

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR –  
ANNABA

جامعة باجي مختار  
عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

**Intitulé**

**Utilisation de Modèles Alternatifs et Prédicatifs dans l'Étude  
des Micropolluants en Toxicologie Environnementale**

**Présentée par : NAMANE Imen**

**Directeur de thèse : Djebbar-Berrebbah (Pr, Université Badji Mokhtar -  
Annaba)**

**Devant un jury composé de :**

Pr. Sbartai Ibtissem	Présidente	Université Badji Mokhtar – Annaba
Pr. Kadri Skander	Examineur	Université Badji Mokhtar – Annaba
Dr. Benosmane Sana	Examinatrice	Université 8 Mai 1945 – Guelma
Dr. Alayat Amel	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid – El Tarf

Année universitaire : 2024/2025

## **Remerciements**

*Je tiens à profiter de ce manuscrit pour remercier toutes les personnes qui ont permis, directement ou indirectement, la réalisation de ce travail au sein du laboratoire de Toxicologie Cellulaire.*

*Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Professeur **BERREBBAH Houria**, pour son encadrement de qualité, sa disponibilité, ses conseils, ainsi que pour son soutien indéfectible lors des moments où le travail a pu sembler plus difficile à mener. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa gentillesse et sa sympathie.*

*Je remercie énormément le Professeur **DJEBAR Mohamed Reda** pour son soutien, ses conseils précieux, son dynamisme et ses approches scientifiques très élaborées. J'ai beaucoup appris à ses côtés.*

*J'exprime aussi toute ma reconnaissance à **Madame la professeur BERREDJAM Malika** et le docteur **BOUZINA Abdeslam**, du **Laboratoire de Chimie Organique et Appliquée**, pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur collaboration tout au long de la synthèse des composés étudiés. Leur contribution a été essentielle à la réussite de ce travail expérimental.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Madame la Professeure **SBARTAI Ibtissem** de l'Université Badji Mokhtar – Annaba, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.*

*Je remercie également Monsieur le Professeur **Kadri Skander**, de l'Université Badji Mokhtar – Annaba, ainsi que le docteur **Benosmane Sana**, Maître de conférences à l'Université 8 Mai 1945 – Guelma, et docteur **Alayat Amel**, Maître de conférences à l'Université Chadli Bendjedid – El Tarf, qui ont accepté d'évaluer la qualité de mon travail.*

*Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble du personnel du **Laboratoire de Toxicologie Cellulaire** pour leur aide et leur bonne humeur au quotidien : **Lynda, Medina, Chiraz et Meriem**.*

## ***Dédicace***

*À mes chers parents, pour leur soutien indéfectible tout au long de mon parcours.*

*À, Choukri, pour sa présence constante et son encouragement.*

*À mes enfants, Kenza, Jassim et Zyna, qui sont ma source d'inspiration et de force.*

*À ma sœur, Jihene, et à mon frère, Karim, pour leur affection et leur soutien.*

*À mes beaux-parents, pour leur bienveillance et leur soutien.*

*À tous mes amis proches et à ma grande famille, pour leur amitié précieuse.*

## Résumé

La classe chimique des amidophosphonates, appartenant aux organophosphorés, est reconnue pour ses diverses activités biologiques. Cependant, leur large utilisation soulève des préoccupations quant à leur toxicité potentielle et leurs effets sur l'environnement. Dans cette étude, nous avons évalué la toxicité biologique de deux amidophosphonates nouvellement synthétisés (AP1 et AP2), proposés comme alternatives potentielles au glyphosate, pesticide de référence, en utilisant des modèles biologiques alternatifs : *Paramecium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae*.

Nos résultats montrent que, d'un côté, les trois molécules provoquent une inhibition de la croissance cellulaire et une perturbation du métabolisme respiratoire. D'un autre côté, chez *Paramecium* sp., nous remarquons une augmentation de l'activité catalase et de la teneur en protéines suivies d'une diminution progressive, tandis que la superoxyde dismutase augmente. L'activité du glutathion S-transférase et le taux de glutathion réduit diminuent de manière dose-dépendante.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'ensemble des paramètres étudiés — catalase, superoxyde dismutase, glutathion S-transférase, glutathion réduit et protéines totales — présentent une évolution comparable. On observe d'abord une stimulation significative de ces activités, traduisant une réponse adaptative initiale au stress oxydatif, suivie d'une diminution progressive liée à l'épuisement des mécanismes de défense cellulaire. Ces variations sont d'autant plus marquées sous l'effet du glyphosate, qui induit une perturbation oxydative plus importante que les composés AP1 et AP2.

L'étude de docking moléculaire a mis en lumière les interactions entre ces composés et des protéines cibles clés, telles que l'enzyme EPSP synthase, la SOD et le cytochrome P450. Les résultats ont révélé qu'AP2 présentait une affinité de liaison plus élevée pour l'EPSP synthase que le glyphosate, suggérant son potentiel effet herbicide alternatif. L'analyse des interactions avec la SOD et le CYP450 a également permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur toxicité.

Néanmoins, sur le plan toxique global, AP1 et AP2 se sont révélés moins toxiques que le glyphosate, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement de composés ayant un impact environnemental réduit.

Mots-clés : *Paramecium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, stress oxydant, cytotoxicité, amidophosphonates, docking moléculaire.

## Abstract

The chemical class of amidophosphonates, which belongs to organophosphates, is recognized for its diverse biological activities. However, their widespread use raises concerns about their potential toxicity and environmental impact. In this study, we assessed the cytotoxicity of two newly synthesized amidophosphonates (AP1 and AP2) and glyphosate, a reference pesticide widely used in agriculture, using alternative biological models: *Paramecium sp.* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Our results show that all three compounds inhibited cellular growth and disrupted respiratory metabolism. In *Paramecium sp.*, catalase activity and protein content increased initially and then progressively decreased, while superoxide dismutase activity remained elevated. The activity of glutathione S-transferase and the levels of reduced glutathione decreased in a dose-dependent manner.

In *Saccharomyces cerevisiae*, catalase activity, glutathione S-transferase, protein content, and reduced glutathione levels initially increased, followed by a gradual decline, while superoxide dismutase showed a similar trend with a marked induction followed by a late decrease. These alterations were particularly pronounced under the effect of glyphosate.

Molecular docking studies highlighted interactions between these compounds and key target proteins, such as EPSP synthase, SOD, and cytochrome P450. The results revealed that AP2 exhibited a higher binding affinity to EPSP synthase than glyphosate, suggesting its potential as an alternative herbicidal agent. Furthermore, the analysis of interactions with SOD and CYP450 provided a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying their toxicity.

Overall, both AP1 and AP2 appeared less toxic than glyphosate, highlighting their potential as alternative compounds with reduced environmental impact.

**Keywords:** *Paramecium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, oxidative stress, cytotoxicity, amidophosphonates, molecular docking.

## ملخص

تنتمي فئة الأמידوفوسفونات الكيميائية إلى المركبات الفوسفورية العضوية، وهي معروفة بأنشطتها البيولوجية المتنوعة. ومع ذلك، فإن استخدامها الواسع يثير مخاوف بشأن سميتها المحتملة وتأثيرها على البيئة. في هذه الدراسة، قمنا بتقييم السمية الخلوية لمركبين جديدين من الأמידوفوسفونات (**AP1** و **AP2**) إضافة إلى الغليفوسات، وهو مبيد حشري تجاري، وذلك باستخدام نماذج بيولوجية بديلة: *Saccharomyces cerevisiae* و *Parameciu sp*. أظهرت نتائجنا أن الجزيئات الثلاثة تؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا واضطراب عملية التنفس الخلوي. كما لاحظنا زيادة أولية في نشاط **CAT, GST, SOD** ومستويات **GSH** خلال الفترات الأولى من التعرض، تليها انخفاض تدريجي بعد التعرض المطول. وقد كانت هذه الاضطرابات أكثر وضوحًا تحت تأثير الغليفوسات. سلطت دراسة الالتحام الجزيئي الضوء على التفاعلات بين هذه المركبات والبروتينات المستهدفة الرئيسية، مثل **EPSP synthase, SOD** و **cytochrome P450**. كشفت النتائج أن **AP2** يمتلك قدرة ارتباط أعلى بـ **EPSP synthase** مقارنة بالغليفوسات، مما يشير إلى إمكانية اعتباره عاملاً عشبيًا بديلًا. كما ساهم تحليل التفاعلات مع **SOD** و **CYP 450** في فهم أفضل للآليات الجزيئية الكامنة وراء سميتها. ومع ذلك، من الناحية السمية العامة، تبين أن **AP1** و **AP2** أقل سمية من الغليفوسات، مما يفتح آفاقًا واعدة لتطوير مركبات ذات تأثير بيئي أقل.

**الكلمات المفتاحية:** *Paramecium sp*، *Saccharomyces cerevisiae*، الإجهاد التأكسدي، السمية الخلوية،

الأמידوفوسفونات، الالتحام الجزيئي.

# SOMMAIRE

**Liste des acronymes**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des planches**

<b>Préambule</b>	1
<b>Partie 1 : Étude <i>in vitro</i></b>	3
<b>Chapitre I : Introduction</b>	3
1. Rappel sur les pesticides	3
1.1. Définition et classification	3
1.2. Toxicité des pesticides	4
1.2.1. Toxicité sur la santé humaine	4
1.2.2. Toxicité sur la faune et la flore	4
1.2.3. Contamination de l'environnement (Les différents compartiments)	5
1.3 Stratégies de gestion des pesticides	5
1.3.1 Gestion intégrée des nuisibles (IPM)	5
1.3.2 Règlementation et formation des agriculteurs	6
1.3.3 Alternatives aux pesticides chimiques	6
1.4. Les organophosphorés	7
1.5. Les phosphonates	8
1.6. Les amidophosphonates	9
1.7. Le glyphosate	10
1.7.1 Toxicité sur l'Homme	10
1.7.2. Toxicité sur l'environnement	11
2. Rappel sur le stress oxydatif	12
2.1. Le système de défense antioxydant	13
2.1.1. Stress oxydatif et radicaux libres	13
2.1.2. Les antioxydants	13
2.1.3. Antioxydants enzymatiques	13
2.1.4. Antioxydants non enzymatiques	14

2.1.5. Induction de la défense antioxydante	14
2.2. Impact sur la santé humaine	14
1.3. Les bioindicateurs	15
1.3.1. Définition et importance des bioindicateurs	15
1.3.2. Rôle des bioindicateurs dans la surveillance environnementale	15
1.4. La paramécie	16
1.4.1. Généralités et structure	16
1.4.2. Structure interne	16
1.4.3. Cycles de vie des paramécies	17
1.4.4. Utilisation des paramécies dans les études écotoxicologiques	18
1.5. La Levure ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	19
1.5.1. Généralités	19
1.5.2. Structure	19
1.5.3. Cycle de croissance et cycle cellulaire	20
1.5.4. Métabolisme levurin	20
1.5.6. Utilisation des levures dans les études en écotoxicologie	21
<b>Objectif de l'Étude</b>	22
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	24
1. Matériel et Méthodes	
1.1 Matériel biologique	24
1.2. Matériel chimique	24
1.2.1. Structures chimiques des composés étudiés	25
1.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	26
2. Méthodes	26
2.1. Synthèse des amidophosponates	26
2.2. Étude physiologique	27
2.2.1. Cas de <i>Paramecium sp.</i>	27
2.2.1.1. Culture de <i>Paramecium sp.</i>	27
2.2.1.2. Traitement des paramécies	27
2.2.1.3. Cinétique de croissance cellulaire	28
2.2.1.4. Pourcentage de réponse	28

2.2.1.5. Détermination du temps, nombre et vitesse de génération	28
2.2.2. Cas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.2.2. Milieu de culture et culture des levures	29
2.2.2.3. Choix des concentrations testées	30
2.2.2.4. Cinétique de croissance des levures	30
2.2.3. Étude polarographique	29
2.2.4. Détermination de la concentration inhibitrice (CI <sub>50</sub> )	30
2.2.5. Étude biochimique et enzymatique	30
2.2.5.1. Dosage des protéines totales	30
2.2.5.2. Dosage du glutathion (GSH)	31
2.2.5.3. Mesure de l'activité glutathion-s-transférase (GST)	32
2.2.5.4. Mesure de l'activité superoxyde dismutase (SOD)	32
2.2.5.5. Mesure de l'activité catalase (CAT)	33
2.2.6. Comportement et atteintes structurelles et membranaires chez la paramécie	34
2.2.6.1. Caractérisation des malformations	34
2.2.6.2. Suivi des trajectoires de déplacement	34
2.2.7. Analyses statistiques	34

### **Chapitre III : Résultats**

1. Comparaison des structures chimiques des composés étudiés	35
2. Étude physiologique et polarographique	36
2.1. Cas de <i>Paramecium sp.</i>	36
2.1.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la cinétique de croissance cellulaire	36
2.1.2. Pourcentages de réponse	38
2.1.3. Détermination du nombre, temps et vitesse de génération chez <i>Paramecium sp.</i>	39
2.1.4. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire	41
2.1.5. Détermination de la concentration inhibitrice CI <sub>50</sub>	42
2.2. Cas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.2.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la cinétique de croissance cellulaire	43
2.2.2. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire	45

2.2.3. Détermination de la concentration inhibitrice $CI_{50}$	46
3. Étude biochimique et enzymatique	47
3.1. Cas de <i>Paramecium sp.</i>	47
3.1.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales	47
3.1.2. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH	48
3.1.3. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)	50
3.1.4. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'activité de la super oxyde dismutase	51
3.1.5. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase	53
3.2. Cas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
3.2.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales	55
3.2.2. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH	57
3.2.3. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)	58
3.2.4. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité super oxyde dismutase	60
3.2.5. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase	62
4. Comportement et atteintes structurelles et membranaires	64
4.2. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur les trajectoires de déplacement	66
<b>Chapitre IV : Discussion et Conclusion</b>	68
<b>Partie 2 : Étude <i>in silico</i></b>	
<b>Chapitre I : Introduction</b>	
1. Généralités	72
2. Définition du docking	73
3. Techniques et applications du docking moléculaire	74
4. Impact environnemental et réglementaire	74
5. Les outils du docking moléculaire	75
5.1. Le récepteur	75

5.2. Le ligand	75
5.3. Les logiciels	76
5.4. Les interactions protéine-ligand	77
5.5. Le score	77
6. Méthodes complémentaires	78
7. Sélection et justification du choix de la protéine pour l'étude <i>In Silico</i>	78
7.1. Cytochrome P450 (CYP450)	78
7.2. Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP)	78
8.3. Superoxyde Dismutase (SOD)	79
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
1.1. Matériel chimique	81
1.1.1. Ligand étudiés	81
1.1.2. Protéines cible	82
1.2. Logiciels utilisés	83
2. Méthodes	84
2.1. Préparation des protéines	84
2.1.1. Téléchargement et visualisation	84
2.1.2. Traitement initial	84
2.1.3. Optimisation des liaisons hydrogène	85
2.1.4. Élimination des molécules d'eau	85
2.1.5. Conversion et sauvegarde	85
2.2. Préparation des ligands	85
3. Le docking	86
4. Analyse des Résultats de docking	87
5. Visualisation des interactions	87
6. Validation des résultats	87
<b>Chapitre III : Résultats</b>	
1. Caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées	88
2. Répartition des cibles biologiques pour les molécules glyphosate, AP1 et AP2 selon Swiss Target Prediction	88
2.1. Répartition des cibles biologiques pour le glyphosate	89
2.2. Répartition des cibles biologiques pour AP1	89

2.3. Répartition des cibles biologiques pour AP2	90
3. Interaction du glyphosate, AP1 et AP2 avec l'EPSP synthase, la SOD et le CYP450	91
3.1. Interactions du glyphosate, AP1 et AP2 avec l'EPSP Synthase	91
3.1.1. Complexe glyphosate – EPSP synthase	91
3.1.2. Complexe AP1 – EPSP synthase	92
3.1.3. Complexe AP2 – EPSP synthase	93
3.1.4. Scores d'interaction des molécules testées avec l'EPSP synthase	94
3.2. Interactions du glyphosate, AP1 et AP2 avec la superoxyde dismutase (SOD)	95
3.2.1. Complexe glyphosate – superoxyde dismutase (SOD)	95
3.2.2. Complexe AP1 – superoxyde dismutase (SOD)	96
3.2.3. Complexe AP2 – superoxyde dismutase (SOD)	97
3.2.4. Scores d'interaction du glyphosate, AP1 et AP2 avec la superoxyde dismutase (SOD)	98
3.3. Interactions du glyphosate, AP1 et AP2 avec le cytochrome P450 (CYP450)	99
3.3.1. Complexe glyphosate – cytochrome P450 (CYP450)	99
3.3.2. Complexe AP1 – cytochrome P450 (CYP450)	100
3.3.3. Complexe AP2 – cytochrome P450 (CYP450)	101
3.3.4. Scores d'interaction des molécules testées avec le cytochrome P450 (CYP450)	102
<b>Chapitre IV : Discussion et Conclusion</b>	<b>103</b>
<b>Conclusion générale et Perspectives</b>	<b>106</b>
<b>Référence bibliographique</b>	<b>109</b>

## Liste des Acronymes

**ADME** - Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

**ANOVA** - Analyse de la Variance

**AP1**- Amidophosphonate 1

**AP2** - Amidophosphonate 2

**ATP** - Adénosine Triphosphate

**CAT** – Catalase

**CYP** - Cytochrome P450

**CI<sub>50</sub>** - Concentration inhibitrice 50%

**DO** - Densité Optique

**DTNB** - Acide 5,5'-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoïque

**EDTA** - Acide Éthylène Diamine Tétraacétique

**EPSP** - 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase

**GSH** - Glutathion Réduit

**GST**- Glutathion S-Transférase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peroxyde d'Hydrogène

**log P** : Logarithme du coefficient de partage

**M±SEM Moyenne ± Erreur Standard de la Moyenne**

**NAD<sup>+</sup>** - Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NADH** - Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit

**OH** Radical Hydroxyle

**PDB** - Protein Data Bank

**pH** - Potentiel hydrogène

**PR** - Pourcentage de Réponse

**ROS** - Espèce Réactive de l'Oxygène

**SOD** - Superoxyde Dismutase

**TCA** - Acide Trichloracétique

**TNB** - Acide 5,5'-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoïque

**TPSA** - Taille de la Surface

**μM** – Micromolaire

## Liste des Tableaux

N°	Titre	Pages
1	Structures chimiques des composés testés	25
2	Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques du Glyphosate, AP1 et AP2	26
3	Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) des paramécies	39
4	Régressions linéaires et valeurs des CI <sub>50</sub> du glyphosate, d'AP1 et d'AP2 après 72h d'exposition	42
5	Régressions linéaires et valeurs des CI <sub>50</sub> du glyphosate, AP1 et AP2 après 2 h d'exposition	46
6	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution des taux de protéines totales chez <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	47
7	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD) chez <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	51
8	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution des taux de protéines totales chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps d'exposition	55
9	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD) chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps d'exposition	60
10	Caractéristiques des ligands étudiés	81
11	Caractéristiques des protéines cibles	82
12	Comparaison des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques du glyphosate, AP1 et AP2	88
13	Scores d'interaction des molécules testées avec l'EPSP synthase	95
14	Scores d'interaction des molécules testées avec la superoxyde dismutase (SOD)	99
15	Scores d'interaction des molécules testées avec le cytochrome P450 (CYP450)	102

## Liste des Figures

N°	Titre	Pages
Figure 1	Effets des organophosphorés (OP) sur la transmission synaptique	08
Figure 2	Schéma de l'anatomie de la Paramécie	17
Figure 3	Illustration du processus de conjugaison chez les Paramécies	18
Figure 4	Structure cellulaire de la levure ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	19
Figure 5	Représentation du cycle cellulaire de la levure	20
Figure 6	Processus de synthèse des amidophosphonates (AP1 et AP2)	27
Figure 7	Comparaison structurelle des aminophosphonates (AP1 et AP2) avec le glyphosate	36
Figure 8	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur la croissance cellulaire de <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	37
Figure 9	Évolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de glyphosate, AP1 et AP2	38
Figure 10	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire de <i>paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	41
Figure 11	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur la croissance cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps d'exposition.	43
Figure 12	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps d'exposition.	45

Figure 13	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	48
Figure 14	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	50
Figure 15	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase chez <i>Paramecium sp.</i> en fonction du temps d'exposition	53
Figure 16	Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps	57
Figure 17	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité de la Glutathion S transférase (GST) chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps d'exposition	59
Figure 18	Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase chez <i>Saccharomyces ceravece</i> en fonction du temps d'exposition	62
Figure 19	Schéma du protocole général de docking moléculaire	76
Figure 20	Répartition des cibles biologiques du Glyphosate	89
Figure 21	Répartition des cibles biologiques de la molécule AP1	90
Figure 22	Répartition des cibles biologiques de la molécule AP2	91
Figure 23	Interactions moléculaires entre le glyphosate et l'EPSP synthase	92
Figure 24	Interactions moléculaires entre AP1 et l'EPSP synthase	93
Figure 25	Interactions moléculaires entre AP2 et l'EPSP synthase	94

Figure 26	Interactions moléculaires entre le glyphosate et la super oxyde dismutase	96
Figure 27	Interactions moléculaires entre AP1 et la super oxyde dismutase	97
Figure 28	Interactions moléculaires entre AP2 et la super oxyde dismutase	98
Figure 29	Interactions moléculaires entre le glyphosate et le CYP450	100
Figure 30	Interactions moléculaires entre AP1 et le CYP450	101
Figure 31	Interactions moléculaires entre AP2 et le CYP450	102

## Liste des planches

N°	Titre	Pages
1	Analyse comparative des altérations morphologiques de <i>Paramecium sp.</i> en réponse aux traitements par le glyphosate, AP1 et AP2.	64
2	Effets du glyphosate, AP1 et AP2 à différentes concentrations sur la trajectoire de mouvement de <i>Paramecium sp.</i>	66

# *Préambule*

## Préambule

Les amidophosphonates sont des composés largement utilisés à travers le monde en raison de leur vaste champ d'application. Ils sont présents aussi bien dans les herbicides, insecticides et fongicides que dans des composés plus spécialisés ayant un intérêt médical, tels que des inhibiteurs du VIH, des agents antitumoraux et des antibactériens (Jones Jr et Daly, 1993 ; Tajti et Keglevich, 2018).

Cependant, malgré leur utilité, ces composés présentent un potentiel toxique non négligeable. Par exemple, ils peuvent contaminer l'environnement aquatique par ruissellement, exposant ainsi une grande variété d'organismes marins à des risques importants (Miyoshi et al., 2003). Il a été rapporté que les amidophosphonates peuvent induire des effets toxiques, tels qu'une hémolyse des érythrocytes (Trela et al., 2001), une cytotoxicité, ainsi qu'une génotoxicité (Kraitcheva et al., 2010).

Face à ces risques, il devient essentiel de renforcer la surveillance toxicologique des milieux aquatiques contaminés par ces substances, en utilisant des organismes non ciblés comme modèles alternatifs. Ces modèles représentent un outil précieux pour protéger l'intégrité environnementale (Zhang et al., 2015). En plus de permettre une meilleure compréhension des impacts environnementaux, les modèles alternatifs présentent plusieurs avantages supplémentaires.

Tout d'abord, ils permettent de mieux prendre en compte la variabilité interindividuelle, contrairement aux tests sur animaux, limités par les différences génétiques ou physiologiques. Les modèles *in vitro* et *in silico* peuvent être adaptés pour représenter diverses populations humaines ou espèces cibles. Par exemple, l'étude de Browne et al. (2015) a utilisé des modèles informatiques pour évaluer l'activité des récepteurs aux œstrogènes en présence de différents produits chimiques, tandis que celle de Boone et al. (2007) a examiné les effets combinés de la contamination chimique et de la présence de prédateurs sur les communautés d'amphibiens.

De plus, ces modèles permettent une évaluation plus rapide de la toxicité des substances chimiques. Là où les tests sur animaux peuvent durer des mois, voire des années, les modèles *in vitro* et *in silico* produisent des résultats en quelques jours, voire en quelques heures. Cette rapidité est cruciale pour l'évaluation de nouveaux produits chimiques ou dans des situations d'urgence environnementale. Par exemple, Judson et al. (2010) ont démontré l'efficacité des méthodes de criblage à haut débit pour évaluer

## Préambule

rapidement la toxicité des micropolluants. De plus, Arora et al. (2011) ont mis en évidence l'importance des approches *in vitro* en nanotoxicologie, soulignant que ces modèles constituent une alternative essentielle aux tests sur animaux pour évaluer les effets potentiels des nanomatériaux sur la santé et l'environnement.

Parmi ces approches, l'étude des interactions moléculaires avec des cibles enzymatiques spécifiques constitue une étape essentielle pour comprendre les mécanismes de toxicité des composés chimiques (Rovida & Hartung, 2009; Krewski et al., 2019). En plus de l'enzyme EPSP synthase, des protéines telles que la superoxyde dismutase (SOD), impliquée dans la gestion du stress oxydatif, et le cytochrome P450 (CYP), clé dans le métabolisme des substances étrangères, sont des cibles de choix dans les études *in silico*. Ces protéines permettent d'évaluer non seulement les effets toxiques directs des composés, mais aussi leurs répercussions sur les mécanismes cellulaires fondamentaux, tels que l'oxydation et la biotransformation des xénobiotiques.

