 3767.

Bo L., Wang D., Li T., Li Y., Zhang G., Wang C., 2015. Accumulation and risk assessment of heavy metals in water, sediments, and aquatic organisms in rural rivers in the Taihu Lake region, China. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 6721-6731.

Borotova P., Drobny M., Navratilova A., Pozgajova1 M., 2019. Cytotoxic effect of aluminium ions on unicellular eukaryotic organism. Acta fytotechn zootech, 22,(4) : 130–137.

Bouaricha H., 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 55.

Boudjellal A., El-Hadef El-Okki M., Al Mualad W.N.A., Allam O., Bader R., Bassi N., Benguedouar K., Benhamiche H., Benhamimid H., Boudaoud C., Boussekine R., Bouziane M., Kheroufi A., Ksier D., Makhlouf F.Z., Mansouri S., Mekaoussi I., Meradji M., Messiouid Y., Moali M., Mouzai A., Sahli K., Sayah T.M., Agli A. 2022. Impact de l'aluminium sur la santé humaine. Algerian Journal of Nutrition and Food Sciences, 2(1), 1–16

Bouilly K., 2004. Impact de facteurs environnementaux sur l'aneuploïdie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, dans le bassin de Marennes-Oléron. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, France.

Boulassel A., 2013. Evaluation de la toxicité de deux médicaments : le Paracétamol et l'Ibuprofène sur un modèle cellulaire : *Paramecium tetraurelia*. Essai à l'échelle subcellulaire. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie. 134.

Bouraiou C., 2022. Effets combinés de nanoparticules de CuO et du Chlorpyrifos (organophosphoré) sur certains modèles alternatifs : *Paramecium sp* et *Daphnia magna*, Thèse de Doctorat, Université de Annaba, Algérie.

Boutonnet F., 2000. Rapport de réseau de surveillance de la qualité de l'air, université d'Orléans, 5.

Bryliński Ł., Kostelecka K., Woliński F., Duda P., Góra J., Granat M., Flieger J., Teresiński G., Buszewicz G., Sitarz R., Baj J., 2023. Aluminium in the Human Brain: Routes of Penetration, Toxicity, and Resulting Complications. International Journal of Molecular Science. 24, 7228.

Références bibliographiques

Burgeot T., Bustamante P., Fort J., Coutellec M.A., Azam D., Olivier G., Chaumot A., Armengaud J., Maltby L., Minier C., 2020. Etude de la qualité des milieux aquatiques : Caractérisation des impacts écotoxiques. ISTE éditions, 70.

Bustamante P., Cosson R. P., Gallien I., Caurant F., Miramand P., 2002. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine environmental research*, 53(3), 227-241.

Capriello T., Di Meglio G., De Maio A., Scudiero R., Bianchi A.R., Trifuoggi M., Toscanesi M., Giarra A., Ferrandino I., 2022. Aluminium exposure leads to neurodegeneration and alters the expression of marker genes involved to parkinsonism in zebrafish brain. *Chemosphere*, 307 (1), 135752.

Chassard-Bouchaud C., Galle C., Lopez-Rabereau E., 1992. Bioaccumulation d'aluminium chez la truite *Salmo trutta fario* soumise au retombées des pluies acides : étude structurale, ultrastructurale et microanalytique. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 5(1), 37-54.

Chen R., Zhu Q., Fang Z., Huang Z., Sun J., Peng M., Shi P., 2020. Aluminium induces oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Epub.

Cherait A., 2015. Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyrédines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress. Thèse de Doctorat, Université Badji mokhtar, Annaba, Algérie,

Chiffolleau J.C., 2001. La contamination métallique, IFREMER, Région Haute Normandie. (Programme scientifique Seine Aval), 8, 39.

Clairborne A., 1985. Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research* CRC. Press Boca. Raton, Florida. 283-284.

Compaoré E., Nanéma L. S., 2010. Compostage et qualité du compost de déchets urbains solides de la ville de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, *Tropicultura*, 28(4) : 232-237.

Côté G., 2003. Étude des Effets de L'aluminium sur L'algue Verte *Chlorella pyrenoidosa* dans des Milieux D'exposition Contenant des Fluorures. Institut National de la Recherche Scientifique, Canada.

Dahdouh F., Bendjeffal H., Nouacer Z., Moumene W., Zeminour M.E.H., Naous M., Djebbar H., 2019. Selenium Nanoparticles Attenuate Gentamycin-Induced Nephrotoxicity and Hematotoxicity in Female Swiss Albino Mice. *BioNanoSci*, 9, 356.

Damaj R., 2008. Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal- Clermont-Ferrand II, France ,171.

Darmendrial D., Baize J., Freyssinet P., Mouvet C., Salpéteur I., Warver P., 2000. Fonds géochimique naturel : Etat des connaissances à l'échelle nationale, INRA BRMG/RP-50518- FR :95p.

Références bibliographiques

- De Coen W. M., Janssen C. R., 2003.** The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(7), 1632-1641.
- Deffieu M., Bhatia-Kissova I., Salin B., Klionsky B.B, Pinson B., Manon S., Camougran N., 2012.** Increased levels of reduced cytochrome b and mitophagy components are required to trigger nonspecific autophagy following induced mitochondrial dysfunction, *Journal of Cell Science* 126, 415–426.
- Di Giulio R. T., Habig C., Gallagher E. P., 1993.** Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic toxicology*, 26(1-2), 1-22.
- Djekoun M., Berrebah H., Djebbar MR., 2015.** *In vivo* Cytotoxicity Assessment of Thiram: Physiological and Biochemical Changes in *Paramecium sp.* *Science and technology*, 320-326.
- Dravvik E., Altenburger R., Aoki Y., Backhaus T., Bahadori T., Barouki R., Brack W., Cronin M.T.D., Demeneix B., Hougaard Bennekou S., van Klaveren J., Kneuer C., Kolossa-Gehring M., Lebrecht E., Posthuma L., Reiber L., Rider C., Rügge J., Testa G., van der Burg B., van der Voet H., Warhurst A.M., van de Water B., Yamazaki K., Öberg M., Bergman Å., 2020.** Statement on advancing the assessment of chemical mixtures and their risks for human health and the environment. *Environ Int*, 134:105267.
- Draper H.H., Hadley M., 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 186, 241-431.
- Dröge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 82, 1, 47-95.
- Einicker-Lamas M., Antunes Mezian G., Benavides Fernandes T., Silva F.L.S., Guerra F., Miranda K., Attias M., Oliveira M.M., 2002.** *Euglena gracilis* as a model for study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution* 120: 779–786.
- Elliott P., Briggs D., Morris S., de Hoogh C., Hurt C., Jensen T.K., Maitland I., Richardson S., Wakefield J., Jarup L., 2001.** Risk of adverse birth outcomes in populations living near landfill sites. *BMJ*, 323(7309):363-8.
- Esmaeili V., 2018.** Effet de la toxicité du cuivre et du cadmium sur la physiologie cellulaire de l'algue verte *Oocystis polymorpha*, Mémoire, Université du Québec, Montréal, Canada.
- Exley C., 2013.** Human exposure to aluminium, *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15, 1807-1816.
- Fan H. F., Ding L., Du C. X., Wu X., 2014.** Effect of short-term water deficit stress on antioxidative systems in cucumber seedling roots. *Botanical Studies*, 55, 1-7.

Références bibliographiques

- Fan J., Cui Y., Wan M., Wang W., Li Y., 2014.** Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology for biofuels*, 7, 1-14.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Fekih A., Belhouari M., 1990.** Etude et application d'un modèle de diffusion de polluants à deux dimensions (cas de Ghazaouet). Mémoire d'ingénieur d'état en météorologie, institut hydraulique et formation de recherche, Oran, Algérie.
- Fenske C., Gunther B., 2001.** Electro-fishing in the lab: A new method to detect actual effects of heavy metals and organic pollutants in invertebrate indicator organisms. *Int.J.Hyg.Environ.Health*, 204:157 -163.
- Filiz V., Meral Ü., 2007.** Aluminum toxicity and resistance in higher plants, *Advances in Molecular Biology* (1): 1-12.
- Finney D. J., 1952.** LD 50 value determined using Karber's method (Revised). *Probit Anal*, Second. ed. Univ Press, Cambridge.
- Food and Drug Administration, 2002.** Aluminum in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition; amendment; delay of effective, *67:70691-70692*.
- Friedl P., Wolf K., 2003.** Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 3, 362-374.
- Galvez-Cloutier R., Lefrançois P. J., 2005.** Les sols contaminés par des métaux lourds : Distribution géochimique et techniques de restauration (Première partie), *Vecteur environnement*, 38(3).
- Garcia D., Lima D, da Silva D.G.H., de Almeida E.A., 2020.** Decreased malondialdehyde levels in fish (*Astyanax altiparanae*) exposed to diesel: Evidence of metabolism by aldehyde dehydrogenase in the liver and excretion in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110107.
- Gensemer R. W., Playle R. C., 1999.** The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. *Critical reviews in environmental science and technology*, 29(4), 315-450.
- Goddard M.R., Greig D., 2015.** *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Res*, 15(3).
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H, Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G., 1996.** Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287):546, 563-7
- Gouin C. A., Aka N., Adiaffi B., Bamba B. S., Soro N., 2016.** Pollution saisonnière des sédiments de lagune par des métaux lourds (Cu, Pb et Zn) en zone tropicale humide : cas de la lagune Mondoukou (Sud-Est de la Côte d'Ivoire), *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10 (2) :835-845.