Ces modèles offrent également un avantage économique significatif. Les tests sur animaux peuvent être coûteux en termes de main-d'œuvre, d'installations et de ressources. En revanche, les modèles *in vitro* et *in silico* sont plus faciles à automatiser et à réaliser à grande échelle, réduisant ainsi les coûts et optimisant les ressources financières. Des études, comme celle de Maertens & Hartung (2018), ont souligné l'importance de ces économies dans l'adoption de modèles alternatifs pour l'évaluation de la toxicité des micropolluants.

Sur le plan éthique, ces modèles constituent une avancée majeure. Les tests sur animaux soulèvent des préoccupations éthiques importantes concernant leur bien-être. Les modèles *in vitro* et *in silico* permettent non seulement de réduire l'utilisation des animaux dans les expérimentations, mais offrent également des données pertinentes pour évaluer les risques environnementaux et sanitaires.

**Partie 1 :**  
**Étude *in VITRO***

## 1. Rappel sur les pesticides

### 1.1. Définition et classification

Les pesticides sont des substances conçues pour éliminer, repousser ou contrôler divers nuisibles, notamment les insectes, les rongeurs, les mauvaises herbes, les champignons, les bactéries et les virus, qui peuvent nuire à la santé publique, aux produits agricoles ou à d'autres biens. Comprendre la classification des pesticides est essentiel pour leur utilisation sécuritaire et efficace dans l'agriculture et la santé publique. Les pesticides sont généralement classés selon leur mécanisme d'action, leur composition chimique et l'organisme cible. Les principales catégories incluent :

- **Insecticides** : Destinés à lutter contre les insectes, ces produits peuvent agir sur un large éventail d'espèces ou cibler spécifiquement certaines d'entre elles (Dejoux, 2003).
- **Herbicides** : Utilisés pour contrôler les plantes indésirables, ces produits peuvent être non sélectifs, affectant une grande variété de végétaux, ou sélectifs, agissant sur des espèces choisies.
- **Fongicides** : Ces substances préviennent ou éliminent les infections fongiques dans les cultures et les plantes, contribuant ainsi à la santé des récoltes (El-Baky & Amara, 2021).
- **Rodenticides** : Conçus pour exterminer les rongeurs comme les souris et les rats, ces produits sont disponibles sous différentes formes, y compris des granulés et des appâts (D'Silva & Krishna, 2019).
- **Bactéricides et virucides** : Ces agents visent à combattre les infections causées par des bactéries et des virus chez l'homme, les animaux et les plantes, jouant un rôle essentiel dans la gestion des maladies (Beceiro, Tomás, & Bou, 2013).
- **Nématocides** : Utilisés pour lutter contre les nématodes, ces parasites microscopiques peuvent gravement endommager les racines des plantes et réduire les rendements des cultures (Gamalero & Glick, 2020).
- **Molluscicides** : Ces produits ciblent les mollusques, tels que les limaces et les escargots, protégeant ainsi les cultures et les plantes des dégâts causés par ces nuisibles (Boyd, & Brown 2015).

Il est essentiel de connaître les propriétés et la classification des pesticides pour garantir leur utilisation sûre et efficace. Une gestion appropriée de ces substances est essentielle pour réduire leur impact sur l'environnement, préserver la biodiversité et protéger la santé humaine (Tudi et al., 2021).

## **1.2. Toxicité des pesticides**

Les pesticides, bien qu'indispensables dans la lutte contre les nuisibles en agriculture, soulèvent des préoccupations croissantes en matière de toxicité et d'impact environnemental. La toxicité des pesticides peut être définie comme leur capacité à causer des effets néfastes sur les organismes vivants, y compris les humains, les animaux et les plantes. Les effets de ces substances peuvent varier considérablement selon leur type, leur dosage, et la durée d'exposition.

### **1.2.1. Toxicité sur la santé humaine**

L'exposition aux pesticides est associée à divers problèmes de santé, y compris des effets aigus tels que des irritations cutanées et des troubles respiratoires, ainsi que des effets chroniques potentiellement graves, tels que des maladies neurologiques, des cancers et des troubles hormonaux. Par exemple, des études ont établi un lien entre l'exposition à des pesticides comme le glyphosate et des risques accrus de lymphome non hodgkinien chez les agriculteurs (McDuffie et al., 2001). De plus, des recherches récentes ont montré que l'exposition à des organophosphorés, peut affecter le développement neurologique des enfants, entraînant des déficits cognitifs à long terme (Bouchard et al., 2010).

### **1.2.2. Toxicité sur la faune et la flore**

Les pesticides ne nuisent pas seulement aux humains, mais également à la faune et à la flore. Les insecticides, par exemple, peuvent avoir un impact dévastateur sur les pollinisateurs, tels que les abeilles. Une diminution des populations d'abeilles a été observée dans des zones agricoles où des néonicotinoïdes sont largement utilisés (Goulson, 2013; Wood & Goulson, 2017). De plus, les herbicides peuvent réduire la biodiversité végétale en éliminant les espèces non ciblées, perturbant ainsi les écosystèmes locaux et les chaînes alimentaires.

### 1.2.3. Contamination de l'environnement (Les différents compartiments)

Les pesticides peuvent contaminer les sols et les sources d'eau, entraînant une dégradation de la qualité de l'environnement. La lixiviation de résidus de pesticides dans les nappes phréatiques est une préoccupation majeure, car ces substances peuvent persister dans l'environnement pendant des années. Une étude a révélé que des concentrations de pesticides sont présentes dans 50 % des échantillons de l'eau souterraine testés aux États-Unis (Gilliom et al., 2006). La contamination des cours d'eau peut également avoir des effets catastrophiques sur les espèces aquatiques, comme les poissons, entraînant des perturbations de la reproduction et des mortalités massives.

### 1.3. Stratégies de gestion des pesticides

Pour minimiser les effets néfastes des pesticides sur la santé humaine et l'environnement, plusieurs stratégies de gestion sont proposées, alliant des approches techniques, réglementaires, et éducatives. Parmi celles-ci, l'agriculture intégrée, qui combine des méthodes biologiques, chimiques et culturales, représente une solution efficace pour réduire la dépendance aux pesticides chimiques tout en maintenant le contrôle des nuisibles de manière durable (Gurr et al, 2017). Cette méthode repose sur la synergie entre des techniques de lutte biologique, l'utilisation de cultures résistantes, et une application ciblée des produits phytosanitaires.

#### 1.3.1. Gestion intégrée des nuisibles (IPM)

La gestion intégrée des nuisibles (*Integrated Pest Management*, IPM) est l'une des stratégies les plus reconnues à l'échelle mondiale. Elle combine des approches basées sur la prévention, la surveillance et l'intervention raisonnée. Une étude de Pimentel et al. (2005) a montré que l'IPM permet de réduire jusqu'à 50 % l'utilisation des pesticides, tout en maintenant des rendements agricoles compétitifs. De plus, une méta-analyse réalisée par Pretty et Bharucha (2015) a révélé que la mise en œuvre de l'IPM dans plus de 85 pays a significativement amélioré la productivité agricole, réduit les intrants chimiques, et amélioré la biodiversité dans les agroécosystèmes.

L'IPM s'appuie également sur des outils innovants, comme l'utilisation de pièges à phéromones pour la surveillance des populations de nuisibles ou la mise en place de cultures associées pour perturber leur cycle de vie (Barzman et al., 2015). Ces stratégies

contribuent à minimiser les risques pour la santé humaine et à réduire les impacts environnementaux.

### 1.3.2 Règlementation et formation des agriculteurs

Une réglementation stricte, combinée à des programmes de formation destinés aux agriculteurs, est essentielle dans la gestion des pesticides. Par exemple, des initiatives législatives visent à promouvoir une utilisation durable des produits phytosanitaires, en encourageant l'adoption de pratiques agricoles respectueuses de l'environnement, limitant les substances actives les plus dangereuses, et favorisant l'utilisation de produits biologiques.

Les programmes de formation et de sensibilisation contribuent à réduire les erreurs d'application, telles que les surdosages ou l'utilisation de produits non autorisés. Une étude de Damalas et Koutroubas (2016) a démontré que les agriculteurs ayant reçu une formation sur les bonnes pratiques de gestion des pesticides réussissent à réduire leur exposition personnelle aux produits toxiques, ce qui diminue ainsi les risques pour leur propre santé ainsi que pour celle des consommateurs.

### 1.3.3 Alternatives aux pesticides chimiques

Des alternatives aux pesticides conventionnels, telles que les biopesticides, les huiles essentielles et les extraits de plantes, sont également en développement. Ces solutions présentent l'avantage d'être biodégradables et de générer moins de résidus nocifs dans l'environnement. Par exemple, l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* (Bt), un bioinsecticide largement utilisé, a permis de réduire la consommation de pesticides chimiques dans la culture du maïs et du coton, tout en limitant les impacts sur les insectes non ciblés (Sanahuja et al., 2011).

Par ailleurs, des recherches récentes se concentrent sur l'application de la technologie CRISPR pour développer des cultures résistantes aux ravageurs et sur la stimulation des mécanismes de défense naturelle des plantes via des éliciteurs chimiques ou biologiques (Le Mire et al., 2016, Wang et al., 2017). Ces approches pourraient réduire considérablement la dépendance aux pesticides tout en améliorant la résilience des systèmes agricoles face aux défis environnementaux.

#### 1.4. Les organophosphorés

Les organophosphates constituent une classe de produits chimiques largement utilisés comme herbicides et insecticides. Ces composés présentent des risques significatifs pour la santé humaine et animale, en particulier par leur impact sur le système nerveux. Une approche prometteuse pour atténuer leur toxicité consiste à recourir à des enzymes détoxifiantes, capables de décomposer et de neutraliser ces substances, réduisant ainsi leur impact nocif (Derkaoui et al., 2011).

Chez l'homme, l'exposition aux organophosphates est également liée à des effets néfastes sur les fonctions cognitives (Figure1), notamment chez les enfants, avec des associations observées entre cette exposition et des troubles de l'apprentissage, de la mémoire, et des déficits cognitifs (Russell et al., 2011) (figure 1). Ces substances peuvent induire l'apoptose neuronale, entraînant des modifications structurelles dans le cerveau en développement. Les mitochondries, sources d'énergie cellulaire, sont souvent affectées, provoquant des dommages oxydatifs pouvant contribuer à diverses maladies neurodégénératives et infectieuses (Louat, 2013).

Les enzymes hydrolytiques jouent un rôle clé dans la biodégradation des organophosphates et autres substances toxiques. Elles catalysent des réactions telles que l'hydrolyse et l'alkoolyse, permettant la décomposition efficace des organophosphates en composés moins nocifs (Thakur et al., 2019).

La production de ces activités enzymatiques reflète le taux de décomposition de la matière organique, contribuant ainsi à la stabilité environnementale. En poursuivant les recherches sur les enzymes détoxifiantes pour les organophosphates, il devient évident qu'elles offrent des solutions prometteuses pour atténuer les effets néfastes de ces produits chimiques. Leur résistance et efficacité constituent des outils précieux pour l'assainissement environnemental et la protection de la santé publique. Ore et al., (2023), propose le remplacement des organophosphoré par des solution enzymatique.

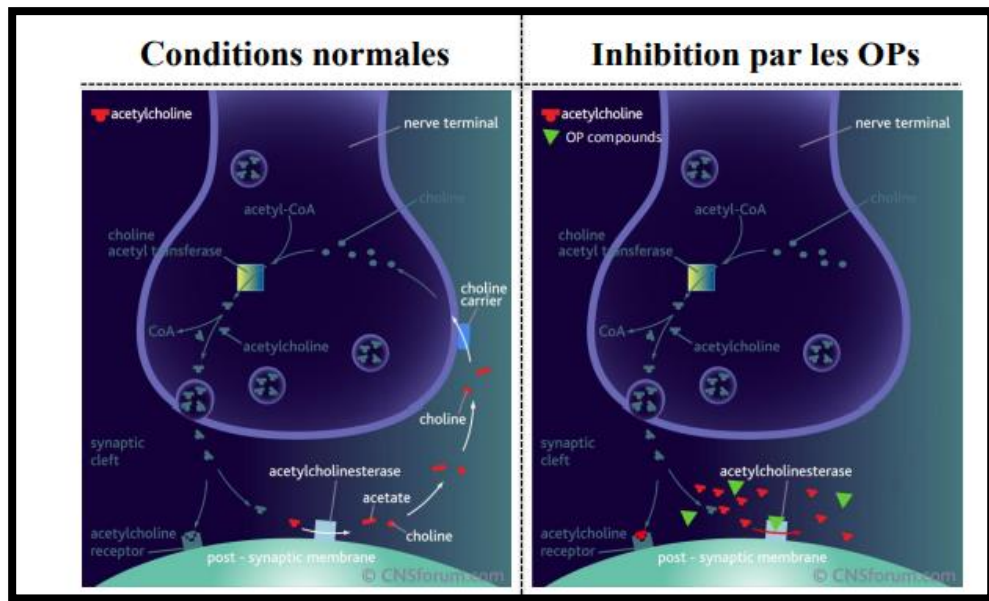


Figure 1 : Effets des organophosphorés (OP) sur la transmission synaptique.  
(CNSforum.com).

### 1.5. Les phosphonates

Les phosphonates, dérivés de l'acide phosphonique et caractérisés par le groupe fonctionnel phosphonate ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ), englobent une gamme variée de composés chimiques ayant une importance industrielle et commerciale significative. Ces composés trouvent des applications dans divers secteurs en raison de leurs propriétés et fonctionnalités uniques. Dans le domaine des retardateurs de flamme, les phosphonates sont des composants clés des formulations plastiques, améliorant la résistance au feu des matériaux utilisés dans les secteurs de la construction, de l'électronique et de l'automobile. Leur capacité à inhiber la combustion et à réduire la propagation des flammes les rend indispensables pour garantir les normes de sécurité dans les processus de fabrication modernes (Sevrain et al., 2017).

De plus, les phosphonates sont largement utilisés comme agents chélateurs dans les systèmes de traitement de l'eau. En séquestrant les ions métalliques et en empêchant leur précipitation, ils atténuent efficacement la corrosion et la formation de tartre dans les canalisations et les équipements industriels. Cela prolonge non seulement la durée de vie des infrastructures, mais préserve également la qualité de l'eau, essentielle pour les processus industriels et la consommation publique (Knepper, 2003).

Au-delà des applications industrielles, les phosphonates sont utilisés comme herbicides et fongicides dans l'agriculture, offrant des solutions efficaces pour la lutte contre les parasites tout en minimisant l'impact environnemental par rapport aux pesticides chimiques traditionnels. De plus, ils présentent des propriétés médicinales et trouvent une utilité dans des contextes médicaux spécifiques, comme le traitement de maladies telles que l'ostéoporose (Manghi et al., 2021). Cependant, l'utilisation généralisée des phosphonates nécessite une surveillance réglementaire stricte afin d'atténuer les effets négatifs potentiels sur l'environnement et la santé humaine. Une bonne gestion de leur production, de leur distribution et de leur élimination est essentielle pour prévenir la contamination des écosystèmes et garantir une manipulation sûre dans les environnements industriels et commerciaux (Rott et al., 2018).

Ce sont des composés chimiques polyvalents ayant des applications diverses dans de nombreux secteurs. Leurs propriétés uniques les rendent indispensables dans des domaines allant de l'amélioration de la sécurité incendie et du traitement de l'eau aux pratiques agricoles et aux applications médicales. Toutefois, leur utilisation doit s'accompagner de mesures réglementaires solides afin de préserver l'intégrité de l'Homme et de son environnement. (Briffa et al, 2020).

### 1.6. Les amidophosphonates

Une classe de composés chimiques connus sous le nom d'amidophosphonates combine dans leur structure moléculaire les fonctions d'un phosphonate ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ) et d'une amine ( $-\text{NH}_2$  ou dérivés). Ces substances sont largement utilisées dans de nombreux domaines, tels que la chimie de coordination, la chimie des matériaux, l'agriculture et la chimie pharmaceutique (Kafarski et Zoń 2000).

Les amidophosphonates ont suscité un intérêt particulier dans la communauté médicale en raison de leurs éventuelles qualités pharmacologiques. Certains amidophosphonates ont la capacité d'inhiber des enzymes spécifiques, ce qui les rend bénéfiques pour le traitement de maladies telles que l'ostéoporose. D'autres peuvent avoir des propriétés antifongiques, antivirales ou antibactériennes. Les amidophosphonates sont également utilisés comme agents chélateurs dans les engrais agricoles pour améliorer la disponibilité des nutriments pour les plantes et gérer les dépôts de métaux lourds dans le sol (Kaboudin et al. 2022).

### 1.7. Le glyphosate

Le glyphosate est un herbicide non sélectif largement utilisé pour le contrôle des plantes indésirables. Son mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme clé de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques essentiels à la croissance et au développement des plantes (Duke & Powles, 2008). Introduit sur le marché dans les années 1970, il est aujourd'hui utilisé dans différents contextes, allant de l'agriculture à l'entretien des espaces verts publics, comme les parcs, les zones récréatives et les jardins urbains (Benbrook, 2016 ; Myers et al., 2016).

En agriculture, le glyphosate permet de limiter la propagation de diverses mauvaises herbes grâce à son action non sélective, ce qui le rend adapté à des cultures variées. Son application contribue à simplifier la gestion des parcelles, notamment en réduisant le besoin de travail manuel ou de labour intensif. Dans les environnements urbains et paysagers, il est employé pour contrôler la végétation indésirable dans les espaces publics, afin de maintenir des zones accessibles et fonctionnelles sans intervention constante. L'usage répandu du glyphosate dans différents secteurs a conduit à une exposition environnementale et à des discussions sur ses effets potentiels sur la santé et les écosystèmes, justifiant des études de toxicité et des mesures de régulation (Azzouz et al., 2011).

#### 1.7.1. Toxicité sur l'Homme

Malgré son succès et son utilisation étendue, le glyphosate a suscité de vives inquiétudes concernant ses effets toxiques sur la santé humaine et environnementale. Des études épidémiologiques et toxicologiques ont mis en évidence des corrélations entre l'exposition au glyphosate et divers effets néfastes sur la santé. L'exposition chronique au glyphosate peut induire un stress oxydatif important, favorisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui endommagent les cellules en altérant l'ADN et les protéines (Mesnage & Antoniou, 2017). Ces dommages peuvent entraîner un vieillissement cellulaire prématuré et contribuer à l'émergence des maladies chroniques.

L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé le glyphosate comme « probablement cancérigène pour l'homme » en 2015, citant des

preuves liées au lymphome non hodgkinien (IARC, 2015). De plus, certaines études ont associé l'exposition au glyphosate à des troubles endocriniens et à des effets néfastes sur la reproduction, notamment des anomalies dans le développement fœtal (van Bruggen et al., 2018). Des rapports montrent également des perturbations neurologiques, avec un potentiel accru de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Eriguchi et al., 20).

### 1.7.2. Toxicité sur l'environnement

Sur le plan environnemental, l'utilisation intensive du glyphosate a montré des effets perturbateurs sur les écosystèmes aquatiques et terrestres. Lorsqu'il est appliqué de manière excessive, le glyphosate peut persister dans les sols et se retrouver dans les eaux de ruissellement, impactant la biodiversité aquatique et contaminant les sources d'eau (Séralini et al., 2014). Des recherches ont mis en évidence que des organismes aquatiques tels que *Paramecium sp.* montrent une réduction de la croissance et des modifications comportementales sous l'effet de l'exposition au glyphosate, telles que la diminution de la vitesse de déplacement et la perturbation de l'activité métabolique (Rouabhi et al., 2006).

L'impact du glyphosate s'étend également aux microorganismes du sol, perturbant l'équilibre microbien et compromettant la fertilité à long terme. Cette perturbation de l'écosystème peut avoir des conséquences sur la santé des plantes et leur croissance. Dans les environnements agricoles, une dépendance accrue au glyphosate a conduit à l'émergence de mauvaises herbes résistantes, nécessitant l'utilisation d'herbicides encore plus puissants et potentiellement toxiques (Benbrook, 2016).

## 2. Rappel sur le stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), aussi appelées radicaux libres, sont des composés hautement réactifs possédant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend instables et susceptibles de réagir de manière imprévisible avec d'autres molécules (Lobo et al., 2010). Ces ERO sont produites principalement lors de processus cellulaires, tels que la respiration cellulaire au niveau des mitochondries, où elles jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique. Un excès de production d'ERO par rapport à la capacité de l'organisme à les détoxifier ou à réparer les dommages qu'ils causent conduit à un déséquilibre appelé stress oxydatif. Normalement, les systèmes de défense antioxydants des organismes maintiennent cet équilibre et protègent les cellules contre les effets néfastes des radicaux libres.

Toutefois, lorsqu'un déséquilibre se produit, il peut entraîner des dommages cellulaires potentiellement graves. Ces dommages peuvent résulter d'un excès de radicaux libres ou d'une réduction de l'efficacité des défenses antioxydantes (Tiwari, 2001). Divers facteurs peuvent contribuer au stress oxydatif, notamment l'exposition à des agents oxydants externes tels que la fumée de cigarette, les produits chimiques toxiques, la pollution de l'air et les radiations ionisantes (Pizzino et al., 2017). En outre, le métabolisme naturel de l'organisme, qui comprend la production d'ERO lors de la respiration cellulaire, peut aussi participer à l'accumulation de ces radicaux.

Le stress oxydatif peut être amplifié par des situations de stress mental ou physique, qui favorisent la surproduction de radicaux libres. Les conséquences de ce phénomène sur la santé sont considérables, car les radicaux libres jouent un rôle dans le développement de diverses maladies et affections, telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et les inflammations chroniques (Rahal et al., 2014). Par exemple, des recherches ont révélé que le stress oxydatif peut induire des mutations de l'ADN, altérer la structure des protéines et compromettre l'intégrité des membranes cellulaires, contribuant ainsi à l'apparition et à la progression de ces maladies. De plus, des études ont mis en évidence le rôle des ERO dans le vieillissement prématuré et la dégénérescence cellulaire, soulignant l'importance de maintenir un équilibre antioxydant optimal pour préserver la santé globale.

L'organisme dispose de plusieurs systèmes antioxydants endogènes, ainsi que de nutriments antioxydants provenant de l'alimentation, tels que les vitamines C et E, le sélénium, le bêta-carotène et d'autres composés présents dans les fruits, les légumes et certains aliments d'origine végétale, pour lutter contre les effets du stress oxydatif. Ces antioxydants agissent en neutralisant les radicaux libres et en réduisant les dommages cellulaires induits par le stress oxydatif (Bouayed et Bohn, 2010).

## **2.1. Le système de défense antioxydant**

Le système de défense antioxydant constitue un réseau complexe de molécules chimiques et d'enzymes qui agissent de manière coordonnée pour neutraliser les radicaux libres et limiter le stress oxydatif, protégeant ainsi les cellules et les tissus contre les dommages. Ce mécanisme est fondamental pour maintenir l'équilibre cellulaire et la santé de l'organisme (Rahman, 2007).

**2.1.1. Stress oxydatif et radicaux libres :** Les radicaux libres sont des molécules extrêmement réactives dotées d'un seul électron. Le métabolisme cellulaire normal, l'exposition à des produits chimiques dans l'environnement, les rayons UV et d'autres stress peuvent tous les produire. Les radicaux libres peuvent s'accumuler dans l'organisme et créer un stress oxydatif, qui a été associé à un certain nombre de maladies, telles que le cancer, les maladies cardiaques, les troubles neurologiques et le vieillissement (Aranda-Rivera et al. 2022).

**2.1.2. Les antioxydants** sont des substances qui, en cédant des électrons sans devenir elles-mêmes instables, neutralisent les effets néfastes des radicaux libres. Ils peuvent provenir de l'alimentation ou de suppléments, ou être endogènes (fabriqués par l'organisme). Des enzymes comme la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD), ainsi que des substances non enzymatiques comme le glutathion, la vitamine E, la vitamine C et la coenzyme Q10 sont des exemples d'antioxydants endogènes courants (Vona et al. 2021).

### 2.1.3. Antioxydants enzymatiques :

Les antioxydants enzymatiques jouent un rôle clé dans la protection des cellules contre les radicaux libres. La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la conversion des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Le peroxyde d'hydrogène est ensuite décomposé en eau et en oxygène par la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La glutathion S-transférase (GST) participe également à la détoxification en conjuguant le glutathion réduit (GSH) aux composés électrophiles, facilitant leur élimination. Ensemble, ces enzymes contribuent à maintenir l'équilibre redox et à limiter les dommages oxydatifs cellulaires (Zheng et al., 2023).

### 2.1.4. Antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants non enzymatiques neutralisent les radicaux libres sans intervention enzymatique. La vitamine C (acide ascorbique) agit dans les compartiments aqueux, tandis que la vitamine E (tocophérol) protège les membranes lipidiques contre la peroxydation. Le glutathion réduit (GSH), tripeptide composé de glutamate, cystéine et glycine, est un antioxydant intracellulaire majeur, capable de recycler d'autres antioxydants et de participer à la détoxification des composés toxiques. Son rôle est étroitement lié à celui de la GST, formant un système complémentaire pour protéger la cellule contre le stress oxydatif (Gęgotek et Skrzydlewska, 2022).

**2.1.5. Induction de la défense antioxydante :** Le stress oxydatif peut déclencher le système de défense antioxydant de plusieurs façons. Par exemple, en s'attachant aux éléments de réponse aux antioxydants (ARE) dans les promoteurs des gènes antioxydants, le facteur de transcription Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) contrôle l'expression des gènes antioxydants. L'activation de la voie de signalisation Nrf2 entraîne une augmentation de la synthèse des antioxydants endogènes, ce qui renforce la résistance cellulaire aux dommages oxydatifs (Hammad et al. 2023).

**2.2. Impact sur la santé humaine :** De nombreuses maladies, dont le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les troubles neurologiques et les affections inflammatoires, sont au dysfonctionnement du système de défense antioxydant. Les dommages causés par le stress oxydatif peuvent être aggravés par des déficiences en enzymes antioxydantes ou par l'épuisement des réserves d'antioxydants, ce qui peut mettre en péril l'intégrité cellulaire.

### 3. Les bioindicateurs

#### 3.1. Définition et importance des bioindicateurs

Les bioindicateurs sont des organismes ou des systèmes biologiques utilisés pour évaluer la qualité des écosystèmes et la présence de polluants dans l'environnement (Hamza-Chaffai, 2014). Ils fournissent des informations sur les effets des agents chimiques sur les organismes vivants, permettant ainsi d'évaluer l'impact environnemental et de guider les mesures de protection de l'Homme et des écosystèmes.

#### 3.2. Rôle des bioindicateurs dans la surveillance environnementale

Les bioindicateurs permettent de détecter la présence de polluants et d'évaluer leur impact sur les écosystèmes. Des modèles biologiques aquatiques tels que *Paramecium* sp. et *Daphnia magna* sont fréquemment utilisés pour observer les effets toxiques des micropolluants et des pesticides. Leur sensibilité aux changements environnementaux rend leurs réactions utiles comme indicateurs de pollution et de stress oxydatif (Bouraïou, 2023 ; Wallace et al., 2016). L'analyse de paramètres biochimiques, tels que l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion S-transférase) et les niveaux de glutathion réduit (GSH), permet de quantifier l'effet des substances chimiques sur ces organismes et de suivre la perturbation de leur équilibre cellulaire.

## 4. La Paramécie

### 4.1. Généralités et structure

Les paramécies sont des micro-organismes fascinants appartenant à l'embranchement des ciliophores. Leur corps allongé et glissant, couvert de cils complexes, leur confère une apparence dynamique. Ces organismes unicellulaires, mesurant entre 50 et 300 micromètres, peuplent principalement les environnements d'eau douce à travers le monde. Leur manipulation aisée et leur cycle de division cellulaire rapide en font des modèles idéaux pour diverses investigations scientifiques, notamment en écotoxicologie.

Les paramécies possèdent une structure morphologique et comportementale remarquable. Leur membrane pelliculaire flexible fournit un soutien et permet des déplacements fluides. Les cils, qui recouvrent leur surface, agissent comme des moteurs propulseurs, facilitant leur locomotion et le transport des fluides pour la nutrition et la perception sensorielle. La rainure orale, bordée de cils, assure l'ingestion des particules alimentaires, démontrant l'ingéniosité de ces micro-organismes (Van Houten, 2023).

### 4.2. Structure interne

La paramécie est dotée d'organites essentiels pour ses fonctions cellulaires. Le macronucléus régule les activités métaboliques et l'expression des gènes, tandis que les micronoyaux sont impliqués dans la reproduction sexuelle et les échanges génétiques. D'autres organites comprennent des vacuoles contractiles pour l'osmorégulation, des vacuoles alimentaires pour la digestion et des trichocystes pour la défense contre les prédateurs (Van Houten, 2023), (Figure 2).

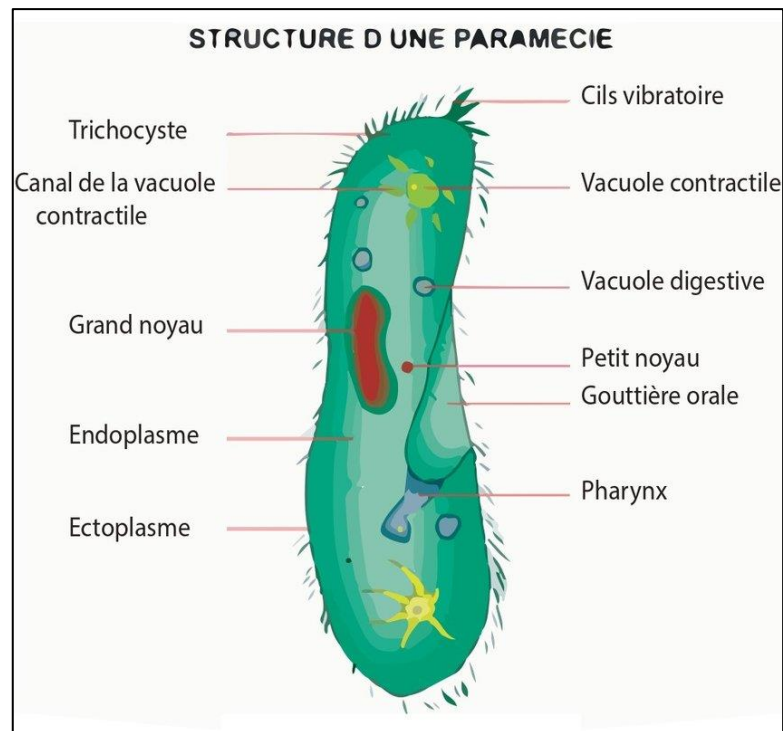


Figure 2 : Schéma de l'anatomie de la Paramecie. (Merabet, 2020).

#### 4.3. Cycles de vie des paramécies

Les paramécies présentent des cycles de vie complexes, comprenant des phases végétatives et sexuelles. (Figure3)

- **Cycle végétatif**

Le cycle végétatif débute par la croissance cellulaire. Une fois une taille suffisante atteinte, la cellule subit une fission binaire, une forme de reproduction asexuée, produisant deux cellules filles génétiquement identiques. Ce processus se répète, permettant une croissance exponentielle de la population dans des conditions favorables.

- **Processus sexuel**

Les paramécies peuvent également se reproduire sexuellement, surtout dans des conditions défavorables. Ce processus implique la conjugaison, où deux paramécies compatibles échangent temporairement du matériel génétique. Les micronoyaux subissent la méiose, produisant des gamètes haploïdes qui fusionnent pour former des zygotes, qui se transforment en kystes de repos (Patterson, 2008).

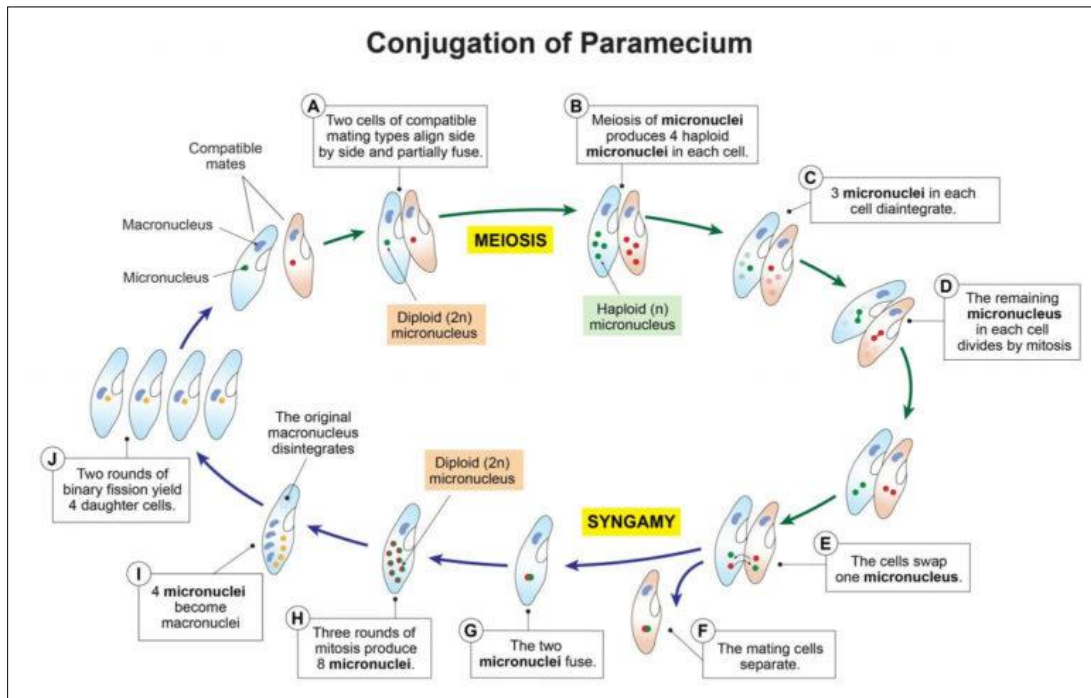


Figure 3 : Illustration du processus de conjugaison chez les Paramécies. (Source : UCLouvain, *Les Protistes*).

#### 4.4. Utilisation des paramécies dans les études écotoxicologiques

Les paramécies sont couramment utilisées comme bio-indicateurs dans les études écotoxicologiques, permettant d'explorer les impacts des contaminants sur les écosystèmes aquatiques. Leur sensibilité aux variations de la qualité de l'eau et leur réactivité aux polluants en font des sentinelles idéales du stress environnemental. Les paramécies sont utilisées dans des essais de toxicité pour évaluer les effets de produits chimiques, de métaux lourds et de polluants sur des paramètres comme la croissance, la reproduction et le comportement (Nalecz-Jawecki et al., 1993 ; Tushmalova et al., 2014). Leur comportement de nage, en particulier, offre données précieuses sur leurs réactions face aux stimuli environnementaux, ce qui peut influencer la compréhension des interactions entre les contaminants et les écosystèmes aquatiques (Impellitteri *et al.*, 2023). Des études, telles que celle de Bouraiou (2019), confirment leur utilité dans l'analyse des effets de substances toxiques complexes.

## 5. La Levure (*Saccharomyces cerevisiae*)

### 5.1. Généralités

*Saccharomyces cerevisiae* est une levure unicellulaire utilisée dans la vinification, la boulangerie et la brasserie depuis l'Antiquité. Son ADN nucléaire de 12068 kilobases est organisé en 16 chromosomes, et son génome a été entièrement séquencé, contenant environ 6000 gènes. Cette levure est principalement trouvée sur les fruits et les écorces d'arbres. En écotoxicologie, les levures sont de plus en plus utilisées en raison de leur faible coût et de leur facilité de culture (Parapouli et al., 2020).

### 5.2. Structure

La structure de *S. cerevisiae* comprend une paroi cellulaire distincte et une membrane plasmique. La paroi cellulaire, qui détermine la forme et l'intégrité de la cellule, est dynamique et joue un rôle crucial lors de la croissance et de la division cellulaire. Les levures, étant des eucaryotes unicellulaires, présentent des propriétés différentes de celles des bactéries, notamment leur résistance naturelle aux antibiotiques et autres agents antibactériens (Stewart, 2017). (Figure 4)

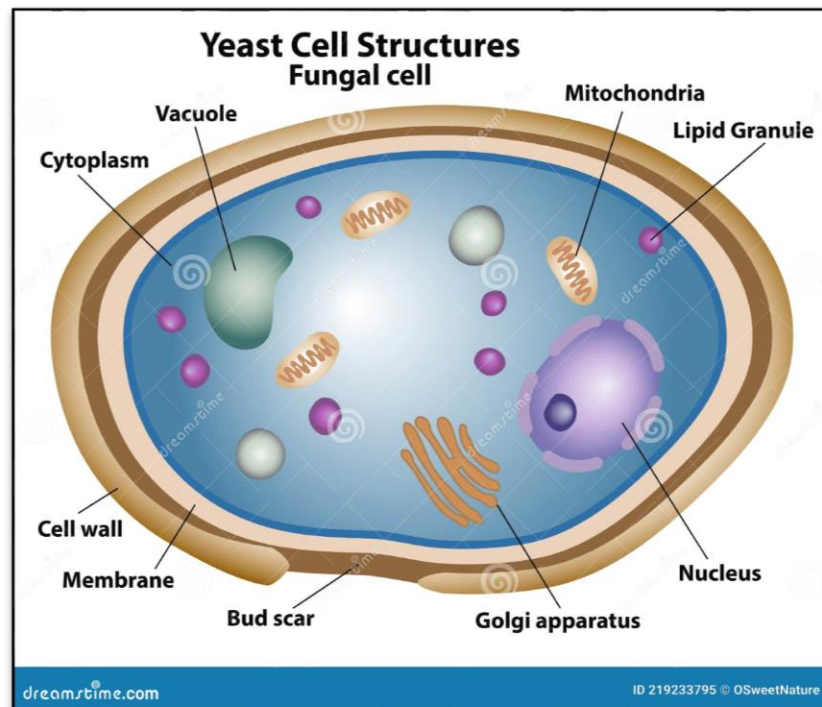


Figure 4 : Structure cellulaire de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). (Dreamstime, 2024).

### 5.3. Cycle de croissance et cycle cellulaire

Le cycle de croissance de *S. cerevisiae* est influencé par divers paramètres, tels que le pH et la teneur en oxygène dissous. Les cellules se reproduisent principalement par bourgeonnement, bien qu'elles puissent également se diviser par fission. Le cycle cellulaire est synchronisé par des mécanismes complexes régulant l'entrée dans la phase de division (Fujita et al., 1998 ; Iwahashi et al., 2000). (Figure 5).

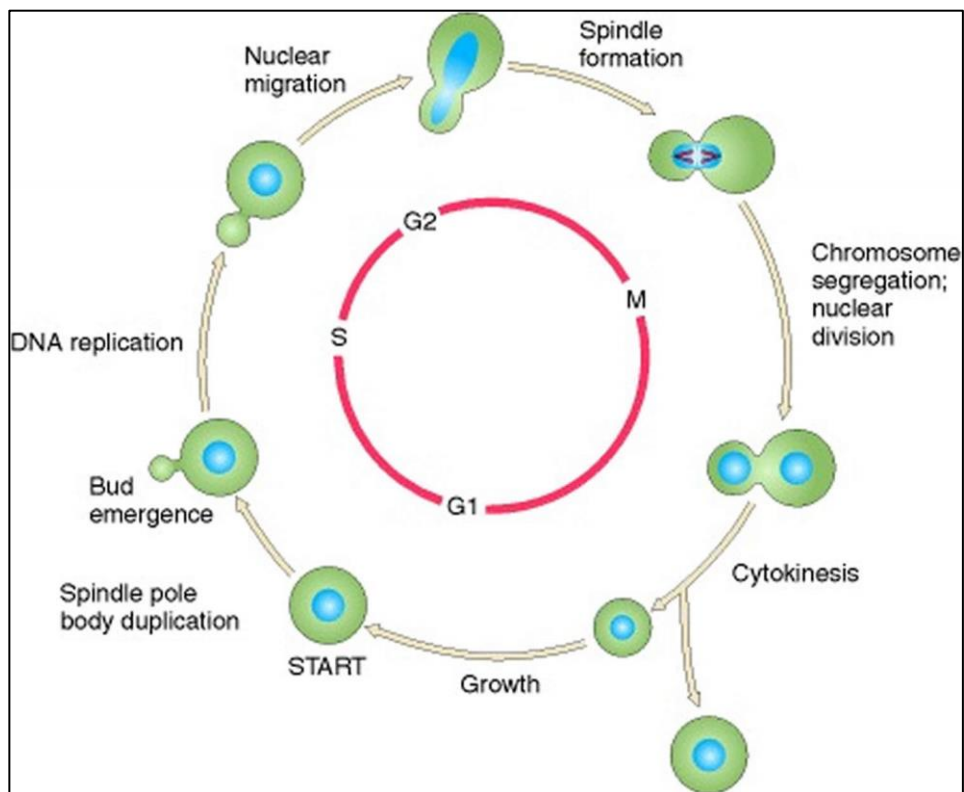


Figure 5 : Représentation du cycle cellulaire de la levure. (Boitard et al., 2015)

### 5.4. Métabolisme levurin

Le métabolisme levurin de *S. cerevisiae* convertit les sucres simples en éthanol, dioxyde de carbone et divers composés organiques. La glycolyse dégrade le glucose en pyruvate, produisant de l'ATP et du NADH. Le pyruvate est ensuite converti en acétaldéhyde, puis en éthanol, régénérant le NAD<sup>+</sup> nécessaire au maintien de la glycolyse. Ce métabolisme est caractérisé par une fermentation alcoolique anaérobie, bien que *S. cerevisiae* puisse également effectuer une respiration aérobie en présence d'oxygène (Otterstedt et al., 2004).

Outre l'éthanol, *S. cerevisiae* génère une variété de métabolites secondaires influençant la saveur et l'arôme des produits fermentés. Ce métabolisme présente une plasticité remarquable, permettant à la levure de s'adapter aux changements environnementaux et de répondre aux besoins de l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique.

### **5.5. Utilisation des levures dans les études en écotoxicologie**

Les levures, notamment *Saccharomyces cerevisiae*, sont largement reconnues comme des modèles biologiques pertinents en écotoxicologie pour évaluer les effets des substances toxiques sur les organismes eucaryotes. Leur structure cellulaire, proche de celle des cellules eucaryotes supérieures, en fait un outil précieux pour l'étude des mécanismes de toxicité à l'échelle cellulaire et subcellulaire (Cherait, 2015).

Les levures permettent l'analyse de divers biomarqueurs, tels que l'activité des enzymes antioxydantes (catalase, SOD, GST) et les niveaux de glutathion, qui reflètent les réponses au stress oxydatif induit par des contaminants environnementaux. De plus, la simplicité de leur culture et leur capacité à fournir des résultats rapides sur des paramètres physiologiques et biochimiques, tels que la croissance cellulaire et l'activité respiratoire, renforcent leur utilisation dans la détection de l'impact des xénobiotiques sur l'environnement.

## Objectif de l'Étude

L'objectif de ce travail est d'évaluer les effets biologiques de deux molécules nouvellement synthétisées, AP1 et AP2, appartenant à la famille des amidophosphonates, envisagées comme alternatives potentielles plus sûres au glyphosate. Cette étude vise à mieux comprendre leur impact sur des systèmes biologiques à l'aide de deux approches complémentaires : une étude *in vitro* sur des modèles biologiques alternatifs, *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp.*, et une étude *in silico* visant à modéliser les interactions moléculaires de ces composés avec plusieurs cibles enzymatiques clés.

### Partie 1 : Étude *In Vitro*

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude *in vitro*, à travers l'évaluation de la toxicité potentielle des trois composés (AP1, AP2 et glyphosate). Pour cela, nous nous sommes intéressés au suivi de la cinétique de croissance cellulaire, ainsi qu'à certains paramètres morfo-physiologiques, métaboliques et quelques biomarqueurs du stress oxydatif, tels que la catalase (CAT), le glutathion réduit (GSH), la glutathion-S-transférase (GST) et la superoxyde dismutase (SOD), afin de caractériser leurs effets toxiques. Ces investigations permettront de déterminer la toxicité relative de chaque composé et d'identifier les effets toxiques observés.

### Partie 2 : Étude *In Silico*

La deuxième partie de ce travail se concentre sur l'étude *in silico*, qui implique des approches de docking moléculaire. L'objectif ici est de modéliser les interactions entre les molécules AP1, AP2 et le glyphosate avec plusieurs cibles enzymatiques clés. Ces cibles incluent l'enzyme EPSP synthase, essentielle dans le métabolisme des plantes et des microorganismes, mais aussi des protéines impliquées dans des processus cellulaires critiques, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et le cytochrome P450 (CYP450). La SOD joue un rôle central dans la défense contre le stress oxydatif, tandis que le CYP450 est impliquée dans la biotransformation des xénobiotiques. En utilisant des logiciels de modélisation moléculaire, cette partie vise à prévoir les interactions possibles au niveau moléculaire et leur lien potentiel avec les effets toxiques *observés in vitro*.

## Objectif de l'Étude

Notre travail se propose d'apporter des contributions significatives à la compréhension des effets toxicologiques des molécules AP1, AP2, et du glyphosate. En combinant des approches expérimentales *in vitro* et des analyses *in silico*, l'étude cherche à établir un cadre solide pour l'évaluation des risques associés à ces substances et à enrichir les connaissances sur leurs effets toxiques, tout en explorant le potentiel des amidophosphonates comme alternatives plus sûres.

# **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

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

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1. Matériel biologique

Deux modèles biologiques ont été utilisés dans ce travail : *Paramecium sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.2. Matériel chimique

Dans cette étude, deux amidophosphonates, le diéthylphényl-uréido-méthyl-phosphonate (AP1) et le diéthyl-4-méthoxy-phényl-uréido-méthyl-phosphonate (AP2) sont utilisés comme composés de test. Ces molécules sont synthétisées sous forme de poudre au niveau du Laboratoire de Chimie Organique et Appliquée de l'Université Badji Mokhtar- Annaba (Algérie). En complément, le glyphosate est utilisé comme témoin positif.

## 1.2.1. Structures chimiques des composés étudiés

Les structures chimiques des composés étudiés sont présentées dans le tableau (1).

Tableau 1: Structures chimiques des composés testés

Composé	Nom chimique	Structure
AP1	Diéthylphényl-uréido-méthyl-phosphonate	
AP2	Diéthyl-4-méthoxy-phényl-uréido-méthyl-phosphonate	
Glyphosate	N-(Phosphonométhyl)glycine	

### 1.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le tableau (2) illustre les caractéristiques physico-chimiques des molécules utilisées (glyphosate, AP1 et AP2).

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques du glyphosate, AP1 et AP2

Propriété	Glyphosate	AP1	AP2
<b>Formule Chimique</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P
<b>Poids Moléculaire (g/mol)</b>	169.07	320.71	240.24
<b>LogP</b>	-2,05	0.84	0,77
<b>Fraction Csp<sup>3</sup></b>	0.67	0.42	0,36
<b>Numéro d'Atomes Lourds</b>	10	20	16
<b>Numéro d'Atomes Aromatiques</b>	0	6	6
<b>Taille de la TPSA (Å<sup>2</sup>)</b>	116,67	100.46	82.00

## 2. Méthodes

### 2.1. Synthèse des amidophosphonates

La synthèse des amidophosphonates (AP1 et AP2) est réalisée en utilisant l'urée, le triéthylphosphite et un aldéhyde, selon la réaction de Kabachnik-Fields, en suivant une stratégie de synthèse décrite par Bouzina et al. (2016). Les réactifs sont dissous dans une solution de 2 % d'acétone, puis dilués en aliquotes de 10 ml. La réaction se déroule sous agitation ultrasonique à 40 kHz, à température ambiante, pendant une durée de 30 minutes à 1 heure. Après réaction, les produits sont purifiés par recristallisation, et leur structure est caractérisée à l'aide de techniques telles que la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie infrarouge (IR). Le glyphosate est utilisé comme témoin positif dans les expériences pour évaluer l'efficacité des nouveaux composés synthétisés (Figure 6).

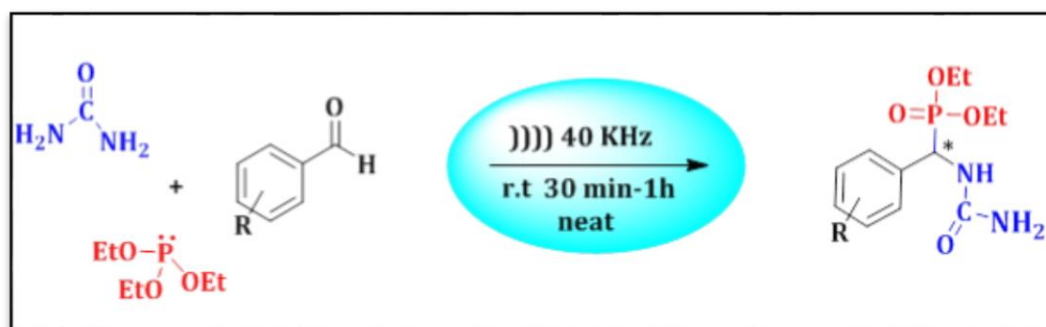


Figure 6 : Processus de synthèse des amidophosphonates (AP1 et AP2)

## 2.2. Étude Physiologique

### 2.2.1. Cas de *Paramecium sp.*

#### 2.2.1.1. Culture de *Paramecium sp.*

La culture des paramécies est conduite en suivant le protocole décrit par Azzouz et al. (2011). L'incubation se déroule dans une étuve de type Memmert 400, maintenue à un pH de 6,5 et à une température de  $27 \pm 2$  °C. Le repiquage est effectué tous les trois jours pour assurer une croissance exponentielle optimale et maintenir une culture de qualité.

#### 2.2.1.2. Traitement des paramécies

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 20 ml de culture de paramécie, chaque test étant répété trois fois pour garantir la fiabilité des résultats. Les cultures sont disposées dans des tubes à essai et incubées dans une étuve à une température contrôlée de 27 °C. Après plusieurs essais préliminaires, nous avons sélectionné les concentrations suivantes pour les molécules testées : 30 mM et 60 mM pour la molécule AP1, 40 mM et 60 mM pour la molécule AP2, et 0,66 mM pour le glyphosate.

Le choix de ces concentrations s'est basé en premier lieu sur les données de la littérature relatives aux gammes de toxicité couramment observées pour les composés organophosphorés et le glyphosate (Azzouz et al., 2011, 2023 ; Saïb et al., 2014), puis a été affiné à la suite d'essais préliminaires réalisés sur *Paramecium sp.* afin de déterminer les valeurs de concentration inhibitrice moyenne ( $CI_{50}$ ) pour chaque composé. Les doses retenues correspondent à des fractions sub-inhibitrices (proches de la  $CI_5$ ), permettant d'observer des altérations physiologiques mesurables sans induire une inhibition totale de la croissance. Ce choix assure une évaluation pertinente de la toxicité chronique et du

stress oxydatif induit, tout en préservant la viabilité des organismes modèles (Zhou et al., 2019 ; Martins et al., 2020).