Références bibliographiques

- Greulich K., Hoque E., Pflugmacher S., 2002.** Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 256-266.
- Gourari., 1991.** Contribution à l'étude de quelques rejets de l'usine d'électrolyse de zinc en Metanof de ghazaouet, mémoire DES écologie et environnement, institut de biologie, telemcen.
- Gourier-Fréry C., Fréry N., 2004.** Aluminium, EMC-Toxicologie-Pathologie, 1,3,79-95.
- Gräf F., Stahr K., 1999.** A Soil and Terrain Map of SW-Niger (NiSOTER). In: Atlas of Benin and Niger.
- Granum E., Raven J. A., Leegood R. C., 2005.** How do marine diatoms can fix 10billiontonnes of inorganic carbon per year? , *Journal of Botany*, (83):898-908.
- Grara N., Atailia A., Boucena M., Djebbar H., Djebbar M.R., 2016.** Etude biochimique et histopathologique de la toxicité des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est Algérien) chez *Helix aspersa*, *Journal of Mater Environ Sci*,7 (12), 4733-4741.
- Garza Amaya D. L., Thiel A., Möller M., Gasparoni G., Pirritano M., Drews F., Simon M., 2023.** Nickel and Cobalt Induced Toxicity in Paramecium: The Cellular View to Environmental Toxicants, 2-29.
- Guiffant D., 2008.** Utilisation de la levure en tant que modèle et outil : de la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique. Biologie moléculaire. Rennes, France.
- Gunderson M.P., Nguyen B.T, Cervantes Reyes J.C., Holden L.L., French J.M.T., Smith B.D., Lineberger C., 2018.** Response of phase I and II detoxification enzymes, glutathione, metallothionein and acetylcholine esterase to mercury and dimethoate in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Chemosphere*, 208,749.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974.** Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological chemistry*, 249,7130-7139.
- Hartung T., Hoffmann S., 2009.** Food for thought . on in silico methods in toxicology ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 26(3), 155–166.
- He H., Zou Z., Wang B., Xu G., Chen C., Qin X., Zhang J., 2020.** Copper Oxide Nanoparticles Induce Oxidative DNA Damage and Cell Death via Copper Ion-Mediated P38 MAPK Activation in Vascular Endothelial Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 3291.
- Herskowitz I., 1988.** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Microbial Rev* 52(4):536-53.
- Hlavay J., PolyakK.,Weisz M.,2001.** Monitoring of the natural environment by chemical speciation of elements in aerosol and sediment samples Presented at the Whistler 2000 Speciation Symposium, *Journal of Environmental Monitoring*, 3(1): 74-80.