Trois types de témoins sont mis en place dans cette étude :

- **Témoin négatif (culture non traitée)** : *Paramecium sp.* cultivée sans ajout de substances, servant de base de comparaison pour l'évaluation des effets biologiques.
  - **Témoin acétone** : paramécies exposées uniquement à l'acétone, solvant utilisé pour préparer les solutions des molécules testées, afin d'identifier un éventuel effet du solvant lui-même.
  - **Témoin positif (glyphosate)** : molécule de référence utilisée pour comparer les effets toxiques des composés AP1 et AP2 à ceux d'un xénobiotique bien documenté.
- 2.2.1.3. Cinétique de croissance cellulaire

#### 2.2.1.3. Suivi de la croissance cellulaire

Le suivi de la croissance des paramécies est effectué par le comptage journalier des paramécies dès la mise en contact avec le xénobiotique (T=0) jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour.

Ce comptage est réalisé par le dénombrement des paramécies à l'aide d'un compteur manuel sous microscope optique (Motic BA400) au grossissement x10 et ce après fixation au Lugol sur une lame en verre selon la méthode décrite par Sauvant et al. (1999). Le comptage est effectué au moins trois fois pour chaque répétition.

#### 2.2.1.4. Pourcentage de réponse

Il s'agit d'un calcul qui évalue la réponse de la paramécie vis-à-vis d'un xénobiotique, en se basant sur la formule suivante :

$$\% \text{ de réponse} = \left( \frac{Nc - Ne}{Nc} \right) \times 100$$

Soit :

- Nc : le nombre de cellules témoins.
- Ne : le nombre de cellules traitées.

Les valeurs positives du pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance, tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance. (Wong *et al.*, 1999).

### 2.2.1.5. Détermination du temps, nombre et vitesse de génération

Le principe de calcul retenu est celui détaillé par Dias *et al.* (2003). Le temps (g), le nombre (n) et la vitesse de génération (k) sont obtenus selon les équations ci-dessous :

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

$$k = n/t$$

$$g = 1/k$$

Où :

- **n** : Le nombre de génération,  $N_t$  est la population à temps  $t$ ,  $N_0$  est le nombre initial de cellules.
- **k** : Vitesse de la génération.
- **g** : Temps de génération (temps nécessaire pour qu'une population de cellule double en nombre).

### 2.2.2. Cas de *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.2.2.1. Lavage des levures

Un lavage est préconisé avant tout essai expérimental afin d'éliminer toute trace de substrat dans le milieu (Pol, 1997). Le protocole de lavage s'effectue comme suit :

- Préparer une suspension de levures dans du NaCl à 9 g/L et agiter au vortex.
- Centrifuger la suspension à 3000 tours/minute pendant 5 min et éliminer le surnageant.
- Recommencer l'opération deux à trois fois.

#### 2.2.2.2. Préparation du milieu et mise en culture des levures

Le milieu de culture utilisé est un milieu sélectif pour la respiration composé de 10g d'extrait de levure, 0,25 g de glucose, 25 ml de glycérol, QSP 1000 ml avec un tampon phosphate pH 6,2. Les levures sont mises en suspension dans le milieu de culture à raison de 1g/100ml sous agitation douce et oxygénation pendant 2 h à 27 °C.

### 2.2.2.3. Choix des concentrations testées

Le choix des concentrations appliquées pour les essais toxicologiques a été établi sur la base des travaux de Khebbeb 2015, en retenant des doses proches des valeurs de  $CL_{50}$  déterminées pour chaque composé. Ainsi, les levures ont été exposées à 150 mM et 180 mM pour les molécules AP1 et AP2, et à 0,87 mM pour le glyphosate.

### 2.2.2.4. Cinétique de croissance des levures

La cinétique de croissance est réalisée sur des levures témoins et traitées avec différentes concentrations de AP1, AP2 et glyphosate, en suivant la méthode de Pol (1997), qui repose sur la mesure de la densité optique (DO) en fonction du temps à une longueur d'onde de 620 nm. Chaque aliquote est ensuite observée au microscope photonique (Leica DL.1000) aux grossissements 40× et 100×.

### 2.2.3. Étude polarographique

L'activité respiratoire des paramécies et des levures est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène, également appelée électrode de Clark, selon la méthode de Djebbar et Djebbar (2000). L'oxygraphe Hansatech est équipé d'une cellule de réaction cylindrique à volume réglable (de 0,2 ml à 2,5 ml), immergée dans un bain-marie avec un système de circulation d'eau, offrant une bonne visibilité de l'échantillon et un contrôle précis de la température (ajustée à 25 °C). La cellule contient un agitateur magnétique assurant une homogénéité optimale du milieu réactionnel (Hansatech Instrument Ltd, 2002).

### 2.2.4. Détermination de la concentration inhibitrice ( $CI_{50}$ )

Afin de caractériser la toxicité des molécules, il est nécessaire de déterminer la concentration inhibitrice 50% ( $CI_{50}$ ), qui correspond à la concentration inhibant 50% de la croissance d'une population de paramécies dans des conditions standards (Bonnet, 2003). Les taux d'inhibition sont corrigés à l'aide de la formule d'Abbott (1925), permettant de calculer la toxicité réelle du xénobiotique. Les différents taux sont ensuite soumis à une transformation angulaire selon les tables établies par Bliss. Les valeurs normalisées obtenues sont converties en probits, ce qui permet de tracer une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées. À partir de cette courbe, la  $CI_{50}$  est déterminée en appliquant les procédés mathématiques de Finney (1971)

La formule d'Abbott est la suivante :

$$100 \times (X - Y) / X$$

- X : Nombre de vivants des témoins.
- Y : Nombre de vivants des traitées.

## 2.2.5. Étude biochimique et enzymatique

### 2.2.5.1. Dosage des protéines totales

Le dosage de protéines totales est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) : il s'agit d'une technique qui mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant (la solution de Bradford).

Cette fixation provoque un transfert de sa couleur qui passe du rouge au bleu ; ce changement de coloration est mesuré à une longueur d'onde de 595nm par un spectrophotomètre de type JENWAY 6300.

### 2.2.5.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du taux de glutathion est réalisé selon la méthode de Weckbeker *et* Cory (1988) 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.

Après centrifugation d'une culture de l'échantillon étudié, le culot est additionné à 1 ml d'EDTA (0.02M) puis broyé à l'ultrason : 0.8 ml de ce mélange (homogénat) récupéré est mélangé à 0.2 ml 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 échantillons à 1000 tours pendant 5min est réalisée après un repos de 15 min à température ambiante.

On dépose 0.5ml du surnageant obtenu après centrifugation, 1ml d'EDTA et 0.025 ml de DTNB dans une cuve en plastique : la lecture de la DO se fait après 5 min de repos à une longueur d'onde de 412nm.

Le taux de glutathion est exprimé en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines selon l'équation suivante :

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

Soit :

- 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.

### 2.2.5.3. Mesure de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)

L'évaluation de l'activité de la Glutathion-S-Transférase est réalisée selon la méthode décrite par Habig et al. (1974). Cette méthode repose sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène), en présence du cofacteur glutathion (GSH). La réaction chimique produit le conjugué GS-DNB et de l'acide chlorhydrique (HCl). Les mesures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 340 nm.

L'activité de la GST est calculée selon la formule suivante :

$$GST (\mu mol/min/mg \text{ de protéines}) = \frac{\Delta DO * Vt}{e * Vs * mg \text{ de protéines}}$$

Où :

- $\Delta DO$  : Densité optique
- $Vt$  : Volume total de la cuve.
- $e$  : Coefficient d'extinction molaire du CDNB (9.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).
- $Vs$  : Volume du surnageant (0.2 ml).
- mg de protéines : Quantité de protéines exprimée en mg.
- $\Delta DO * Vt$ .
- $e * Vs * mg \text{ de protéines}$ .

### 2.2.5.4. Mesure de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD)

L'activité de la SOD est mesurée selon Paoletti et al. (1986), en suivant l'inhibition de l'oxydation du NADH à 340 nm à 25°C et pH 7,6. Le superoxyde ( $O_2^-$ ) est généré par l'interaction entre l'EDTA/Mn et le  $\beta$ -mercaptoéthanol, et neutralisé par la SOD. L'inhibition de l'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité enzymatique.

Les lectures de l'absorbance sont effectuées toutes les 30 secondes pendant 5 minutes avec un spectrophotomètre JENWAY 6300. L'activité est exprimée en unités par milligramme de protéines (U/mg protéines) selon l'équation suivante :

$$\text{SOD (U/mg protéines)} : \frac{(\% \text{ inhibition} \times V_t)}{(\epsilon \times V_s \times \text{mg protéines}) \text{mg}}$$

**Avec :**

- % inhibition : pourcentage d'inhibition de l'oxydation du NADH
- $V_t$  : volume total de la cuve (ml)
- $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $V_s$  : volume de l'échantillon ajouté (ml)
- mg de protéines : concentration protéique dans l'échantillon (mg)

#### 2.2.5.5. Mesure de l'activité catalase (CAT)

L'activité catalase (CAT) est mesurée selon la méthode de Claiborne (1985) qui repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Les cellules sont broyées aux ultrasons dans 1ml de tampon phosphate, puis l'homogénat est récupéré et centrifugé à 15000 tours pendant 10 min.

Une solution de 0.05 ml du surnageant, 0.75ml du tampon phosphate et 0.2 ml d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) est déposée dans une cuve en quartz ; la lecture au spectrophotomètre de type JENWAY 6305 est effectuée à la longueur d'onde de 240 nm pendant une minute.

L'activité catalase est mesurée en nmol/min / mg de protéines selon la formule suivante :

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

Soit :

- $\Delta DO$  : 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 de protéines : Quantité de protéines exprimée en mg.

## 2.2.6. Comportement et atteintes structurelles et membranaires chez la paramécie

### 2.2.6.1. Caractérisation des malformations

Les différents types de malformations sont observés au microscope de type Leica DL1000 au grossissement (x40) après coloration au rouge neutre et fixation au formol 4% durant les cinq jours de traitement.

### 2.2.6.2. Suivi des trajectoires de déplacement

Pour évaluer l'effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur la direction de déplacement des paramécies, des vidéos sont capturées. Ces vidéos sont analysées à l'aide du logiciel Kinovea 0.8.15, qui permet de tracer avec précision les trajectoires de déplacement des cellules.

### 2.2.7. Analyses statistiques

Les résultats expérimentaux sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne ( $M \pm SEM$ ). L'évaluation des différences entre les groupes est réalisée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à deux critères de classification. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme le seuil de significativité statistique. Les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 5.03.

Aucune différence significative n'ayant été observée entre le témoin normal et le témoin acétone pour l'ensemble des paramètres analysés, les résultats des groupes traités ont été comparés à ces deux témoins.

Les niveaux de significativité sont représentés comme suit :

- $p < 0,05$  : différence significative
- $p < 0,01$  : différence hautement significative
- $p < 0,001$  : différence très hautement significative

Les comparaisons sont systématiquement effectuées par rapport aux groupes témoin normal et témoin acétone.

# **Chapitre III : Résultats**

Nos résultats portent sur des études *in vitro* visant à évaluer la toxicité des amidophosphonates AP1 et AP2, en comparaison avec le glyphosate, à l'aide de deux modèles biologiques alternatifs : *Paramecium sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*.

L'approche expérimentale consiste dans un premier temps à analyser les effets sur la croissance cellulaire et l'activité respiratoire. Par la suite, une série de paramètres biochimiques est étudiée, tels que la teneur en protéines totales, ainsi que des marqueurs du stress oxydatif, notamment les activités catalase, glutathion S-transférase (GST), superoxyde dismutase (SOD), et le taux de glutathion réduit (GSH). Des perturbations structurelles et morphologiques sont également examinées, fournissant ainsi un aperçu global des effets toxiques des molécules étudiées.

### **1. Comparaison des structures chimiques des composés étudiés**

Les trois composés partagent un pharmacophore similaire (Figure 7), représenté par le groupement phosphonate, qui est essentiel pour leur interaction avec des systèmes biologiques. Toutefois, AP1 et AP2 présentent des groupements spécifiques qui les différencient du glyphosate, notamment un cycle phényle dans le cas d'AP1 et un groupe méthoxy dans le cas d'AP2. Ces modifications structurelles pourraient expliquer les différences observées dans leurs toxicités respectives sur les modèles biologiques. Ces différences influencent non seulement leur affinité pour les cibles biologiques mais également leurs effets sur des paramètres tels que la croissance cellulaire, le métabolisme respiratoire et les altérations structurelles.

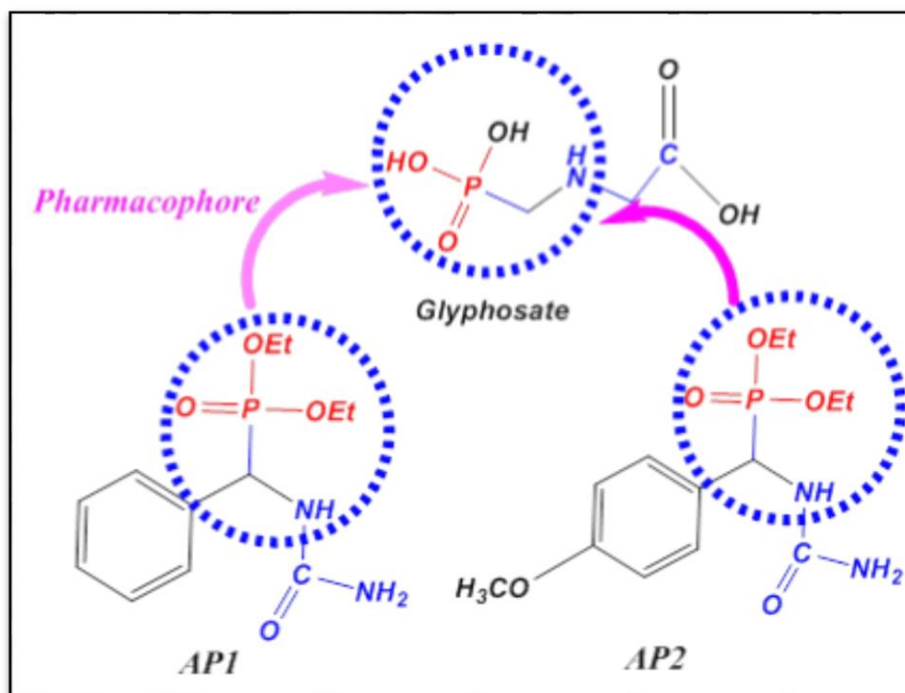


Figure 7 : Comparaison structurale des amidophosphonates (AP1 et AP2) avec le glyphosate.

## 2. Étude physiologique et polarographique

### 2.1. Cas de *Paramecium Sp.*

#### 2.1.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la cinétique de croissance cellulaire

La figure 8 (A et B) met en évidence l'évolution de la cinétique de croissance des paramécies traitées avec AP1, AP2 et le glyphosate, comparativement aux témoins, en fonction du temps.

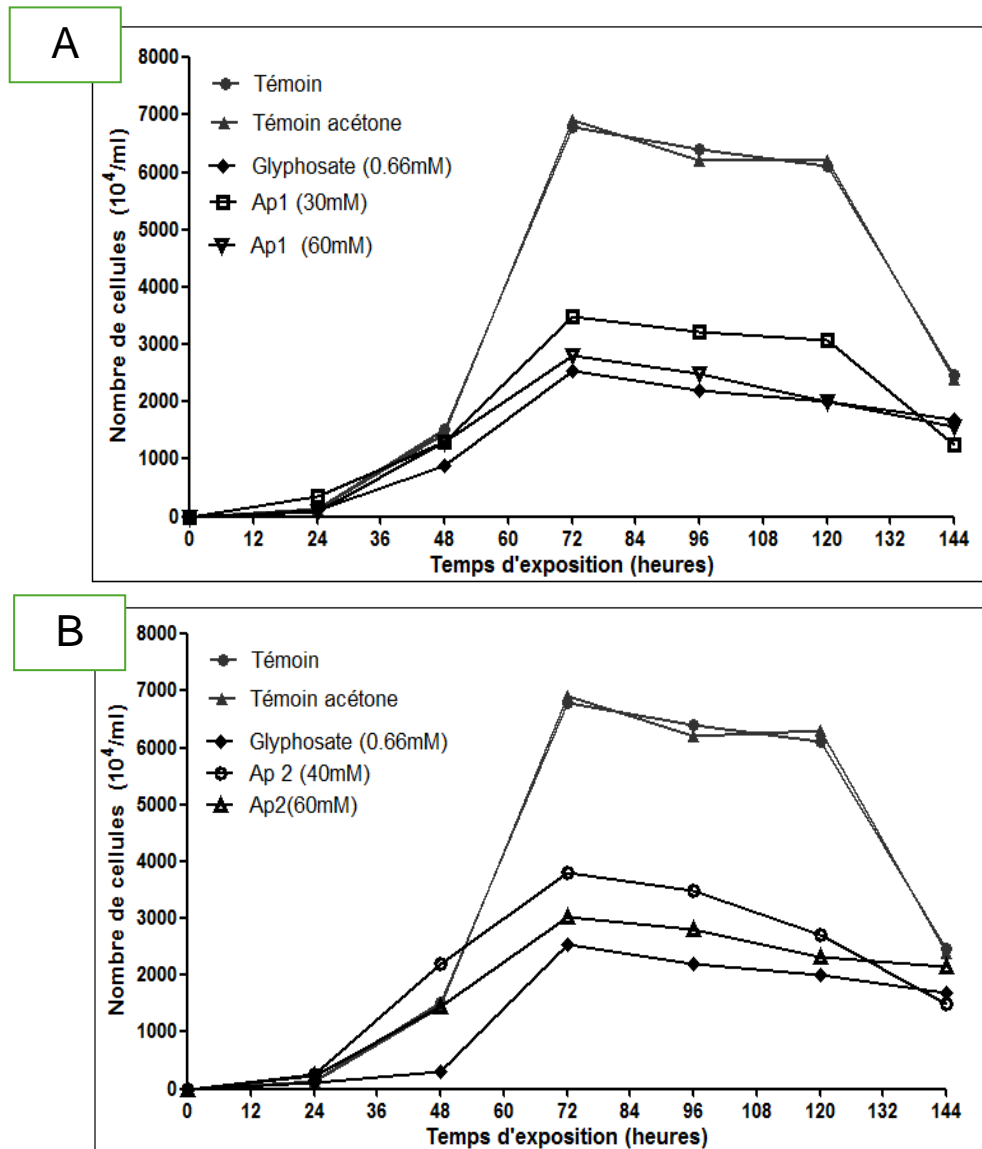


Figure 8 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur la croissance cellulaire de *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

Nous constatons une croissance normale des paramécies témoins, avec un nombre initial de cellules de  $10 \times 10^4/\text{ml}$  à T0, atteignant environ  $70 \times 10^4$  cellules/ml au 3<sup>e</sup> jour avec une phase exponentielle de croissance située entre 24 et 72 h pour les témoins et les témoins acétone. Parallèlement, pour la plus faible concentration d'AP1 (30 mM, Figure 8A), l'évolution de la croissance cellulaire semble comparable à celle des témoins jusqu'à 48 h de traitement.

Cependant, au-delà de 48 h, une forte diminution du nombre de cellules est observée, atteignant environ la moitié de celle des témoins à 72 h, et cette inhibition persiste jusqu'à la fin de l'expérience (144 h).

Concernant le traitement par la plus forte concentration d'AP1 (60 mM), nous constatons une inhibition de la croissance dès 24 h de traitement ou nous remarquons une diminution de 50% du nombre de cellules par rapport aux témoins, cette déplétion s'aggravant progressivement au fil du temps.

Le glyphosate (0,66 mM) entraîne une inhibition significative de la croissance dès les premières 24 h. À 72 h, le nombre de cellules atteint environ  $30 \times 10^4/\text{ml}$ , soit moins de 50 % par rapport aux témoins. Cette inhibition persiste jusqu'à la fin de l'expérience. Une tendance similaire est observée pour AP2 (Figure 8B), avec une diminution plus marquée à 60 mM. À 40 mM, la croissance reste comparable aux témoins jusqu'à 48h, Au-delà de 48h nous constatons une forte inhibition de la croissance. Chez les traitées AP2 (60 mM) le nombre de cellules est d'environ  $20 \times 10^4$  à 48 h, contre  $60 \times 10^4$  pour les témoins.

### 2.1.2. Pourcentages de réponse

La figure 9 (A et B) met en évidence l'évolution du pourcentage de réponse chez les paramécies témoins et traitées par AP1, AP2 et le glyphosate. -

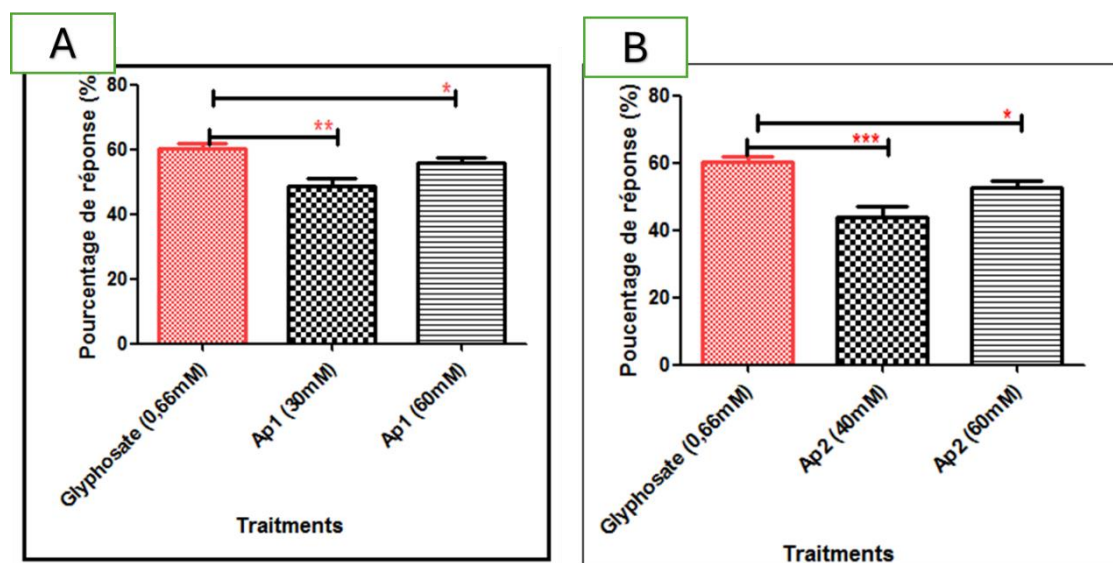


Figure 9 : Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de glyphosate, AP1 et AP2.

Nous constatons que le pourcentage de réponse des paramécies est dose-dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes des traitements AP1 et AP2. Pour AP1 (Figure 8A), le pourcentage de réponse augmente avec les concentrations, atteignant environ 96 % à 60 mM, avec une inhibition d'environ 40 % de la croissance des paramécies comparée aux témoins. Pour AP2 (Figure 8B), une tendance similaire est observée, avec un pourcentage de réponse passant de 64,46 % à 40 mM à 96,44 % à 60 mM, où l'inhibition de la croissance des paramécies est également marquée. Le pourcentage de réponse des traitées au glyphosate est également positif indiquant une inhibition de la croissance.

### 2.1.3. Détermination du nombre, temps et vitesse de génération chez *Paramecium sp.*

Le tableau (3) regroupe les résultats relatifs au nombre, au temps et à la vitesse de génération des paramécies.

Tableau 3 : Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur le nombre de génération (n), le temps de génération (g) et la vitesse de génération (k) des paramécies.

Condition	Nombre de génération (n) ± ET	Temps de génération (g) ± ET	Vitesse de génération (k) ± ET
<b>Témoin</b>	5,59	12,88	0,0538
<b>T Acétone</b>	5,54	12,99	0,0534
<b>Glyphosate</b>	4,20	17,16	0,0404
<b>AP1 30mM</b>	5,58	12,90	0,0537
<b>AP1 60mM</b>	4,98	14,45	0,0480
<b>AP2 40mM</b>	5,55	12,96	0,0535
<b>AP2 60mM</b>	5,41	13,29	0,0521

L'évolution du nombre de générations et de la vitesse de génération pour les cellules témoins reste optimale, avec un temps de génération stable autour de 12,88 h, reflétant une croissance normale sans perturbations.

Comparativement aux témoins, les traitements montrent des effets dose-dépendants. Le glyphosate induit une augmentation du temps de génération à 17,16 h, traduisant une toxicité notable. Les populations exposées à AP1 et AP2 révèlent également une augmentation progressive du temps de génération en fonction des concentrations. Pour AP1, le temps de génération atteint 14,45 h à la concentration la plus élevée, tandis que pour AP2, il est légèrement prolongé jusqu'à 13,29 h.

Ces résultats soulignent une perturbation de la dynamique de croissance, particulièrement marquée avec le glyphosate et les fortes concentrations d'AP1 et d'AP2, comparativement aux témoins.

### 2.1.4. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire

La figure 10 (A et B) illustre l'effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction du temps.