Références bibliographiques

- Ho E., Karimi Galoughi K., Liu C.C., Bhindi R., Figtree G.A., 2013.** Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.*1(1):483-91.
- Hoet P., 2015.** Chrome et composés. EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement ,10(3):1 11.
- Huang Y., Chen H., Liu Q., Hu J., Hu D., Huang Z., Xu Z., Wan R., 2023.** Obesity difference on association blood malondialdehyde level and diastolic hypertension in the elderly population: a cross-sectional analysis. *European Journal of Medical Research*, 28 (44).
- Huggett R. J., Stegeman J. J., Page D. S., Parker K. R., Woodin B., Brown J. S., Bence A. E., 2004.** Biomarkers in fish from Prince William Sound and the Gulf of Alaska: 1999–2000. *Marine Environmental Research*, 58, 305-325.
- Hultberg B., Andersson A., Isaksson., 2001.** Interaction of metals and thiols in cell damage and Glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. *Toxicology*, 156: 93-100.
- Huzar T. F., George T., Cross, J. M., 2013.** Carbon monoxide and cyanide toxicity: etiology, pathophysiology and treatment in inhalation injury. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 7(2), 159–170.
- Igbokwe I.O., Igwenagu E., Igbokwe N.A., 2019.** Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects. *Interdiscip Toxicol*,2, 45.
- Ighodaro O.M., Ighodaro, O.M., & Akinloye, O.A., 2018.** First defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287.
- Iglesias-González J., Sánchez-Iglesias S., Beiras-Iglesias A., Méndez-Álvarez E., Soto-Otero R., 2017.** Effects of aluminium on rat brain mitochondria bioenergetics: an in vitro and in vivo study. *Molecular neurobiology*, 54, 563-570.
- Iwahashi H., Kawai R., 2000.** Hsp104 expression and morphological changes associated with disinfectants in environmental bioassay using stress response. *Water Science and Technology*, vol42, N7 pp 237-243.
- Jan A.T., Azam M., Siddiqui K., Ali A., Choi I., Haq Q.M.R., 2015.** Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12),29592.
- Jeffery EH, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger JL., 1996.** Systemic aluminum toxicity: effect on bone haematopoietic tissue and kidney. *Journal Toxicol Environ Health*.46(6):649–665.
- Jouany J. M., Vasseur P., Ferard J. F., 1982.** Ecotoxicite directe et integree du chrome hexavalent sur deux niveaux trophiques associes: *Chlorella vulgaris* et *Daphnia magna*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 27(3), 207-221.
- Kabata-Pendias A., PENDIAS H., 2001.** Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.

Références bibliographiques

- Kalia K., Flora S. J., 2005.** Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning, *Journal of occupational health*, 47(1):1-21.
- Kamola Z., 1995.** Notes on the Use of Invertebrates, especially Ciliates, in Studies on Pollution and Toxicity. *Foliabiologica (Krakow)*, 43 (1–2).
- Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R., 2011.** *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One* 6(2):e16015.
- Karra A.G., Sioutopoulou A., Gorgogietas V., Samiotaki M., Panayotou G., Psarra A G., 2022.** Proteomic analysis of the mitochondrial glucocorticoid receptor interacting proteins reveals pyruvate dehydrogenase and mitochondrial 60 kDa heat shock protein as potent binding partners, *Journal of Proteomics*, 257, 104509.
- Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H. C., Kahru A., 2009.** Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in vitro*, 23(6), 1116-1122.
- Khebbeb M., 2016.** Evaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules ZnO sur deux modèles biologique unicellulaires *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Kizek R., Vacek, J., Trnková L., Jelen F., 2004.** Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry*, 63(1-2), 19-24.
- Kocharin K., Siewers V., Nielsen J., 2013.** Improved polyhydroxybutyrate production by *Saccharomyces cerevisiae* through the use of the phosphoketolase pathway. *Biotechnol Bioeng* 110(8):2216-24.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A., 2005.** The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. *Plant Soil* 274, 175–195.
- Kokkinopoulou I., Moutsatsou P., 2021.** Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 6054.
- Kruger N.J., 2009.** The Bradford method for protein quantification. In *The Protein Protocols Handbook*, edited by Walker J.M., New Jersey. Humana Press, 17.
- Kumar V., Gill K. D., 2009.** Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Archives of toxicology*, 83, 965-978.
- Kumar V., Gill K.D., 2014.** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. *NeuroToxicology*, 41, 154.
- Kungang L., Ying C., Wen Z., Zhichao P., Lin J., Chen Y., 2012.** Surface Interactions Affect the Toxicity of Engineered Metal Oxide Nanoparticles toward *Paramecium*. *Chem Res Toxicol*, 25(8):1675- 1681.
- Labrot F., Ribera D., Denis M. S., Narbonne J. F., 1996.** *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase,

Références bibliographiques

catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers*, 1(1), 21-28.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions (introduction). *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*.

Lasserre J.P., Dautant A., Aiyar R.S., Kucharczyk R., Glatigny A., Tribouillard-Tanvier D., Rytka J., Blondel M., Skoczen N., Reynier P., Pitayu L., Rötig A., Delahodde A., Steinmetz L.M., Dujardin G., Procaccio V., di Rago J.P., 2015. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech*, 8 (6),509.

Leist M., Hasiwa N., Rovida C., Daneshian M., Basketter D., Kimber I., Clewell H., Gocht T., Goldberg A., Busquet F., Rossi AM., Schwarz M., Stephens M., Taalman R., Knudsen TB., McKim J., Harris G., Pamies D., Hartung T., 2014. Consensus report on the future of animal-free systemic toxicity testing. *ALTEX*. 31(3):341-56.

Leyral G., Vierling E., 2007. *Microbiologie et toxicologie des aliments, Hygiène et sécurité alimentaire*. 4ème ed, Biosciences et techniques, Bordeaux, 286.

Lin M.C., Liu C.C, Lin Y.C., Liao C.S., 2021. Resveratrol Protects against Cerebral Ischemic Injury via Restraining Lipid Peroxidation, Transition Elements, and Toxic Metal Levels, but Enhancing Anti-Oxidant Activity. *Antioxidants*. 10(10),1515.

Lin S., Austriaco N., 2014. Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*, *FEMS Yeast Research*, 14, 119–13.

Liu D., Xue P., Meng Q., Zou J and Gu J., 2009. Pb/Cu effects on the organization of microtubule cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum* L. *Plant cell reports*, 28: 695-702.

Livingstone D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev Med Vet* 154:427–430.

Maas G., 1987. La pollution de l'eau : origine naturel et effets des polluants, contrôle et législation. *Epuration des eaux*. WWE Belgique pp: 01-34. macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community”, *EcotoxEnviron, Safe* 57, 283-398.

Macdiarmid C.W., Gardner R.C., 1996. Al toxicity in yeast (A role for Mg?). In *Plant Physiology*, 112,3,1101–1109.

Machemer H., 2001. The swimming cell and its world: Structures and mechanisms of orientation in protists. *Eur. J. Protistol.* 37: 3-14.

Madoni P., Romeo M.G., 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environment and pollution*, 141: 1-7.

Madoni P., 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environnement pollution*, 109(1) : 53-59, 131. 125.

Références bibliographiques

- Mansano A.S., Moreira R.A., Dornfeld H.C., Freitas E.C., Vieira E.M., Daam M.A., Rocha O., Selegim M.H.R., 2020.** Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201 110829.
- Marín R., Abad C., Rojas D., Chiarello D.I., Alejandro T.G.,2023.** Biomarkers of oxidative stress and reproductive complications. *Adv Clin Chem.* 113:157-233.
- Marlène C., 2006.** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'ethanol .Thèse de doctorat.L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 265.
- Marnett L.J., 2002.**Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361–3701.
- Masaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K., 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.
- Mas-Bargues C., Escrivá C., Dromant M., Borrás C., Viña J.,2021.** Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 709, 108941.
- Mayne R., Whiting J., Adamatzky A., 2018.** Toxicity and applications of internalised magnetite nanoparticles within live *Paramecium caudatum* cells. *BioNanoScience*, 8(1), 90-94.
- McKenzie R.M., 1980.** The adsorption of Lead and other heavy metals on oxides of Manganese and Iron. *Aust, J. Soil. Res.* 18 61-73.
- Meyer E., Beisson J., 2005.** Épigénétique: la paramécie comme modèle d'étude. *Medecine/Sciences*,21,3, 377-83.
- Migdal C., Serres M., 2011.** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Synthèse Revue*, 27,405-412.
- Migeon A., 2009.** Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : Bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation, Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, France.
- Miquel M. G.,2001.** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, Rapport 261, Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques, 365.
- Mirza A., King A., Troakes C., Exley C.,2017.** Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 30.
- Miyoshi N., Kawano T., Tanaka M., Kadono T., Kosaka T., Kunimoto M., Takahashi T., Hosoya H., 2003.** Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: Determination of IC50 values for water pollutants. *Journal of Health Science*, 49, 429-435.