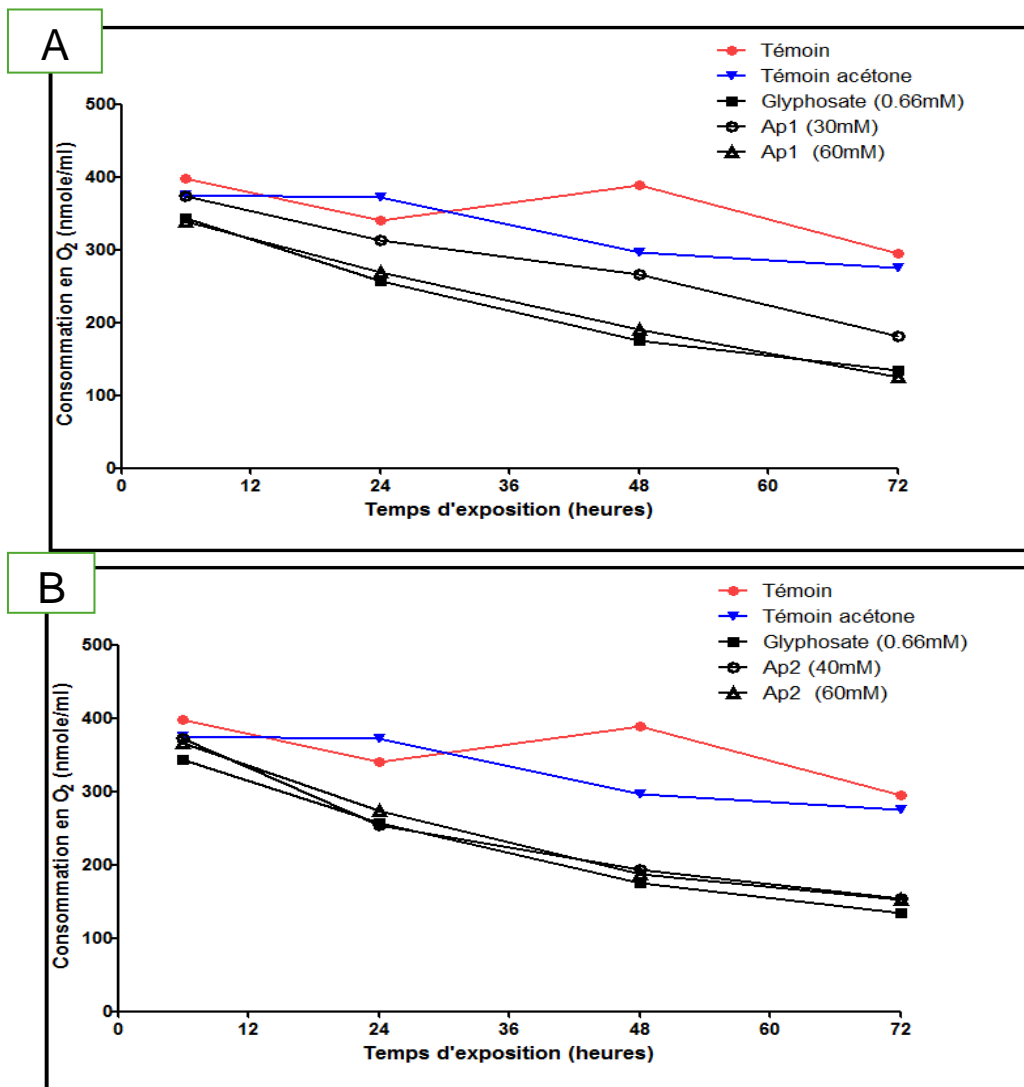


Figure 10 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire de *paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

Nous remarquons qu'entre 12 h et 24 h de traitement, une légère diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> est observée pour toutes les concentrations des deux molécules, y compris le glyphosate.

À partir de 36 h et jusqu'à 72 h, la différence de consommation d'O<sub>2</sub> entre les cellules témoins et celles traitées devient plus marquée. Pour AP1 à 60 mM (Figure 9A), la consommation d'O<sub>2</sub> diminue fortement, atteignant environ 70 % de celle des témoins au temps 72 h. Une tendance similaire est observée pour AP2 à 60 mM (Figure 9B), avec une diminution comparable.

Aux plus faibles concentrations de AP1 et AP2, la diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> reste limitée, ne représentant qu'environ 20 % de différence par rapport aux témoins au temps 72 h.

#### 2.1.5. Détermination de la concentration inhibitrice CI<sub>50</sub>

Le tableau (4) représente les valeurs des CI<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50 %) pour les composés AP1, AP2 et le glyphosate après 72 h de traitement sur les paramécies.

Tableau 4: Régressions linéaires et valeurs des CI<sub>50</sub> du glyphosate, d'AP1 et d'AP2 après 72h d'exposition

Molécule/Temps d'exposition	Equation de régression (y = ax + b)	CI <sub>50</sub> (mg/L) ± Erreur
<b>Ap1 72 h</b>	Y=+ 3.217+1.196X	33.09±0.67
<b>Ap2 72h</b>	Y= +0.94 + 2.461X	41.36±0.73
<b>Glyphosate72h</b>	Y= -1.124 + 3.057X	0.66± 0.40

Nous constatons que la concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) diffère selon la molécule testée après 72h de traitement (Tableau 4). Pour AP1, la CI<sub>50</sub> est estimée à 33,09 ± 0,67 mg/L, tandis que pour AP2, elle est légèrement plus élevée, atteignant 41,36 ± 0,73 mg/L. En revanche, le glyphosate est plus toxique, avec une CI<sub>50</sub> très faible de l'ordre de 0,66 ± 0,40 mg/L.

## 2.2. Cas de *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.2.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la cinétique de croissance cellulaire

La figure 11 (A et B) représente l'évolution de la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* traitées avec le glyphosate, AP1 et AP2 comparativement aux témoins, en fonction du temps.

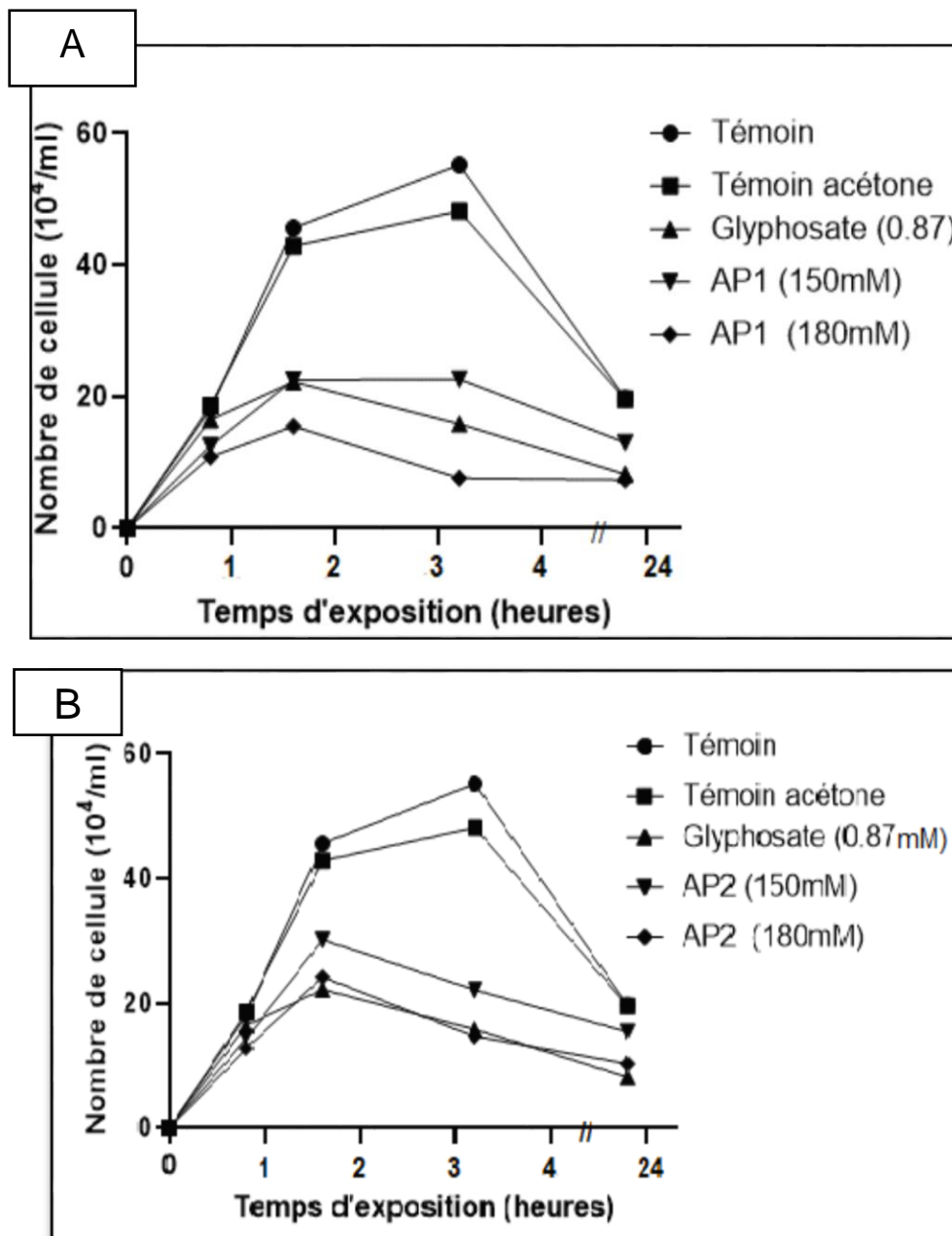


Figure 11 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

Nous observons une croissance normale des levures témoins, atteignant environ  $50 \times 10^4$  cellules/ml à 3 h, avec une phase exponentielle de croissance située entre 1h et 3h et une phase de déclin. Une évolution similaire est constatée pour les témoins acétone.

En revanche, le traitement avec AP1 à 150 mM entraîne une inhibition de croissance par rapport à celle des témoins dès 2 h, avec un nombre de cellules d'environ  $25 \times 10^4$ /ml à 3 h, soit environ la moitié de celle des témoins. Une diminution progressive est ensuite observée, atteignant environ  $20 \times 10^4$  cellules/ml à 24 h. À 180 mM, l'inhibition de la croissance est encore plus marquée, avec un nombre de cellules réduit à  $5 \times 10^4$ /ml dès 24 h.

Une tendance similaire est observée avec AP2. À 150 mM, la croissance reste inférieure à celle des témoins (environ  $25 \times 10^4$ /ml à 3 h), tandis qu'à 180 mM, l'inhibition est plus prononcée, atteignant environ  $10 \times 10^4$ /ml à 3 h. Le glyphosate (0,87 mM) induit une inhibition marquée de la croissance, avec une population atteignant environ  $25 \times 10^4$ /ml à 2 h, avant de diminuer progressivement à  $10 \times 10^4$ /ml à 24 h.

### 2.2.2. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire

L'effet du traitement par le glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae* est illustré dans les figures 12 (A et B).

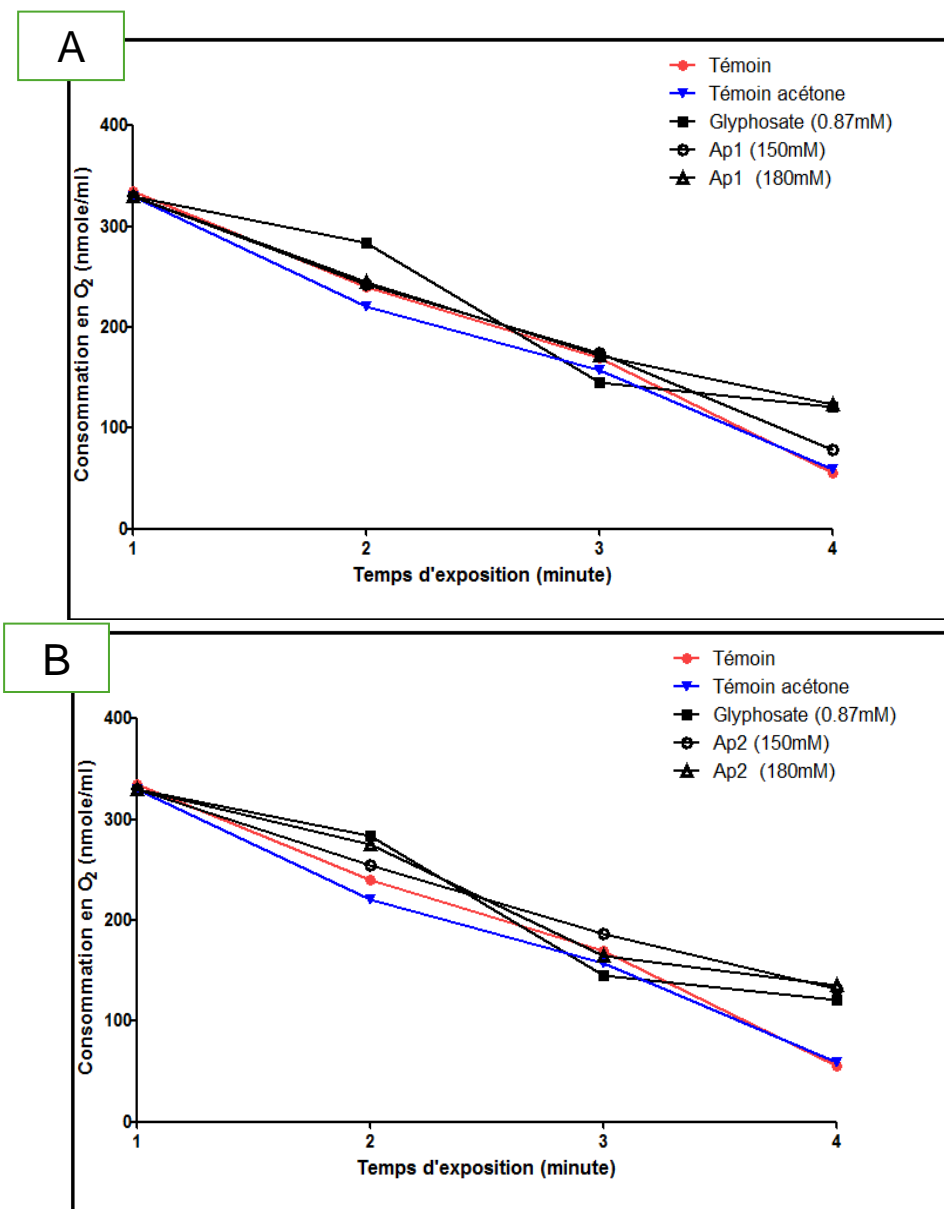


Figure 12 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur le métabolisme respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

Nous remarquons une consommation d'O<sub>2</sub> régulière et stable pour les témoins et les témoins acétone, traduisant une activité respiratoire normale. En revanche, chez les cellules traitées, une diminution de la consommation d'O<sub>2</sub> est observée. En présence du glyphosate (0,87 mM), la consommation d'O<sub>2</sub> est fortement réduite, atteignant environ 50 % de celle des témoins en fin d'expérience. Une tendance similaire est observée pour AP1 et AP2 à 180 mM (Figure A et B), où une forte réduction de la consommation d'O<sub>2</sub> est notée. Aux plus faibles concentrations d'AP1 et AP2 (150 mM), la diminution est modérée, représentant environ 20 % de différence par rapport aux témoins.

### 2.2.3. Détermination de la concentration inhibitrice CI<sub>50</sub>

Le tableau (5) présente les valeurs des CI<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50 %) pour les composés AP1, AP2 et le glyphosate après 2 h de traitement sur les levures.

Tableau 5 : Régressions linéaires et valeurs des CI<sub>50</sub> du glyphosate, AP1 et AP2 après 3h d'exposition.

Molécule/Temps d'exposition	Equation de régression (y = ax + b)	CI <sub>50</sub> (mg/L) ± Erreur
<b>Ap1 3h</b>	Y= 3,28X - 2,19	155,78± 0.86
<b>Ap2 3h</b>	Y= 1,96X + 0,60	174,46± 0.64
<b>Glyphosate 3h</b>	Y= 3,29 X- 2,14	0.87± 0.43

La concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) varie selon la molécule testée après 3h d'exposition (Tableau 5). Pour AP1, la CI<sub>50</sub> est évaluée à 155,78 ± 0,86 mg/L, tandis que celle d'AP2 est légèrement plus élevée, atteignant 174,46 ± 0,64 mg/L. En revanche, le glyphosate se démarque par une toxicité nettement supérieure, avec une CI<sub>50</sub> beaucoup plus faible, de l'ordre de 0,87 ± 0,43 mg/L.

### 3. Étude biochimique et enzymatique

#### 3.1. Cas de *Paramecium sp.*

##### 3.1.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales

Le tableau (6) représente l'évolution du taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) en fonction du temps d'exposition chez les paramécies traitées par le glyphosate, AP1 et AP2.

Tableau 6 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales chez *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

Condition	6 h	24 h	48 h	72 h
<b>Témoin</b>	$6.0 \pm 0.4$	$6.0 \pm 0.5$	$5.8 \pm 0.4$	$5.7 \pm 0.4$
<b>Témoin acétone</b>	$5.9 \pm 0.5$	$6.3 \pm 0.5$	$5.8 \pm 0.3$	$5.8 \pm 0.4$
<b>AP1 (30mM)</b>	$5.5 \pm 0.4$	$4.8 \pm 0.4$	$5.0 \pm 0.4$	$4.4 \pm 0.4$
<b>AP1 (60mM)</b>	$4.8 \pm 0.3$	$4.4 \pm 0.4$	$4.2 \pm 0.4$	$4.0 \pm 0.4$
<b>AP2 (40mM)</b>	$5.7 \pm 0.5$	$4.8 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.3$	$4.3 \pm 0.3$
<b>AP2 (60mM)</b>	$5.0 \pm 0.4$	$4.8 \pm 0.5$	$4.3 \pm 0.4$	$4.1 \pm 0.4$
<b>Glyphosate (0.66mM)</b>	$4.5 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.3$	$3.4 \pm 0.5$	$3.0 \pm 0.5$

Le tableau indique un taux de protéines stable chez les témoins ( $6,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) et les témoins acétone ( $5,9 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) à 6 h, sans variation significative tout au long de l'exposition. En revanche, chez les cellules traitées, une diminution progressive du taux de protéines est observée. À 72 h, le taux de protéines sous glyphosate (0,66 mM) baisse de manière significative à  $3,0 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ , soit une réduction d'environ 50 % par rapport aux témoins ( $p \leq 0,001$ ). Les concentrations élevées d'AP1 (60 mM) et AP2 (60 mM) entraînent également des baisses marquées, atteignant respectivement  $4,4 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$  et  $4,1 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ , ce qui confirme l'effet dose-dépendant observé.

### 3.1.2. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH

La figure 13 (A et B) illustre l'évolution du taux de GSH chez les paramécies témoins et traitées par le glyphosate (0,66 mM), ainsi que par les concentrations croissantes d'AP1 (30 mM et 60 mM) et d'AP2 (40 mM et 60 mM).

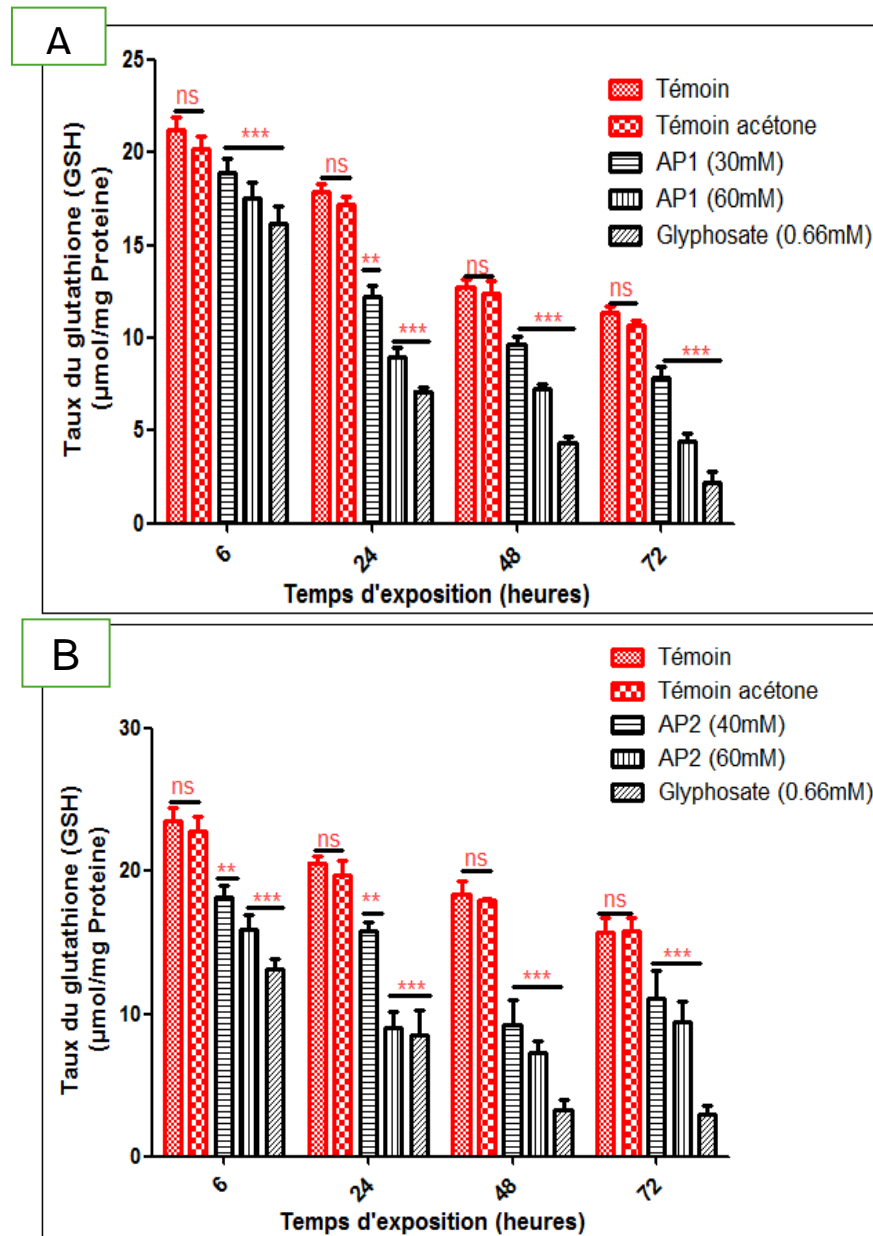


Figure 13 : Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH chez *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

Nous remarquons que chez les témoins et les témoins acétone, le taux de GSH est de l'ordre de 15  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines à 48 h.

En revanche, chez les paramécies traitées, une diminution dose-dépendante du taux de GSH est observée. Cette déplétion est particulièrement marquée aux concentrations les plus élevées d'AP1 et d'AP2 (60 mM), atteignant respectivement 5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines, avec une réduction très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) par rapport aux témoins. Le glyphosate (0,66 mM) provoque une diminution encore plus marquée, atteignant environ 3  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines à 48 h, également avec une réduction très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ), soulignant une toxicité plus prononcée que celle des AP1 et AP2 à 60 mM.

### 3.1.3. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)

La figure 14 (A et B) illustre l'évolution de l'activité GST sous l'effet de différentes concentrations de AP1 (30 mM, 60 mM), AP2 (40 mM, 60 mM) et du glyphosate (0.66 mM) à plusieurs intervalles de temps (6, 24, 48, 72 heures).

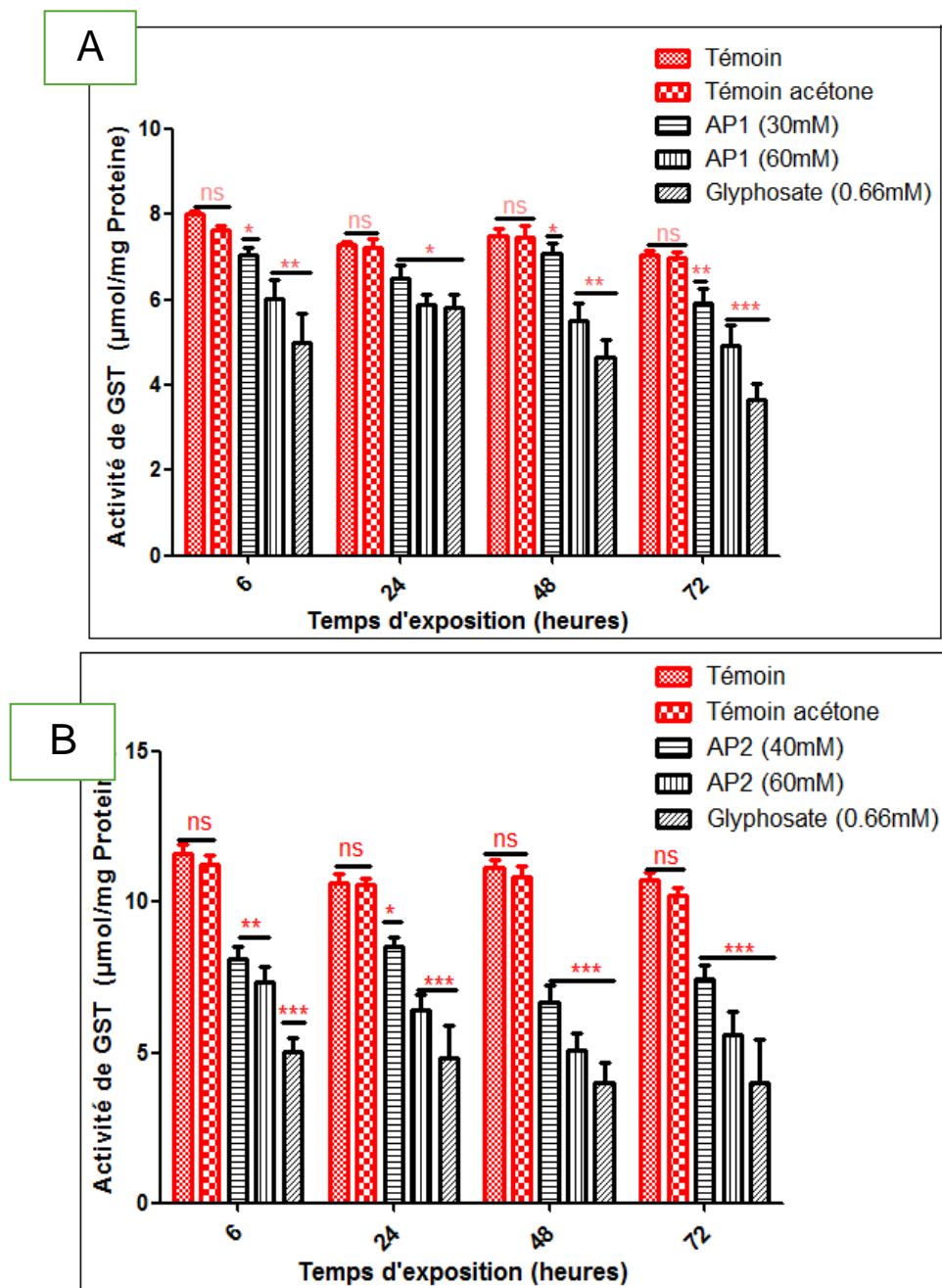


Figure 14 : Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Glutathion-S-Transférase chez *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

On remarque que l'activité GST chez les témoins et les témoins acétone est de l'ordre de 12  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  à 48 h.