Références bibliographiques

- Mohammadi S., Saberidokht B., Subramaniam S., Grama A., 2015.** Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC Syst Biol*, 29 (9) ,96,2.
- Mortimer M., Kasemets K., Kahru A., 2010.** Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269,182-189.
- Moumeni O., 2016.** Etude de la toxicité d'un cyclohexanedione (herbicide) sur deux modèles biologiques d'eau douce : *Paramecium tetraurelia* et *Daphnia magna*. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Mouneyrac C., Buffet P.E., Poirier L., Zalouk-Vergnoux A., Guibbolini M., Riso-de Faverney C., Perrein-Ettajni H., 2014.** Fate and effects of metal-based nanoparticles in two marine invertebrates, the bivalve mollusc *Scrobicularia plana* and the annelid polychaete *Hediste diversicolor*, *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (13), 7899-7912.
- Mountassif D., Kabine M., Manar R., Bourhim N., Zaroual Z., Latruffe N., 2007.** Physiological, morphological and metabolic changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vivo cytotoxicity assessment of metallic pollution: Impact on d-β-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Ecological Indicators*, 7(4), 882-894.
- Othmani H., 2018.** Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds sur le comportement d'un modèle animal du groupe des Coelomates. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Padmaja G., Rao L., 1999.** Effect of Cadmium on the Protein Content in *Channa punctatus*. The Fourth Indian Fisheries Forum Proceedings, 133-134.
- Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C., 2005.** Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Venice Lagon (Italy). *Mar. Pollut.* 1548-1557.
- Parent L., 1991.** Biodisponibilité de l'aluminium dans les eaux douces en relation avec les pluies acides. Institut National de la Recherche Scientifique, Canada.
- Pearson G., 1963.** Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc*, 85, 3533–3539
- Pérez R.M., Alonso J.A, López C.H., 2002.** Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*. 84, 3, 265-270.
- Plattner H, Klauke N., 2001.** Calcium in ciliated protozoa: sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. *Int Rev Cytol.*, 201:115-208.
- Pol D ., 1997.** Travaux pratiques de biologie de la levure, Ellipses, 59-107.
- Popescu M., Blanchard J.M., Carre J., 1998.** Analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels : émissions, fumées, odeurs et poussières. Edition Lavoisier TFC et DOC : 15-666-667.
- Popescu V., 1998.** Thèse de Doctorat, Université de Bucharest.

Références bibliographiques

- Prokić M., Borković-Mitić S., Krizmanić I., Gavrić J., Despotović S., Gavrilović B., Radovanović T., Pavlović S., Saičić Z., 2017.** Comparative study of oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the liver of *Pelophylax esculentus* complex frogs. *Saudi J Biol Sci*,(1),51.
- Pudpong S., Chantangsi C., 2015.** Effects of Four Heavy Metals on Cell Morphology and Survival Rate of the Ciliate *Bresslauides* sp. *Tropical Natural History*, 15(2), 117-125.
- Quig D., 1998.** Cysteine metabolism and metal toxicity, *Altern Med Rev*,3(4):262-70.
- Radwan M. A., El-Gendy K. S., Gad A. F., 2010.** Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*, 79(1), 40-46.
- Radwan M. A., Essawy A. E., Abdelmeguid N. E., Hamed S. S., Ahmed A. E., 2008.** Biochemical and histochemical studies on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pesticide biochemistry and Physiology*, 90(3), 154-167.
- Rahimzadeh M.R., Rahimzadeh M.R., Kazemi S., Amiri R.J., Pirzadeh M., Moghadamnia A.A., 2022.** Aluminum Poisoning with Emphasis on Its Mechanism and Treatment of Intoxication. *Emerg Med Int*, 2022,1480553.
- Ramade F., 1993.** Dictionnaire encyclopedique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Ediscience internationnal, Paris.
- Ramade F., 2002.**Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Editions Dunod, 1075.
- Ramos-Perez C., Lorenzo-Castrillejo I., Quevedo O., Garcia-Luis, J., Matos-Perdomo E., Medina-Coello C., Estevez-Braun A., Machin F., 2014.** Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent betalaphachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. *Biochemical Pharmacology*, 92 (2):206-219.
- Reddam A., McLarnan S., Kupsco A., 2022.**Environmental Chemical Exposures and Mitochondrial Dysfunction: a Review of Recent Literature,*Environmental Epigenetics*,631-649.
- Regoli F., Principato G., 1995.** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to, metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers, *Aquatic Toxicology*, 31, 143-164.
- Ribera D., Narbonne J F., Arnaud C., Saint Denis M., 2001.** Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1123–1130.
- Rocken W., Strauss M., 1976.** *Monatsschrift fur Braure*, 5,209.
- Rosseland BO, Eldhuset TD, Staurnes M.,1990.** Environmental effects of Aluminium. *Environ Geochem Health*, 12(1-2):17-27.