En revanche, chez les paramécies traitées, une diminution dose-dépendante de l'activité GST est observée. Cette réduction est particulièrement marquée pour le glyphosate (0,66 mM) et aux concentrations les plus élevées d'AP1 et d'AP2 (60 mM), où l'activité GST atteint environ 4  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  pour AP1, 5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  pour AP2, et 3,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  pour le glyphosate à 48 h, avec une inhibition très hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) par rapport aux témoins. À 72 h, les activités GST restent significativement réduites dans toutes les conditions traitées, soulignant une inhibition persistante.

### 3.1.4. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'activité de la super oxyde dismutase

Le tableau (7) représente l'activité SOD chez *Paramecium sp* exposée à différentes concentrations de AP1, AP2 et glyphosate par rapport aux témoins. Les valeurs sont exprimées en U/mg de protéines.

Tableau 7 : Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD) chez *Paramecium sp*. en fonction du temps d'exposition.

Condition	6h	24h	48h	72h
<b>Témoin</b>	8,50 $\pm$ 0,30	8,60 $\pm$ 0,40	8,55 $\pm$ 0,35	8,50 $\pm$ 0,30
<b>Témoin acétone</b>	8,60 $\pm$ 0,40	8,70 $\pm$ 0,35	8,65 $\pm$ 0,30	8,60 $\pm$ 0,40
<b>Glyphosate 0.66 mM</b>	15,20 $\pm$ 1,00	21,80 $\pm$ 1,20	18,50 $\pm$ 1,10	10,50 $\pm$ 0,80
<b>AP1 30 mM</b>	10,50 $\pm$ 0,70	12,70 $\pm$ 0,75	11,20 $\pm$ 0,60	9,00 $\pm$ 0,50
<b>AP1 60 mM</b>	18,00 $\pm$ 1,10	20,30 $\pm$ 1,10	17,80 $\pm$ 1,00	11,50 $\pm$ 0,90
<b>AP2 40 mM</b>	12,50 $\pm$ 0,60	14,20 $\pm$ 0,60	13,00 $\pm$ 0,50	9,50 $\pm$ 0,40
<b>AP2 60 mM</b>	20,50 $\pm$ 1,00	22,80 $\pm$ 0,95	19,00 $\pm$ 1,20	12,00 $\pm$ 0,80

Le tableau (7) montre une activité SOD similaire entre les témoins (8,50  $\pm$  0,30 U/mg de protéines) et les témoins acétone (8,60  $\pm$  0,40 U/mg de protéines), sans

différence significative (ns). En revanche, une augmentation significative est observée chez les paramécies traitées.

Sous glyphosate (0,66 mM), l'activité SOD atteint  $21,80 \pm 1,20$  U/mg de protéines ( $p \leq 0,001$ ), soit près de trois fois la valeur des témoins. Les concentrations élevées d'AP1 et d'AP2 (60 mM) montrent également des augmentations marquées, atteignant respectivement  $20,30 \pm 1,10$  U/mg de protéines et  $22,80 \pm 0,95$  U/mg de protéines ( $p \leq 0,001$ ). Ces résultats traduisent une réponse adaptative importante au stress oxydatif.

### 3.1.5. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase

La figure 15 (A et B) représente l'effet du glyphosate (0.66mM), de AP1 (30 mM et 60 mM), et de AP2 (40 mM et 60 mM) sur l'évolution de l'activité catalase.

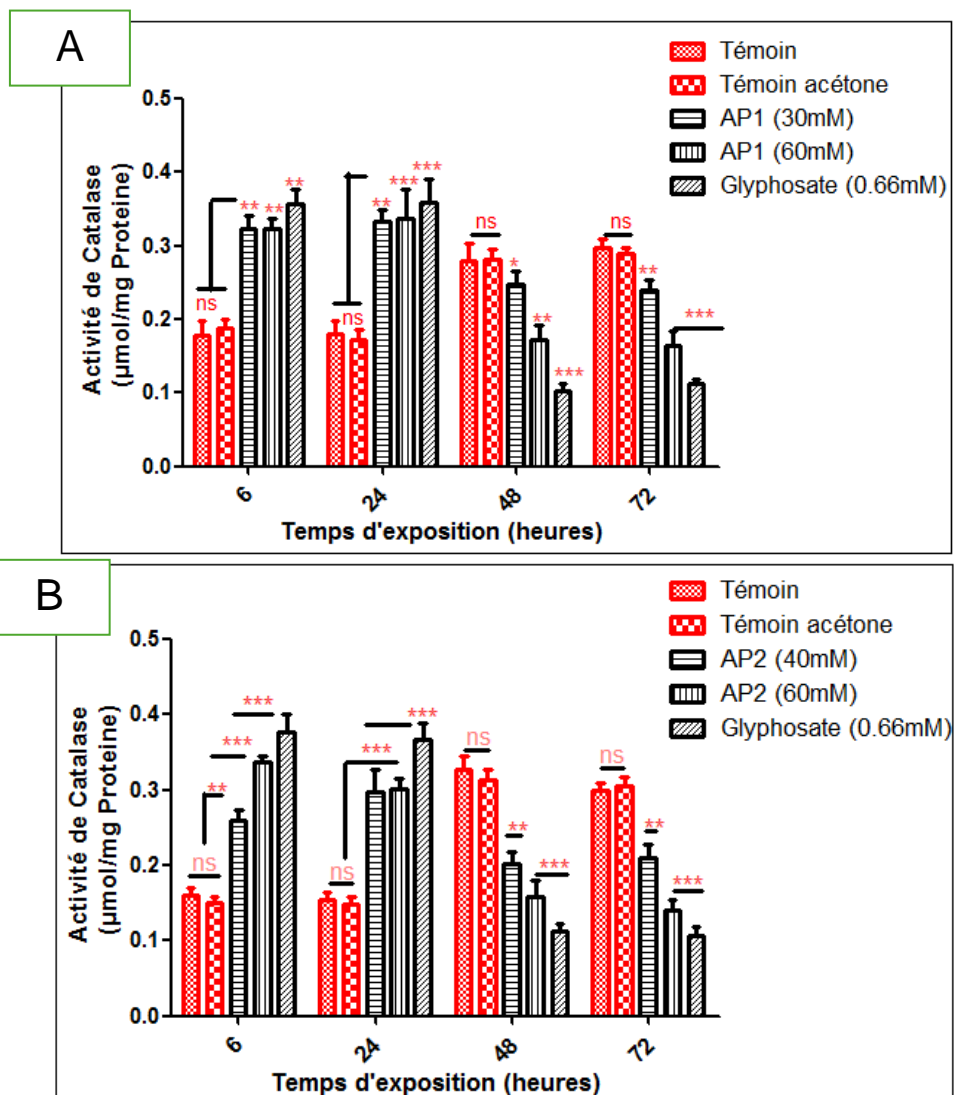


Figure 15: Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase chez *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition.

La figure 15 (A et B) montre l'évolution de l'activité catalase chez *Paramecium sp.* en fonction du temps d'exposition. Pour les témoins et les témoins acétone, l'activité catalase reste stable entre 0,27 et 0,34  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines, sans variations significatives. En revanche, une augmentation notable de l'activité catalase est observée chez les cellules traitées, surtout aux concentrations les plus élevées d'AP1 et AP2 (60

mM), atteignant respectivement 0,41  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  à 24 h pour AP1 et 0,43  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  à 24 h pour AP2.

Cette induction devient significative dès 6 h ( $p \leq 0,01$ ) et très significative à 24 h ( $p \leq 0,001$ ) pour toutes les conditions traitées. Après 24 heures, une diminution progressive de l'activité catalase est notée, avec une inhibition très significative pour le glyphosate à 72 h (0,06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines,  $p \leq 0,001$ ), suggérant une saturation ou inhibition de la réponse enzymatique.

### 3.2. Cas de *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.2.1. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales

Le tableau (8) représente les taux de protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) pour les traitements avec AP1 et AP2 (150 mM et 180 mM) ainsi que pour le glyphosate (0,87 mM), comparativement aux témoins.

Tableau 8 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de protéines totales chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

Condition	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Témoin	$2.7 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.5$	$2.8 \pm 0.4$	$2.3 \pm 0.3$	$2.5 \pm 0.3$
Témoin acétone	$2.9 \pm 0.5$	$2.3 \pm 0.4$	$2.5 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.4$	$2.6 \pm 0.3$
AP1 (150 mM)	$2.3 \pm 0.4$	$3.9 \pm 0.4$	$4.7 \pm 0.4$	$3.4 \pm 0.5$	$2.6 \pm 0.4$
AP1 (180 mM)	$2.5 \pm 0.3$	$4.2 \pm 0.5$	$4.8 \pm 0.4$	$3.6 \pm 0.4$	$2.5 \pm 0.4$
AP2 (150 mM)	$2.2 \pm 0.4$	$3.7 \pm 0.3$	$4.5 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.3$
AP2 (180 mM)	$2.6 \pm 0.4$	$4.3 \pm 0.5$	$5.0 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.3$
Glyphosate (0.87 mM)	$2.0 \pm 0.3$	$4.1 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.5$	$2.4 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.3$

Les témoins et les témoins acétone montrent des variations limitées des taux de protéines au cours du temps, confirmant l'absence d'effet perturbateur en conditions normales.

Chez les cellules traitées, des fluctuations notables des taux de protéines sont observées. À 2 et 3 h, des augmentations sont enregistrées pour toutes les conditions, avec des réponses particulièrement marquées sous glyphosate (0,87 mM) et AP2 (180 mM),

atteignant des pics à 3 h. Les concentrations plus faibles d'AP1 (150 mM) et d'AP2 (150 mM) montrent également des augmentations, bien que moins prononcées.

À partir de 4 h, une diminution progressive des taux de protéines est observée pour toutes les conditions traitées, revenant progressivement à des niveaux proches des témoins. À 24 h, le glyphosate montre une réduction plus prononcée des taux de protéines, atteignant des niveaux inférieurs à ceux des témoins, tandis qu'AP1 et AP2 rejoignent des valeurs similaires à celles des témoins. Ces résultats reflètent une réponse adaptative initiale au stress suivie d'une diminution potentielle liée à une régulation ou un épuisement des ressources protéiques.

## 3.2.2. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH

la figure 16 (A et B) montre l'évolution du taux de glutathion réduit (GSH) chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

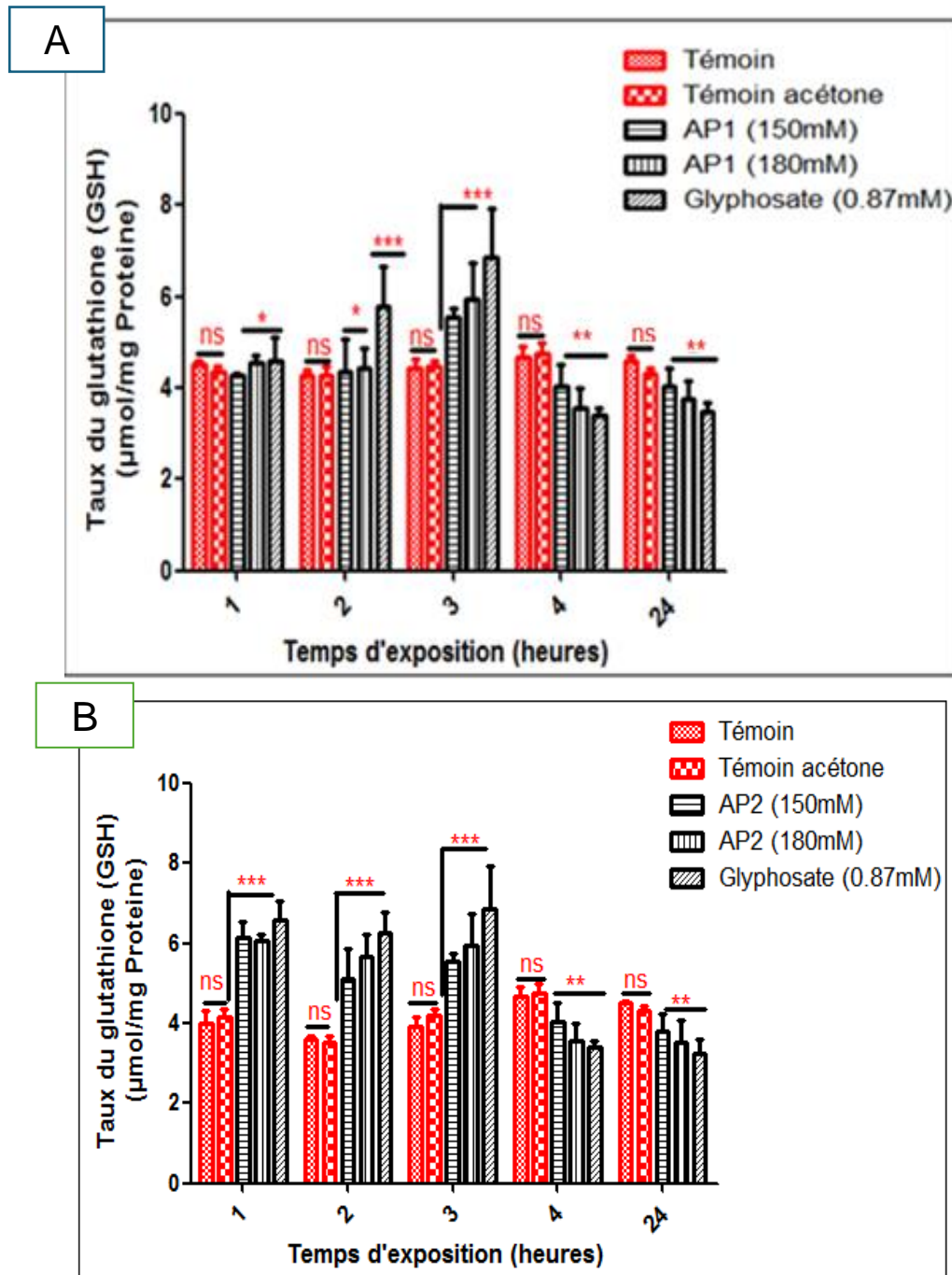


Figure 16 : Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution du taux de GSH chez *saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps.

On remarque, Chez les témoins et les témoins acétone, le taux de GSH reste stable à toutes les heures d'exposition, avec des valeurs autour de 4,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines, indiquant une absence de perturbation enzymatique (ns).

Chez les cellules traitées, une augmentation très hautement significative est observée dès 1 h, particulièrement pour le glyphosate (0,87 mM) et AP2 (180 mM). Cette augmentation atteint un pic très marqué à 3 h, avec des valeurs de 7,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines pour le glyphosate et 7  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines pour AP2 ( $p \leq 0,001$ ).

Après 3 h, une diminution progressive est observée pour toutes les conditions traitées. À 24 h, le taux de GSH diminue de manière hautement significative pour le glyphosate, AP1 (180 mM), et AP2 (180 mM), atteignant respectivement 2,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ , 3,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ , et 3,2  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines ( $p \leq 0,01$ ). Ces résultats traduisent une réponse adaptative initiale au stress oxydatif, suivie d'une probable saturation enzymatique ou d'un épuisement des défenses antioxydantes après une exposition prolongée.

### 3.2.3. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur la variation de l'activité Glutathion-S-Transférase (GST)

La figure 17 (A et B) illustre l'activité de la GST chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition après traitement avec AP1 et AP2 (150 mM et 180 mM) et le glyphosate (0,87 mM), comparés aux témoins.

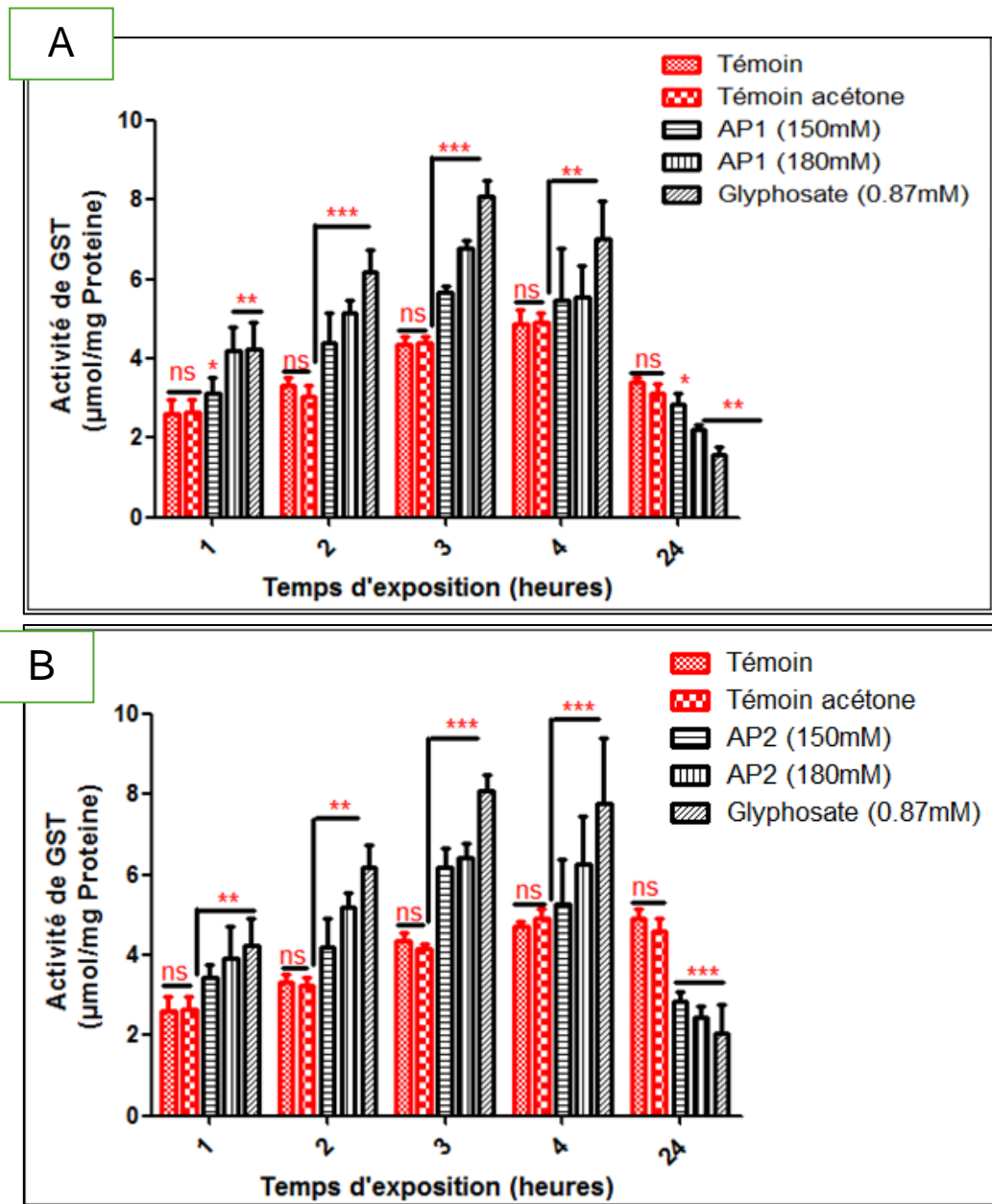


Figure 17 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité de la Glutathion S transférase (GST) chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition

On remarque que chez les témoins et les témoins acétone, l'activité GST est de l'ordre de 3,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines à 2 h. Cependant, chez les cellules traitées on observe une augmentation très hautement significative de l'activité GST à partir de 2h, particulièrement pour le glyphosate (0,87 mM). Cette activité atteint un pic à 3 h (8  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines) pour le glyphosate et 7,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines pour AP1 (180 mM) ( $p \leq 0,001$ ).

Le pic de l'activité GST est maintenu jusqu'à 4 h, avant de diminuer progressivement. À 24 h, le glyphosate, AP1 et AP2 (180 mM) provoquent une réduction marquée de l'activité GST, atteignant respectivement 3,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ , 3,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ , et 3,8  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines ( $p \leq 0,001$ ). Ces résultats traduisent une réponse enzymatique transitoire suivie d'une inhibition persistante après une exposition prolongée.

### 3.2.4. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité super oxyde dismutase

Le tableau (9) illustre l'activité de la SOD chez *Saccharomyces cerevisiae* après exposition à différentes concentrations de glyphosate, AP1, et AP2.

Tableau 9 : Effet du Glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD) chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

Condition	1h	2h	3h	4h
<b>Témoin</b>	5.2 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.3
<b>Témoin (Acétone)</b>	5.4 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2
<b>Glyphosate (0.87 mM)</b>	6.5 $\pm$ 0.5	9.0 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.5
<b>AP1 (150 mM)</b>	6.0 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.5	6.5 $\pm$ 0.4
<b>AP1 (180 mM)</b>	7.5 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 0.6	11.0 $\pm$ 0.6	8.7 $\pm$ 0.5
<b>AP2 (150 mM)</b>	6.2 $\pm$ 0.3	7.6 $\pm$ 0.4	8.8 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.4
<b>AP2 (180 mM)</b>	7.8 $\pm$ 0.4	10.2 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.7	9.2 $\pm$ 0.

Les témoins et les témoins acétone montrent une activité SOD stable, autour de 5,2 U/mg, indépendamment du temps d'exposition. Chez les cellules traitées, une augmentation dose-dépendante est observée dès 1 h.

À 150 mM, AP1 et AP2 entraînent des augmentations significatives ( $p \leq 0,01$ ), atteignant respectivement  $8,5 \pm 0,5$  et  $8,8 \pm 0,5$  U/mg à 3 h.

Pour AP1 et AP2 (180 mM), ainsi que pour le glyphosate (0,87 mM), des réponses très hautement significatives ( $p \leq 0,001$ ) sont observées. Le glyphosate induit l'effet le plus marqué, atteignant  $12,5 \pm 0,8$  U/mg à 3 h, suivi de près par AP2 et AP1, avec des valeurs respectives de  $12,0 \pm 0,7$  et  $11,0 \pm 0,6$  U/mg.

Après 3 h d'exposition, une diminution progressive de l'activité SOD est observée à 4 h, traduisant un possible épuisement enzymatique sous l'effet prolongé du stress oxydatif

## 3.2.5. Effets du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase

La figure 18 (A et B) illustre l'activité catalase chez *Saccharomyces cerevisiae*

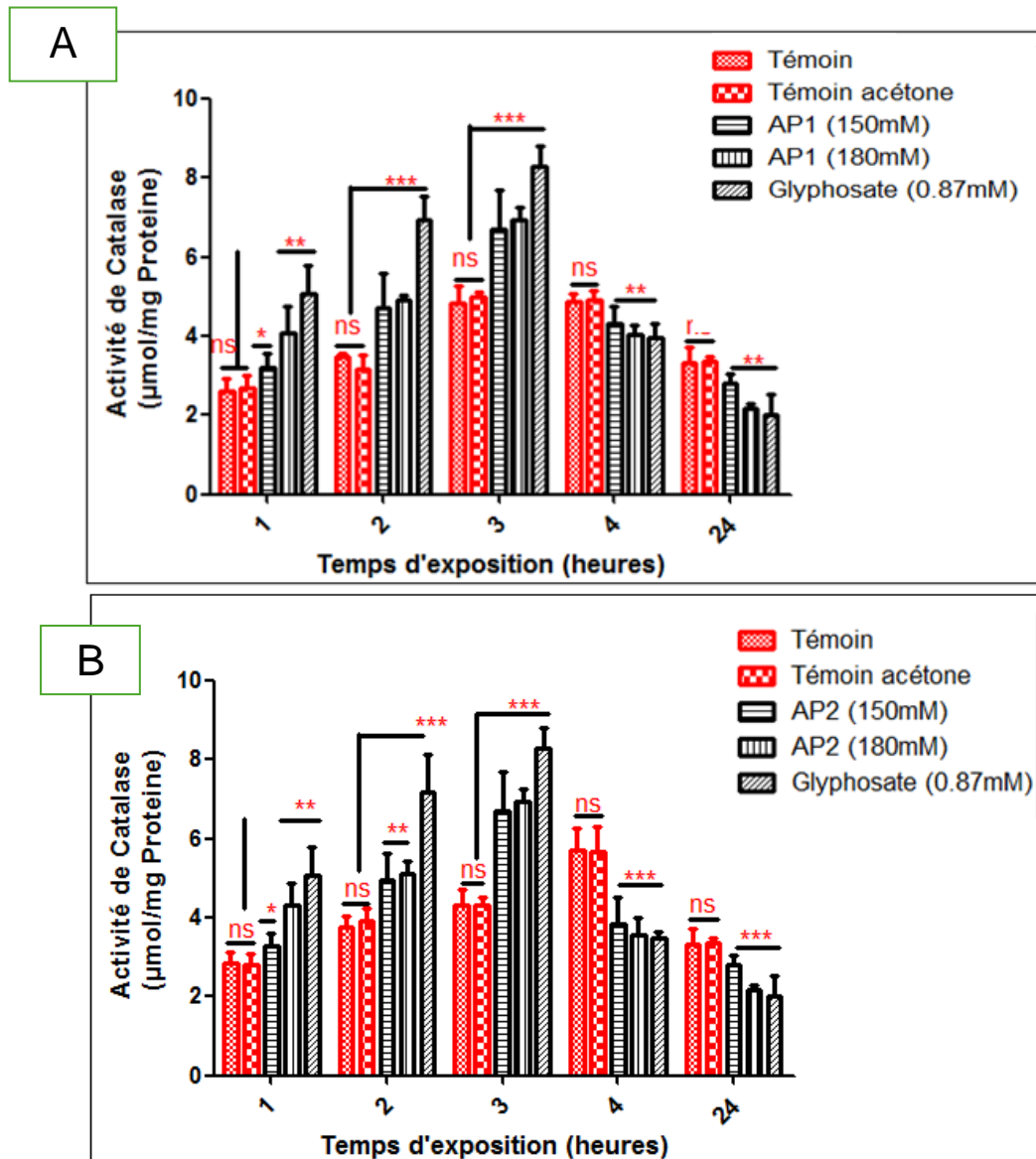


Figure 18 : Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur l'évolution de l'activité catalase chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps d'exposition.