Références bibliographiques

- Rouabhi R., Djebbar H., Djebbar M.R., 2009.** Toxic Effects of Combined Molecule from Novaluron and Diflubenzuron on *Paramecium caudatum*. Am-Euras. J. Toxicol. Sci. 1, 74-80.
- Rouimi P., 2016.** Effets "cocktails" des contaminants alimentaires : Problématique des résidus de pesticides dans l'alimentation. 57èmes Journées Nationales de Diététique et de Nutrition - Marseille, 2-4 mai 2016, Marseille, France.
- Rovida C., Asakura S., Daneshian M., Hofman-Huether H., Leist M., Meunier L., Reif D., Rossi A., Schmutz M., Valentin J.-P., Zurlo J., Hartung T., 2015.** Toxicity testing in the 21st century beyond environmental chemicals, ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 32(3). 171-181.
- Roy J., Galano J. M., Durand T., Le Guennec J. Y., Lee J. C. Y., 2017.** Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. FASEB Journal, 31(9), 3729-3745.
- Roy R. L., 1997.** La Toxicité de Mélanges de Métaux (Al, Zn), en Conditions Acides vis-à-vis du Saumon de L'atlantique *Salmo Salar*. Institut National de la Recherche Scientifique, Canada.
- Rybak M., Kołodziejczyk A., Joniak T., Ratajczak I., Gąbka M., 2017.** Bioaccumulation and toxicity studies of macroalgae (*Charophyceae*) treated with aluminium: Experimental studies in the context of lake restoration. Ecotoxicol Environ Saf, 145:359-366.
- Rydström Lundin C., Brzezinski P., 2017.** Modulation of O₂ reduction in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. FEBS Lett. 591(24):4049-4055.
- Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Smagghe G., Djebbar M.R., 2009.** Behavior of *Paramecium sp.* treated with bifenthrin with special emphasis on respiratory metabolism, protein and generation time. American-Eurasian J. Toxicol. Sci. 1, 13-18.
- Sergeeva Y., 2013.** Complexes ADN/polycation en solution et aux interfaces en tant que vecteurs de transfection non viraux de pointe, Thèse de Doctorat, Strasbourg, France.
- Scarpelli PH, Pecenin MF, Garcia CRS., 2021.** Intracellular Ca²⁺ Signaling in Protozoan Parasites: An Overview with a Focus on Mitochondria. Int J Mol Sci, 5;22(1):469.
- Shadel G.S., Horvath T.L., 2015.** Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis, Cell, 163(3):560-9.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., Newhall A., Freidman L., 1966.** method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. Anal. Biochem, 19, 415-428.
- Shaikh H.M.S., Pimpliskar M., 2022.** Effect of heavy metals on paramecium found in different water bodies of Bhiwandi. IP Int J Med Microbiol Trop Dis, 8(2), 127-131.
- Shunmugam A.P., Subramanian G., Fernandez J.G., 2021.** Measurements of the swimming speeds of motile microorganisms using object tracking and their correlation with water pollution and rheology levels. Sci Rep 11, 11821.

Références bibliographiques

- Simarani K., Yusoff H.A.C., Alias Z., 2016.** Purification of Glutathione Transferases (GSTs) from Identified Rhizospheric Bacteria. *Sains Malaysiana*, 45 (7), 1057.
- Simkiss K., 1983.** Lipid solubility of heavy metals in saline solutions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 63(1):1-7.
- Simon M., Plattner H., 2014.** Unicellular Eukaryotes as Models in Cell and Molecular Biology: Critical Appraisal of Their Past and Future Value, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 309, 141-198,
- Simon M.N., 2011.** Determination of Oxygen Utilization Pathways in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86, 2, 154-163.
- Smith M.A., 1983.** The effect of heavy metals on the cytoplasmic fine structure of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). *Protoplasma*, 116 : 14-23.
- Sonthonnax J., 2014.** L'aluminium est son potentiel toxique. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Limoge, France.
- Sousa C.A., Soares H.M. V. M., Soares E.V., 2019.** Metal(loid) oxide (Al_2O_3 , Mn_3O_4 , SiO_2 and SnO_2) nanoparticles cause cytotoxicity in yeast via intracellular generation of reactive oxygen species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:6257–6269.
- Squinazi F., 2020.** Synthèse : Les effets du plomb sur la santé, *Environnement Risques & Santé*, 5 (1) : 26.
- Suzuki S.W., Onodera J., Ohsumi Y., 2011.** Starvation induced cell death in autophagydefective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One* 6, e17412.
- Tarkington, L., Bryan, M., Kolhatkar Tejas, W., Markle Nathanael, W., Elizabeth, J., Raska, A., Michael, M., Cubacub., Supparesk Ritti kulsittichai., Chien-Hung Li., Yi-Ting Chen., Andrew Jamison, C., 2016.** Magnetic Microorganisms: Using Chemically Functionalized Magnetic Nanoparticles To Observe and Control Paramecia. *American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc. J. Chem. Educ.* 2017, 94, 85–90.
- Thuriaux P., 2004.** Les organismes modèles de la levure. Ed. Belin. P: 15, 17, 23, 24, 27, 42 et 44.
- Tlili S., 2012.** Approche multimarqueurs pour l'évaluation de l'état de santé du golfe de Tunis. Etude des réponses biochimiques, physiologiques et cytologiques des mollusques bivalves exposés aux effluents des oueds, Thèse de Doctorat, Université de Monastir Institut supérieur de Biotechnologie, 250.
- Tomaska L. 2000.** Mitochondrial protein phosphorylation: lessons from yeasts. *Gene*. 255, 59-64.
- Turrens J. F., 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.

Références bibliographiques

- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1):1-40
- Van Houten J., Preston R.R., 1988.** Chemokinesis. In: Görtz H. D. (ed.): *Paramecium*. Springer, Berlin, Heidelberg, 282-300.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E., Koehler A., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Wang B., Wang Y., Zhang J., Hu C., Jiang J., Li Y., Peng Z., 2023.** ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol* 97, 1439.
- Wang J.L., Chen C., 2009.** Biosorbents for Heavy Metals Removal and Their Future. *Biotechnology Advances*, 27, 195-226.
- Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G., 2004.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44(4), 381-386.
- Wechbeker G., Cory., 1988.** Ribonucleotidreductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40, 257-264.
- 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.
- Wong C.K., Cheung Ming-Ho Yo., 1999.** Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. *Environmental pollution*, 105, 175-183.
- Wong M. H., Lau W. M., Tong T. Y., Liu W. K., Luk, K. C., 1982.** Toxic effects of chromic sulphate on the common carp, *Cyprinus carpio*. *Toxicology letters*, 10(2-3), 225-232.
- Wu Q. S., Xia R. X., Zou Y. N., 2006.** Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. *Journal of plant physiology*, 163(11), 1101-1110.
- Wu Z., Du Y., Xue H., Wu Y., Zhou B., 2012.** Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of aging*, 33(1), 199-e1.
- Xia S., Song Z., Jeyakumar P., 2020.** Characteristics and applications of biochar for remediating Cr(VI)-contaminated soils and wastewater. *Environ Geochem Health* 42, 1543–1567.
- Xiao Z, Guan L, Shi H, Yu Y, Yu Z, Qin S, Su Y, Chen R, Li M, Ge J. 2023.** Trimetazidine Affects Mitochondrial Calcium Uniporter Expression to Restore Ischemic Heart Function via Reactive Oxygen Species/NFκB Pathway Inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1;82(2):104-116.

Références bibliographiques

Xiaoxia Y., Yufang S., Jianrong K., Xiufeng C., 2012. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, 86, 162–167.

Yang X., Song Y., Kai J., Cao X., 2012. Enzymatic biomarkers of earthworms *Eisenia fetida* in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 162-167.

Yin F., Boveris A., Cadenas E., 2014. Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Signaling in Brain Aging and Neurodegeneration, *Antioxid Redox Signaling*, 20(2): 353–371.

Yin J. J., Liu J., Ehrenshaft M., Roberts J. E., Fu P. P., Mason R. P., Zhao B., 2012. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and applied pharmacology*, 263(1), 81-88.

Yokel R.A., McNamara P J., 2001. Aluminium Toxicokinetics: An Updated MiniReview, *Pharmacology & Toxicology*, 88, I4,159-167.

Yokel R.A., 2002. Aluminum chelation principles and recent advances. *Coord. Chem. Rev.*, 228, 97-113.

Yu Y., Di Trapani, G., Tonissen K.F., 2022. Thioredoxin and Glutathione Systems. Ed: Chakraborti S., Ray B.K., Roychoudhury S. *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects.* Springer, 2407.

Zagata P., Kopańska M., Greczek-Stachura M., Burnecki T., 2015. Acute toxicity of metals: Nickel and Zinc to *Paramecium bursaria* and its endosymbionts. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 128-131.

Zaoui L., Djebar M.R., 2011. Le stress oxydatif comme processus inducteur d'action toxique du Cadmium sur la Levure (*Saccharomyces cerevisiae*), *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE*, 6, 23.

Zheng A. X., Cong Z. X., Wang J. R., Li J., Yang H. H., Chen G. N., 2013. Highly-efficient peroxidase-like catalytic activity of graphene dots for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 519-524.

Zheng S., Wang Y., Zhou Q., Chen C., 2013. Responses of Oxidative Stress Biomarkers and DNA Damage on a Freshwater Snail (*Bellamya aeruginosa*) stressed by Ethylbenzene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 65, 251–259.

Zorov D.B., Juhaszova M., Sollott S.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*, 94(3):909-50.