La figure 18 (A et B) montre la variation de l'activité catalase chez *Saccharomyces cerevisiae* après exposition au glyphosate (0,87 mM), AP1 et AP2 (150 et 180 mM).

À 3 h, l'activité catalase chez les témoins est d'environ 4  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines. En revanche, une augmentation très hautement significative est observée chez les cellules traitées.

Le glyphosate (0,87 mM) atteint 8,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines, suivi d'AP1 (180 mM) et AP2 (180 mM), avec des valeurs respectives de 7,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  et 7,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines ( $p \leq 0,001$ ).

Après 24 h, une diminution de l'activité catalase est observée. Le glyphosate atteint environ 2,5  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines, tandis que les concentrations élevées d'AP1 et AP2 (180 mM) se stabilisent autour de 3,0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  et 3,2  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines, traduisant une probable saturation enzymatique ou un épuisement des défenses antioxydantes.

#### 4. Comportement et atteintes structurelles et membranaires

- Cas de *Paramecium sp.*

La planche (1) illustre les effets du glyphosate et des molécules AP1 et AP2, à diverses concentrations, sur la morphologie de *Paramecium sp.*

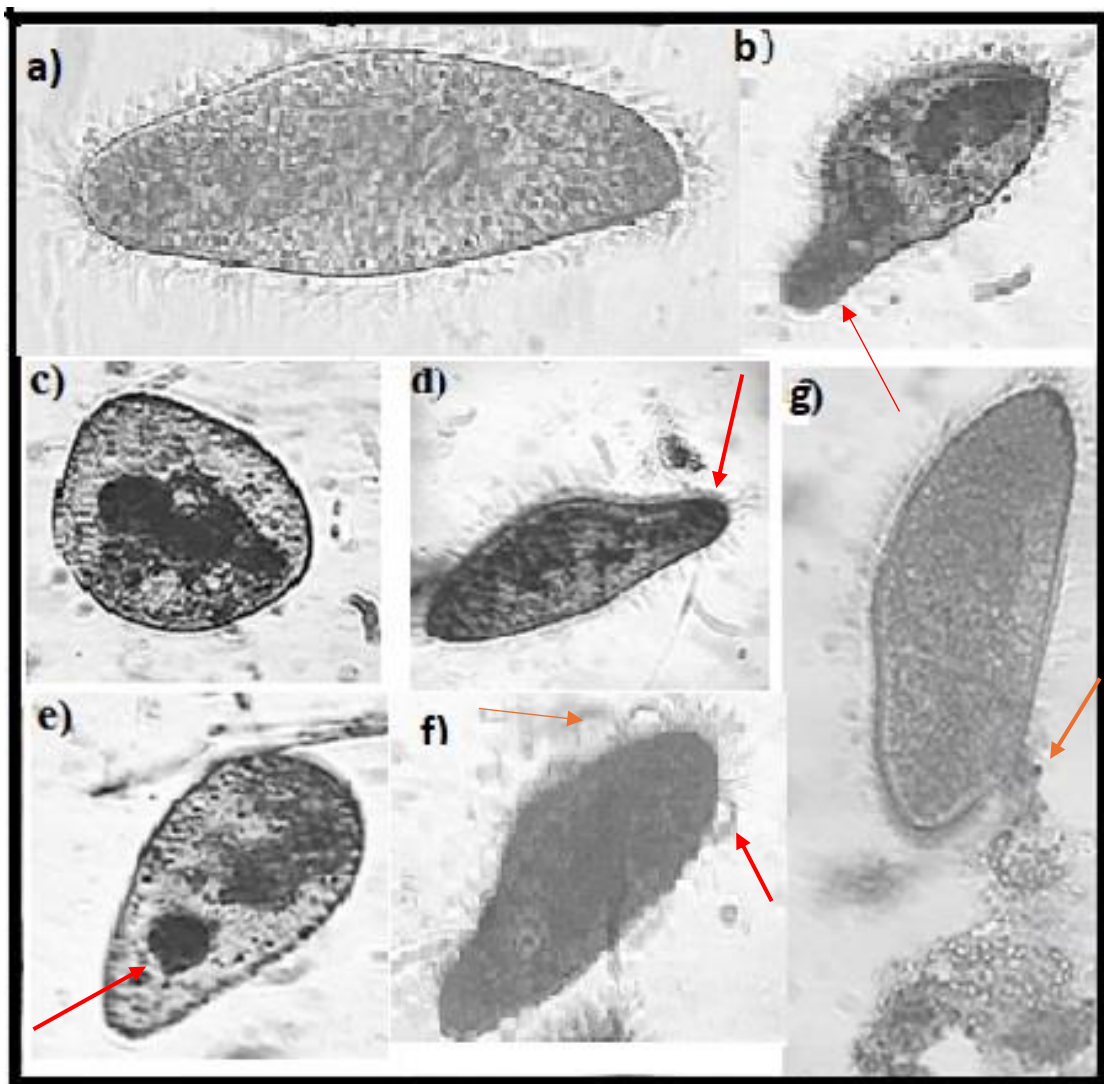


Planche 1 : Analyse comparative des altérations morphologiques de *Paramecium sp.* en réponse aux traitements par le glyphosate, AP1 et AP2.

Nous remarquons une morphologie normale chez les témoins caractérisée par une membrane plasmique intacte et une organisation cytoplasmique homogène. Aucune vacuolisation ni signe de stress cellulaire n'est observé, offrant une référence pour analyser les altérations induites par les différents traitements.

Le traitement par les molécules AP1 (30 mM) et AP2 (40 mM) induit des altérations modérées. Pour AP1 (30 mM) (c), la cellule présente des signes de vacuolisation cytoplasmique légère, sans altération significative de la membrane plasmique, indiquant une réponse modérée au stress. AP2 (40 mM) (e) provoque des modifications nucléaires et une vacuolisation modérée, tout en maintenant l'intégrité générale de la membrane plasmique, suggérant une toxicité modérée.

Lorsque la concentration des molécules augmente à AP1 et AP2 (60 mM), les altérations deviennent plus sévères. AP1 (60 mM) (d) entraînant une condensation marquée du cytoplasme et une déformation notable de la cellule, avec des signes de dégradation de l'intégrité de la membrane. Cela indique une toxicité accrue par rapport à la concentration inférieure. Chez les traitées par AP2 (60 mM) (f) des signes clairs de nécrose avancée apparaissent, accompagnés d'une perte importante du contenu cytoplasmique et de dommages visibles de la membrane plasmique, témoignant d'un stress cellulaire sévère à cette concentration.

Les effets du glyphosate (b et g) sont les plus sévères. La figure (b) représente une cellule avec une désorganisation cytoplasmique marquée et une membrane plasmique déformée. Ces caractéristiques incluent des signes clairs de détérioration structurelle, indiquant une toxicité élevée.

Dans la figure (g), La micrographie (g) met en évidence une membrane plasmique fracturée avec écoulement du cytosol, accompagnée d'une désorganisation totale des organites. Cette perte d'étanchéité et la dispersion du contenu cellulaire témoignent d'une nécrose avancée et d'une toxicité létale du glyphosate à cette concentration.

## 4.2. Effet du glyphosate, AP1 et AP2 sur les trajectoires de déplacement

La planche (2) illustre les effets des traitements par le glyphosate, AP1 et AP2 sur la motilité de *Paramecium sp.*

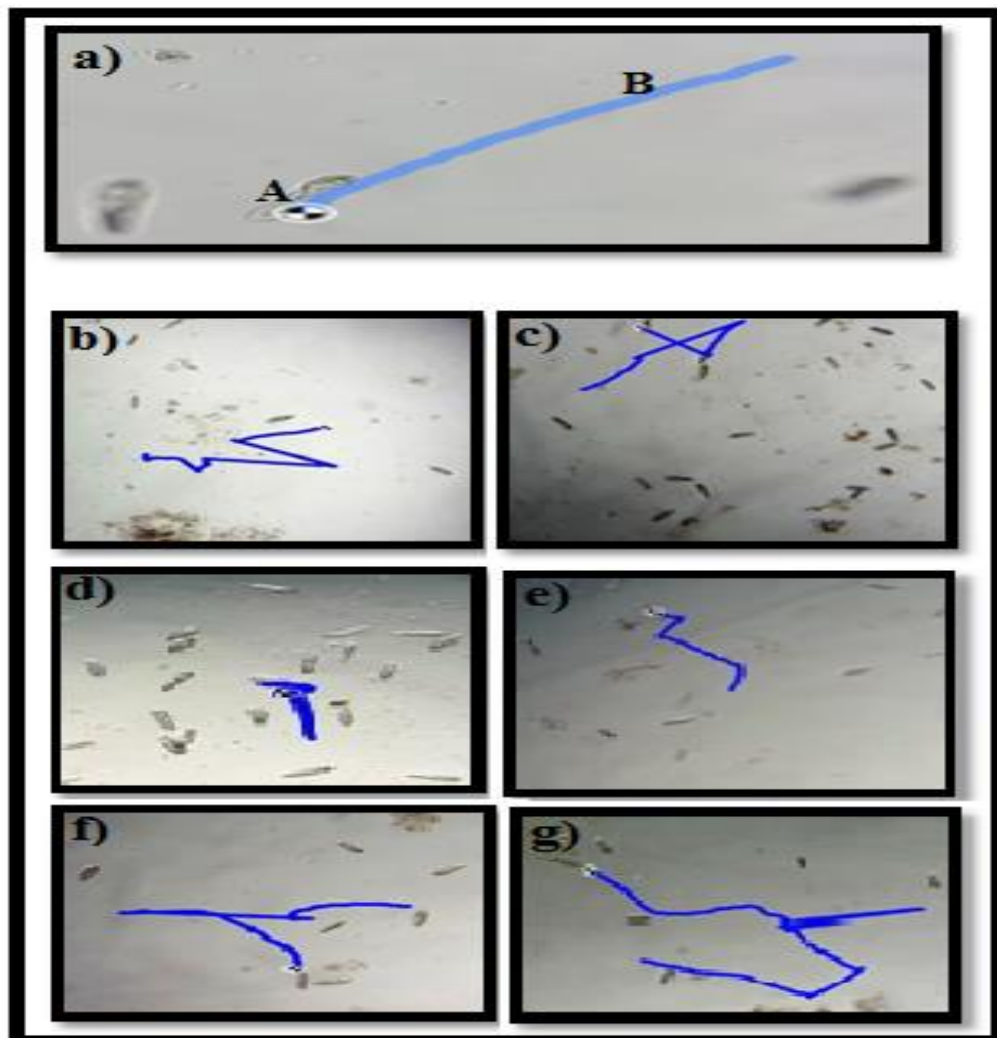


Planche 2 : Effets du glyphosate, AP1 et AP2 à différentes concentrations sur la trajectoire de mouvement de *Paramecium sp.*

La figure (a) illustre la trajectoire linéaire et régulière d'une paramecie témoin, traduisant une motilité normale sans perturbations.

Les figures (b et c) montrent les effets des traitements à faibles concentrations (AP1 30 mM et AP2 40 mM). Ces conditions entraînent des perturbations modérées des

trajectoires, traduites par des zigzags et des changements de direction bien que la motilité reste fonctionnelle.

Les figures (d et e), correspondant au glyphosate (0,66 mM), montrent des effets sur la motilité des paramécies. La figure (d) met en évidence des trajectoires courtes et désorganisées, traduisant une forte perturbation des mouvements. La figure (e) illustre une désorganisation encore plus marquée, avec une perte quasi totale de la motilité. Ces observations reflètent une toxicité sévère, altérant les mécanismes responsables du déplacement cellulaire.

# **Chapitre IV: Discussion et Conclusion**

La dégradation de la qualité des milieux environnementaux et la contamination croissante par des micropolluants organophosphorés représentent aujourd'hui un enjeu scientifique et sanitaire majeur à l'échelle internationale (Briffa, 2020 ; Tudi, 2021). Dans ce contexte, notre étude a porté sur l'évaluation de la toxicité de deux amidophosphonates nouvellement synthétisés (AP1 et AP2), en référence au glyphosate, utilisé ici comme témoin positif.

Afin d'appréhender les effets potentiels de ces composés, plusieurs paramètres physiologiques, biochimiques et morphologiques ont été analysés à l'aide de deux modèles biologiques alternatifs, *Paramecium sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces organismes eucaryotes unicellulaires sont largement reconnus pour leur sensibilité aux xénobiotiques et leur pertinence dans les bioessais de toxicité, offrant ainsi une approche fiable pour l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans le stress oxydatif et la perturbation du métabolisme énergétique.

Les protozoaires ciliés *Paramecium sp.* constituent un modèle précieux en écotoxicologie, notamment en raison de leur facilité de culture, de leur faible coût et de leur cycle de vie court, permettant ainsi des expérimentations rapides en laboratoire (Sauvant, 1999). De plus, leur structure ciliée, comparable à celle des cellules épithéliales des mammifères, les rend particulièrement adaptés à l'étude des mécanismes de toxicité à l'échelle cellulaire (Yano, 2015). En parallèle, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée en biologie cellulaire et moléculaire en raison de sa simplicité de culture, de son faible coût, ainsi que de sa biologie d'eucaryote simple, qui en fait un modèle pertinent pour explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité (Duina et al., 2014).

Dans ce travail, les effets toxiques des composés AP1, AP2 et du glyphosate ont été évalués, entre autres, par le calcul de la concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>), ce qui a permis de déterminer les concentrations de travail appropriées pour les deux modèles biologiques. Les valeurs de CI<sub>50</sub> obtenues pour *Paramecium sp.* se sont révélées cohérentes avec celles rapportées dans la littérature pour d'autres amidophosphonates synthétisés (Saib et al., 2014).

Les concentrations retenues pour les essais de toxicité ont été choisies sur la base des valeurs de  $CI_{50}$  déterminées expérimentalement, en cohérence avec les données antérieurement rapportées dans la littérature pour des composés de même nature (Saib et al., 2014 ; Azzouz et al., 2011). Ces concentrations correspondent à des niveaux permettant de mettre en évidence des réponses biologiques mesurables sans induire de mortalité massive. Il est à noter que les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues pour le glyphosate se sont révélées significativement plus faibles que celles des amidophosphonates AP1 et AP2, confirmant une toxicité plus marquée du glyphosate, en accord avec les observations de Singh et al. (2020).

Nos résultats montrent que l'exposition aux trois xénobiotiques entraîne une inhibition significative de la croissance cellulaire chez les deux organismes étudiés. Cette inhibition se traduit par une diminution du nombre de cellules, un allongement du temps de génération et un ralentissement de la vitesse de prolifération. Ces observations concordent avec celles de Singh et al. (2020), qui ont également rapporté une inhibition de la croissance cellulaire en présence de glyphosate chez des cultures de levure. Il est bien établi que la croissance cellulaire est sensible aux composés toxiques susceptibles de perturber des fonctions vitales telles que le cycle cellulaire, le métabolisme énergétique ou encore la synthèse protéique (Amanchi et Hussain, 2010). Cette perturbation globale pourrait être le reflet d'une altération du processus de division cellulaire, ainsi que de l'activation de mécanismes de mort cellulaire, comme cela a été décrit précédemment (Amanchi et Hussain, 2010).

Par ailleurs, la comparaison entre les deux modèles biologiques met en évidence une sensibilité plus marquée de *Paramecium sp.* aux xénobiotiques testés, par rapport à *Saccharomyces cerevisiae*. Les concentrations efficaces utilisées chez la paramécie se situent dans un intervalle nettement plus faible que celles requises pour induire des effets comparables chez la levure, ce qui traduit une résistance métabolique plus importante chez cette dernière. Cette différence peut être attribuée à la robustesse structurelle et aux capacités de détoxification mieux développées de *S. cerevisiae*, comme l'ont rapporté Khebbab (2015) dans ses travaux comparatifs sur la sensibilité différentielle des modèles eucaryotes unicellulaires

En complément, l'étude polarographique a mis en évidence une perturbation marquée de l'activité respiratoire chez les deux organismes exposés aux trois substances testées. Cette diminution suggère une perturbation du métabolisme énergétique, phénomène fréquemment observé lors d'un stress toxique affectant les fonctions cellulaires fondamentales. Le métabolisme respiratoire constitue en effet un indicateur pertinent du fonctionnement mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae* ou du métabolisme respiratoire équivalent chez *Paramecium sp.* (Haubenstricker et al., 1990). L'altération observée pourrait être imputée à une perturbation de la chaîne de transport des électrons, élément clé de la respiration cellulaire aérobie. Elle pourrait également résulter d'une inhibition, partielle ou complète, des enzymes impliquées dans la production d'ATP, notamment des ATPases mitochondriales. Ce dysfonctionnement mitochondrial pourrait par ailleurs être favorisé par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), phénomènes fréquemment associés à l'exposition à des composés de type organophosphoré, comme le glyphosate (Benedetti et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère une activation marquée du stress oxydatif en réponse à l'exposition aux différentes molécules, en particulier au glyphosate. Afin de mieux comprendre les mécanismes de défense mis en place par les cellules, une attention particulière a été portée sur les enzymes antioxydantes clés.

La superoxyde dismutase (SOD) constitue une enzyme majeure de la première ligne de défense cellulaire contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), une espèce réactive générée notamment au cours du métabolisme mitochondrial, en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en dioxygène (Fridovich, 1995). L'activation de cette enzyme représente ainsi un indicateur précoce de la réponse cellulaire face à une accumulation de ROS (Ighodaro et Akinloye, 2018). Dans notre étude, une induction significative de l'activité de la SOD a été observée aussi bien chez la paramécie que chez les levures après exposition aux molécules testées, notamment chez les organismes exposés au glyphosate. Cette élévation de l'activité enzymatique traduit vraisemblablement une surproduction de radicaux superoxyde induite par les xénobiotiques, soulignant le rôle protecteur de la SOD dans le maintien de l'homéostasie redox. Ces observations rejoignent les résultats obtenus par Djekoun (2012) et Melegari et al. (2013), qui ont mis en évidence une induction similaire de la SOD chez divers organismes aquatiques, tels que *Paramecium* ou *Chlamydomonas reinhardtii*, exposés à des polluants comme les pesticides ou les nanoparticules métalliques.

Le peroxyde d'hydrogène produit par l'action de la SOD est ensuite pris en charge par une seconde ligne de défense enzymatique, qui comprend notamment les catalases (CAT), les peroxyrédoxines et les peroxydases telles que la glutathion peroxydase (GPx) ou l'ascorbate peroxydase (APX). Parmi ces enzymes, la catalase joue un rôle central en décomposant rapidement le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en dioxygène, sans nécessité de cofacteur ni formation de radicaux libres intermédiaires (Deby, 2009). Dans nos conditions expérimentales, une augmentation de l'activité catalase a été constatée chez les deux modèles alternatifs, avec une intensité plus prononcée chez les organismes exposés au glyphosate. Cette induction enzymatique confirme la mise en place d'une réponse antioxydante adaptative face à une accumulation excessive de peroxyde d'hydrogène. Ces résultats sont en accord avec la littérature, qui reconnaît l'activité de la catalase comme un biomarqueur fiable du stress oxydatif engendré par des contaminants environnementaux (Vlahogianni et al., 2007 ; Ellis et al., 2020)

En parallèle, l'activité de la Glutathion-S-Transférase (GST), enzyme de phase II impliquée dans la conjugaison des xénobiotiques électrophiles et la neutralisation des produits issus de l'oxydation cellulaire (Oost et al., 2003), a présenté une modulation dépendante à la fois de l'espèce modèle et de la concentration des composés testés. Chez *Paramecium sp.*, une inhibition progressive de l'activité de la GST a été observée avec l'augmentation des doses, traduisant un possible épuisement du système de défense enzymatique ou une inhibition directe de l'activité catalytique. Ce type de réponse a déjà été rapporté chez certains protozoaires exposés à des stress chimiques sévères (Wang et al., 2018). En revanche, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité de la GST a montré un profil biphasique, caractérisé par une légère induction aux faibles concentrations, suivie d'une inhibition aux doses plus élevées. Cette dynamique traduit probablement une activation transitoire du système antioxydant dans un but adaptatif, suivie d'une saturation enzymatique ou d'une altération structurale liée à la toxicité accrue des composés.

Enfin, le glutathion réduit (GSH), molécule thiolée essentielle dans le maintien de l'équilibre redox et la détoxification intracellulaire, a montré des variations cohérentes avec celles observées pour la SOD, la catalase et la GST. Chez *Paramecium sp.*, la diminution progressive des niveaux de GSH en fonction des concentrations testées, particulièrement marquée en présence de glyphosate, suggère une mobilisation accrue de

ce tripeptide pour la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène et la conjugaison des métabolites toxiques via la GST.

Cette déplétion traduit probablement un déséquilibre du système antioxydant, où la consommation du GSH excède sa régénération, comme l'ont déjà rapporté Masella et al. (2005) et Stajn et al. (2007) lors d'expositions à des stress oxydatifs soutenus. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le profil observé est différent, avec une augmentation modérée du GSH aux faibles doses suivie d'une diminution aux concentrations élevées. Cette réponse biphasique évoque une induction initiale de la biosynthèse du glutathion dans le cadre d'un mécanisme adaptatif, avant un épuisement progressif des réserves lorsque le stress devient trop intense.

Ce comportement adaptatif a été décrit par Wysocki et al. (2001) et Melegari et al. (2013) chez des levures exposées à des herbicides ou à des métaux lourds, suggérant une phase transitoire de compensation antioxydante suivie d'un effondrement fonctionnel lié à l'accumulation de dommages oxydatifs.

À l'échelle cellulaire et morphologique, l'exposition au glyphosate, à AP1 et AP2 induit des perturbations marquées chez la paramécie, notamment des modifications du mouvement, une altération de la trajectoire de déplacement ainsi qu'un stress ciliaire observable au microscope optique. Ces anomalies sont susceptibles d'être liées à des atteintes des structures cytosquelettiques ou des membranes plasmiques, affectant ainsi la motilité et l'orientation de l'organisme. Ce type de perturbation a également été rapporté par Yano et al. (2015), qui ont observé des modifications du comportement locomoteur chez des ciliés exposés à divers xénobiotiques.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent une toxicité marquée du glyphosate par rapport aux molécules AP1 et AP2, avec une activation notable du stress oxydatif chez *Paramecium sp.* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ces observations soulignent l'importance des modèles alternatifs pour l'évaluation de la toxicité. La suite de l'étude *in silico* viendra enrichir ces résultats en explorant les interactions moléculaires des composés testés.

**Partie 2 :**  
**Étude *in silico***

## 1. Généralités

L'étude *in silico* regroupe un ensemble de techniques informatiques permettant de modéliser et de prédire l'interaction des molécules chimiques avec des cibles biologiques, contribuant ainsi à l'analyse et à l'évaluation des risques toxicologiques. Ces méthodes, alternatives aux tests *in vivo*, sont plus rapides, moins coûteuses et respectent les principes éthiques des 3Rs (Remplacer, Réduire, Raffiner) (Russell & Burch, 1959).

L'importance de ces approches a été démontrée par de nombreuses recherches, notamment celle de Bouaricha (2013), ainsi que par les travaux de Enoch et al. (2011) et de Raies & Bajic (2016), qui ont montré comment les modèles *in silico* permettent de prédire la toxicité des produits chimiques et de compléter l'évaluation des risques.

Plus récemment, Farfar et al. (2022) ont mis en évidence, à travers une approche *in silico* appliquée à des mélanges chimiques complexes, le potentiel de ces méthodes pour anticiper les effets toxiques sur les biomarqueurs du stress oxydatif. Ces exemples illustrent le rôle central des approches *in silico* dans la compréhension des mécanismes de toxicité et la régulation des substances chimiques.

Pour notre étude, nous avons sélectionné plusieurs protéines clés : l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), la superoxyde dismutase (SOD) et le cytochrome P450 (CYP450). Chacune de ces protéines joue un rôle critique dans des processus biologiques spécifiques. L'EPSP synthase est essentielle dans la voie du shikimate, cruciale pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques, tandis que la SOD est impliquée dans la défense contre le stress oxydatif et le CYP450 dans le métabolisme des xénobiotiques.

Les principales techniques *in silico* incluent :

- **Modélisation quantitative de la relation structure-activité (QSAR)** : Cette approche établit des relations entre la structure chimique des composés et leur activité biologique. Elle permet de prédire la toxicité des nouvelles molécules sur la base de données existantes (Cherkasov et al., 2014).

- **Dynamique moléculaire (MD)** : Cette méthode simule les mouvements et les interactions des atomes et des molécules au fil du temps, offrant une compréhension approfondie de la flexibilité et de la stabilité des complexes ligand-protéine (Hollingsworth & Dror, 2018). Cette technique est particulièrement utile pour visualiser les changements structuraux dynamiques et évaluer la robustesse des interactions.
- **Criblage virtuel** : Utilisé pour filtrer un grand nombre de composés, le criblage virtuel permet d'identifier rapidement ceux qui pourraient avoir une activité biologique potentielle. Par exemple, les travaux de Sliwoski et al. (2014) ont montré comment le criblage virtuel peut être utilisé pour évaluer le potentiel toxique de produits chimiques environnementaux.
- **Analyse de docking moléculaire** : Bien qu'elle fasse partie des techniques de criblage virtuel, le docking moléculaire se distingue par sa capacité à prédire la meilleure configuration possible d'un ligand dans le site actif d'une protéine, ainsi que l'énergie associée à cette interaction (Trott & Olson, 2010). Il est couramment utilisé pour analyser l'affinité de liaison des molécules et fournir des pistes sur leur activité biologique potentielle.

## 2. Définition du docking

Le docking moléculaire est une technique informatisée qui simule l'interaction entre un ligand (généralement une petite molécule) et une protéine cible afin de déterminer les modes de liaison possibles. Cette méthode permet de calculer les orientations et positions optimales du ligand dans le site de liaison de la protéine, ainsi que l'affinité de cette interaction.

Les applications du docking sont nombreuses et couvrent des domaines tels que le développement de médicaments, où il est employé pour identifier des candidats potentiels à de nouveaux traitements, et la toxicologie environnementale, où il sert à évaluer comment des polluants, tels que les pesticides, se lient aux protéines et perturbent leur fonction (Meng et al., 2011).

L'interaction du glyphosate avec l'enzyme EPSP synthase, par exemple, a été étudiée afin de prévoir son impact inhibiteur et ses conséquences potentielles sur des voies biologiques essentielles (Steinrücken & Amrhein, 1980).

### 3. Techniques et applications du docking moléculaire

Le docking moléculaire constitue un outil clé parmi les méthodes *in silico*, utilisé pour prédire la manière dont une molécule (ligand) interagit avec une protéine cible. Ce processus implique la modélisation des positions et orientations possibles du ligand dans le site actif de la protéine, ainsi que l'évaluation de l'énergie de liaison. Ces prédictions sont fondamentales pour comprendre les mécanismes de toxicité et pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques ou pesticides (Morris et al., 2009; Forli et al., 2016; Pagadala et al., 2017).

En toxicologie environnementale, cette approche permet de modéliser les interactions entre des polluants comme le glyphosate et des enzymes cibles telles que l'EPSP synthase, mettant en évidence les mécanismes d'inhibition susceptibles d'affecter des voies biologiques cruciales (Caetano et al., 2009).

### 4. Impact environnemental et réglementaire

Les méthodes *in silico* jouent un rôle de plus en plus crucial dans la réglementation des substances chimiques. L'Union européenne, à travers l'initiative REACH (Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals), encourage l'utilisation de ces techniques pour réduire les tests sur animaux. Cela permet non seulement d'accélérer l'évaluation de la sécurité chimique, mais aussi de répondre aux exigences éthiques et réglementaires croissantes. En intégrant les résultats des études *in silico*, les régulateurs peuvent adopter des approches de gestion des risques plus informées et proactives (Modi et al., 2012).

## 5. Les outils du *docking* moléculaire

Les outils de *docking* moléculaire comprennent des logiciels informatiques conçus pour prédire et analyser les interactions entre une protéine cible (récepteur) et un ligand (petite molécule) (Morris et al., 2009).

### 5.1. Le récepteur

Les structures protéiques utilisées comme récepteurs dans le *docking* moléculaire sont principalement extraites de la Protein Data Bank (PDB), qui constitue la principale source de données dans ce domaine. La PDB offre des informations structurales tridimensionnelles sur des macromolécules telles que les protéines, l'ADN et l'ARN. Ces structures sont obtenues par des méthodes comme la cristallographie aux rayons X et la RMN, permettant ainsi une compréhension approfondie des fonctions biologiques et médicales des macromolécules (Berman et al., 2000).

### 5.2. Le ligand

Le choix du ligand est crucial dans le processus de *docking* moléculaire, en raison de la spécificité requise par le site actif de la cible. Les structures 3D des ligands peuvent être obtenues de deux manières :

- **Conception de ligands** : Dessiner, optimiser et sauvegarder la structure d'un ligand à partir de données de la littérature en utilisant des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, MarvinSketch ou ChemSketch. Les ligands créés peuvent être sauvegardés dans divers formats (pdb, mol2, etc.).
- **Consultation de chimiothèques** : Utiliser des banques de données de ligands, qui fournissent un large éventail de structures 3D de ligands prêtes pour le *docking*, comme PubChem, Zinc, ou Chempidier.

### 5.3. Les logiciels

Les logiciels de *docking* moléculaire, tels qu'AutoDock, AutoDock Vina, et Glide, sont essentiels pour la simulation des interactions protéine-ligand. Ces outils varient en termes de précision, de rapidité, et de flexibilité, offrant des solutions adaptées à différentes échelles de projets (Trott & Olson, 2010; Halgren et al., 2004). Récemment, des avancées technologiques ont permis l'intégration de l'intelligence artificielle pour améliorer encore la précision et l'efficacité de ces simulations.

La figure (19) illustre les principales étapes du docking moléculaire. Le processus commence par la représentation des structures, suivie d'une recherche conformationnelle qui peut être rigide (rotation, translation) ou flexible (ajustement des résidus, chaînes carbonées et domaines). Un minimiseur évalue ensuite les scores énergétiques afin d'identifier les conformations les plus stables. Les poses générées sont regroupées, classées et sélectionnées à l'aide d'un re-scoring et de données expérimentales. Enfin, une phase d'affinement, combinant minimisation d'énergie et dynamique moléculaire, permet d'optimiser la stabilité du complexe formé.

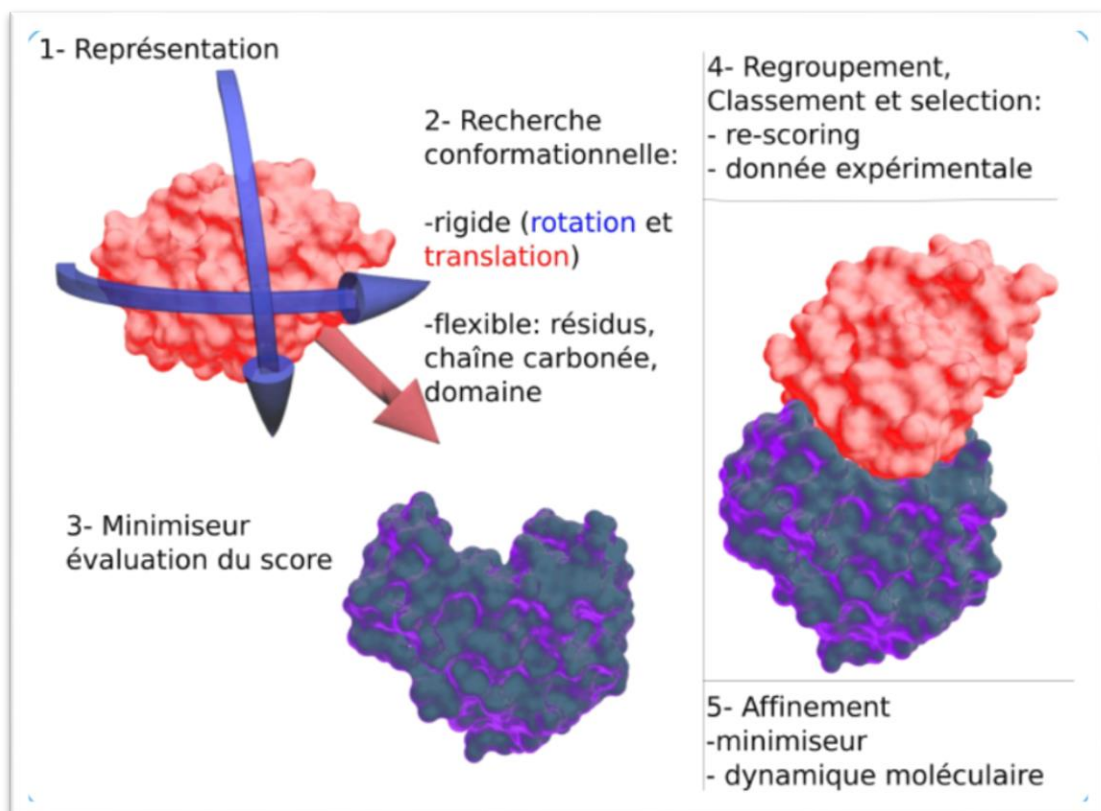


Figure 19 : Schéma du protocole général de docking moléculaire. (Eweas, 2014)

#### 5.4. Les interactions protéine-ligand

Les interactions entre une protéine et un ligand sont au cœur de la reconnaissance moléculaire en biochimie et en pharmacologie. Ces interactions impliquent la rencontre de sites spécifiques sur la protéine (récepteur) et le ligand, formant un schéma complexe de reconnaissance. L'énergie de cette interaction est influencée par le nombre et la nature des points d'interaction entre les deux entités.

Voici les principaux types d'interactions impliquées :

- **Forces de Van der Waals** : Interactions électrostatiques faibles entre les molécules, influençant la stabilité du complexe protéine-ligand (Kollman, 1993).
- **Liaisons hydrogènes** : Interactions clés où un donneur de proton et un accepteur forment un pont stabilisant l'interaction entre le ligand et sa cible (Jeffrey et al., 1994).
- **Interactions ioniques** : Se produisent entre des groupes chargés opposés sur le ligand et la protéine, contribuant fortement à la spécificité et à la force de l'interaction (Janin, 1995).
- **Interactions hydrophobes** : Les parties non polaires du ligand et de la protéine se regroupent, minimisant leur exposition à l'environnement aqueux, stabilisant ainsi la conformation du complexe (Dill, 1990).

Ces interactions sont essentielles pour la formation du complexe protéine-ligand et jouent un rôle fondamental dans des fonctions biologiques telles que l'activation ou l'inhibition d'enzymes et la signalisation cellulaire.

#### 5.5. Le score

La fonction de score en *docking* moléculaire est une métrique clé qui quantifie l'affinité d'un ligand pour un récepteur spécifique. Cette valeur est une approximation de l'énergie libre de liaison qui se manifeste lors de la transition du complexe protéine-ligand de son état dissocié à son état associé. Elle intègre les contributions énergétiques et entropiques impliquées dans la formation du complexe (Halgren, 2009).

## 6. Méthodes complémentaires

En plus du *docking* moléculaire, des techniques telles que la dynamique moléculaire et les simulations Monte Carlo sont utilisées pour affiner les prédictions. Ces méthodes permettent d'explorer la flexibilité des protéines et des ligands en conditions dynamiques, offrant une vision plus complète des interactions (Shirts & Pande, 2000).

## 7. Sélection et justification du choix de la protéine pour l'étude *in Silico*

### 7.1. Cytochrome P450 (CYP450)

Le choix des enzymes CYP450 pour l'étude de *docking* moléculaire est motivé par leur rôle central dans le métabolisme des xénobiotiques, y compris les micropolluants environnementaux. Les enzymes CYP450 catalysent des réactions d'oxydation essentielles pour la biotransformation et l'élimination des substances toxiques, augmentant leur solubilité et facilitant leur excrétion (Guengerich, 2008). Ces enzymes sont également impliquées dans la bioactivation de certains xénobiotiques, générant des métabolites réactifs pouvant causer des effets toxiques (Nelson et al., 1996).

Dans le cadre de l'évaluation comparative de la toxicité des nouvelles molécules AP1 et AP2 par rapport au glyphosate, l'étude des interactions de ces composés avec les enzymes CYP450 est indispensable. Les simulations de *docking* permettent de prédire les sites de liaison des ligands, d'évaluer les énergies de liaison, et d'identifier les interactions moléculaires clés (Trott et Olson, 2010). En intégrant les CYP450 dans notre étude *in silico*, nous obtenons une vision approfondie de la toxicité potentielle des composés testés, essentielle pour évaluer leur impact environnemental et toxicologique.

### 7.2. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP)

Le choix de l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase) pour l'étude de *docking* est motivé par son rôle essentiel dans la voie du shikimate, présente dans les plantes, les bactéries et certains micro-organismes, mais absente chez les animaux. Cette enzyme catalyse la conversion du shikimate-3-phosphate en 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate, une étape clé dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Haslam, 1993).

L'inhibition de l'EPSP synthase bloque cette voie métabolique, conduisant à la mort des plantes et de certains micro-organismes (Steinrücken & Amrhein, 1980). En étudiant les interactions de l'EPSP synthase avec les nouvelles molécules AP1 et AP2, nous pouvons évaluer leur potentiel inhibiteur par rapport au glyphosate. Les simulations de docking moléculaire permettent de prédire les sites de liaison des ligands sur l'enzyme, d'évaluer les énergies de liaison et d'identifier les interactions moléculaires critiques (Trott & Olson, 2010). Cette analyse est essentielle pour comprendre l'efficacité et la spécificité des nouveaux composés en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'EPSP synthase.

En résumé, l'intégration de l'EPSP synthase dans notre étude *in silico* nous permet de comparer directement l'efficacité des nouvelles molécules AP1 et AP2 avec celle du glyphosate, offrant ainsi des perspectives précieuses pour le développement de nouveaux herbicides ou agents antimicrobiens.

### 7.3. Superoxyde dismutase (SOD)

Le choix de la superoxyde dismutase (SOD) pour l'étude de *docking* moléculaire est motivé par son rôle central dans la défense antioxydante des cellules. La SOD est une enzyme clé qui catalyse la dismutation du radical superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, constituant ainsi la première ligne de défense contre les dommages oxydatifs (Fridovich, 1995). Les radicaux superoxydes sont des sous-produits toxiques du métabolisme cellulaire, et leur accumulation peut entraîner des dommages cellulaires et une inflammation, contribuant à diverses pathologies, y compris les maladies neurodégénératives et le cancer (McCord & Fridovich, 1969).

En évaluant les interactions des nouvelles molécules AP1 et AP2 avec la SOD, notre objectif est de comprendre leur impact potentiel sur le stress oxydatif et leur capacité à moduler l'activité antioxydante. Les simulations de *docking* moléculaire permettent de prédire les sites de liaison des ligands sur l'enzyme, d'évaluer les énergies de liaison, et d'identifier les interactions moléculaires clés (Trott & Olson, 2010). Cette approche est particulièrement utile pour déterminer si les nouvelles molécules peuvent interférer avec la fonction de la SOD, soit en inhibant son activité, soit en stabilisant son action, ce qui pourrait avoir des implications significatives pour leur toxicité et leur potentiel thérapeutique.

L'intégration de la SOD dans notre étude *in silico* est donc essentielle pour une évaluation complète des effets antioxydants des nouvelles molécules AP1 et AP2, en les comparant au glyphosate, et pour comprendre leur impact potentiel sur le stress oxydatif au niveau cellulaire.

# **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

## 1. Matériel et Méthodes

Cette section décrit les ligands et les protéines étudiés, accompagnés de leurs structures 3D et des informations pertinentes pour l'analyse *in silico*.

### 1.1. Matériel chimique

#### 1.1.1. Ligands étudiés

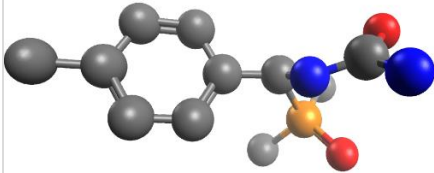
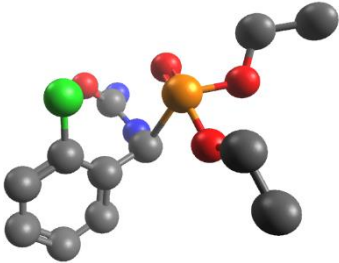
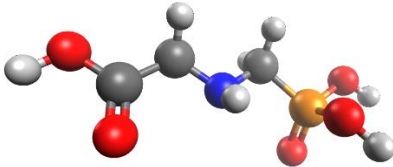

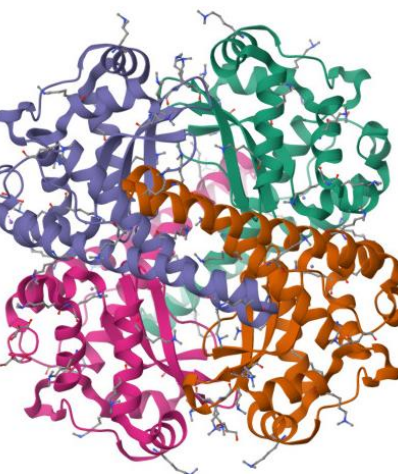
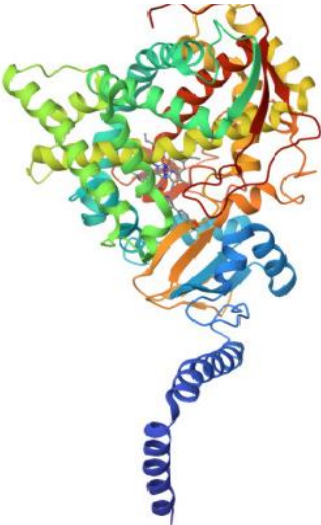
Nom du ligand	Structure 3D	Propriétés chimiques	Source
AP1		Formule: $C_{12}H_{18}ClN_2O_4P$  Poids moléculaire : 320.71g/mol	Créé avec ChemDraw ; Visualisé avec Avogadro
AP2		Formule : $C_{11}H_{17}N_2O_2P$  Poids moléculaire : 240.24 g/mol	Crée avec ChemDraw ; Visualisé avec Avogadro
Glyphosate		Formule : $C_3H_8NO_5P$  Poids moléculaire : 169.07g/mol	PubChem (structure) ; Avogadro (visualisation)

Tableau 10 : Caractéristiques des ligands étudiés

## 1.1.2. Protéines cible

Tableau 11 : Caractéristiques des protéines cibles

Nom de la protéine	Structure 3D	Identifiant PDB	Propriétés (PDB)
EPSP synthase		5BUF	Résolution : 2,37 Å Poids total : 96,83 kDa Nombre de résidus modélisés : 890 Nombre d'atomes : 6 999 Nombre de chaînes protéiques uniques : 1
SOD		3LSU	Résolution : 1,90 Å Poids total : 94,77 kDa Nombre de résidus : 826 Nombre d'atomes : 7 111 Nombre de chaînes protéiques uniques : 1

CYP450		7RYX	Résolution : 2.10 Å Poids total : 62,6 kDa Nombre de résidus : 528 Nombre d'atomes : 4 391 Nombre de chaînes protéiques uniques : 1
--------	---	------	--

## 1.2. Logiciels utilisés

- **SWISS ADME** : Cet outil bio-informatique est employé pour caractériser les propriétés physico-chimiques et ADME des composés étudiés, permettant ainsi une évaluation approfondie de leur profil pharmacocinétique et de leur comportement potentiel dans un contexte biologique.
- **Swiss Target Prediction** : Plateforme bio-informatique permettant de prédire les cibles biologiques potentielles de petites molécules en fonction des similarités structurales. Cet outil a été utilisé pour identifier les cibles potentielles des molécules AP1 et AP2 en toxicologie environnementale.
- **AutoDock Vina** : Logiciel de *docking* moléculaire utilisé pour simuler les interactions entre les molécules testées (AP1, AP2 et glyphosate) et les enzymes cibles (EPSP synthase, SOD et CYP). AutoDock Vina a permis de modéliser les modes d'interaction et de calculer l'affinité des ligands pour ces enzymes.
- **Avogadro** : Logiciel de visualisation et d'édition de structures moléculaires en 3D. Avogadro a été utilisé pour préparer et visualiser les structures initiales des molécules AP1, AP2 et glyphosate avant le docking moléculaire.
- **Discovery Studio Visualizer** : Logiciel de visualisation moléculaire permettant d'analyser les interactions ligand-protéine en 2D et 3D. Discovery Studio Visualizer est employé pour visualiser et interpréter les interactions après le docking, mettant en évidence les liaisons et les interactions clés entre les molécules et les enzymes cibles.

- **PubChem** : Base de données publique de structures chimiques, utilisée pour récupérer la structure moléculaire du glyphosate.
- **ChemDraw** : Logiciel de dessin moléculaire utilisé pour créer les structures 2D des molécules AP1 et AP2 avant leur conversion en 3D.
- **Protein Data Bank (PDB)** : Base de données de structures protéiques, employée pour obtenir les données des enzymes cibles (EPSP synthase, SOD, CYP) nécessaires aux analyses de docking moléculaire.

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation des protéines

La préparation des protéines pour le processus de *docking* moléculaire est réalisée suivant un protocole méthodique, garantissant des résultats précis et fiables. Les protéines étudiées incluent la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), la superoxyde dismutase (SOD) et le cytochrome P450 (CYP).

#### 2.1.1. Téléchargement et visualisation

Les structures cristallines des protéines sont téléchargées depuis la base de données Protein Data Bank (PDB) avec les identifiants suivants : EPSP synthase (PDB ID 5BUF), SOD (PDB 3LSU ID ), et CYP (PDB ID 7RYX) (Berman et al., 2000). La visualisation et la préparation des structures pour les étapes de *docking* moléculaire sont réalisées à l'aide de Discovery Studio Visualizer, permettant de vérifier l'intégrité des structures et d'optimiser leur géométrie pour l'analyse.

#### 2.1.2. Traitement initial

Pour chaque protéine, les hétéroatomes non essentiels (Hetatms) sont supprimés afin de ne conserver que les chaînes principales. Cette étape est essentielle pour éliminer les molécules non pertinentes qui pourraient interférer avec le processus de *docking*. La préparation est également complétée par l'ajout de protons manquants et la minimisation de l'énergie de la structure pour optimiser la conformité des sites actifs des protéines.

Chaque protéine est analysée individuellement afin de vérifier l'intégrité de sa structure et de garantir que les conditions préalables à l'étude des interactions ligand-

protéine soient remplies. Ces préparations assurent que les simulations de docking moléculaire produisent des résultats précis et *pertinents*.

### 2.1.3. Optimisation des liaisons hydrogène

Une optimisation des liaisons hydrogène est effectuée pour chaque protéine, incluant l'ajout d'hydrogènes manquants aux atomes des résidus latéraux et des boucles. Cette optimisation améliore la précision des simulations des interactions moléculaires.

### 2.1.4. Élimination des molécules d'eau

Toutes les molécules d'eau présentes dans les structures cristallines sont supprimées afin d'éviter les interactions non spécifiques lors du docking moléculaire.

### 2.1.5. Conversion et sauvegarde

Les structures optimisées des protéines EPSP synthase, SOD et CYP sont converties et sauvegardées au format PDBQT à l'aide d'AutoDock Tools. Ce format est essentiel pour les simulations de docking moléculaire avec AutoDock Vina, car il permet de définir les états de protonation et d'assigner les charges partielles aux atomes de chaque enzyme. Ces étapes méthodiques garantissent que les structures des protéines EPSP synthase, SOD et CYP sont prêtes pour les simulations de docking, optimisant ainsi la précision et la fiabilité des résultats obtenus.

## 2.2. Préparation des ligands

Les ligands étudiés (AP1, AP2 et glyphosate) sont préparés selon un protocole standard pour les analyses de *docking* moléculaire. Les structures 3D des molécules AP1 sont dessinées et optimisées à l'aide de ChemDraw, tandis que la structure du glyphosate sont récupérée à partir de la base de données PubChem (Kim et al., 2016).

Les molécules sont ensuite soumises à une optimisation géométrique incluant l'ajout des atomes d'hydrogène, la neutralisation des groupes chargés, et l'ajustement des conformations pour minimiser l'énergie interne, garantissant ainsi leur stabilité structurelle.

Les structures optimisées des protéines EPSP synthase, SOD et CYP sont converties et sauvegardées au format PDBQT à l'aide de AutoDock Tools 1.5.6, qui permet l'assignation des charges partielles et la définition des états de protonation nécessaires aux calculs d'interaction (Morris et al., 2009). Ce format est essentiel pour les simulations de docking moléculaire avec AutoDock Vina, garantissant ainsi une compatibilité optimale avec le logiciel et une précision accrue des résultats (Trott & Olson, 2010).

### 3. Le *docking*

Dans le processus de *docking* moléculaire, chaque enzyme cible (EPSP synthase, SOD, et CYP) est placée dans une grille tridimensionnelle centrée sur son site actif, permettant au ligand de se déplacer et de s'orienter librement à l'intérieur de ce site (Forli et al., 2016).

Les paramètres de la grille sont ajustés individuellement pour chaque enzyme comme suit :

**EPSP synthase** : La grille est centrée aux coordonnées  $X = 19.903$ ,  $Y = 13.39$ ,  $Z = 66.994$ , avec un espacement de grille de 0.470.

- **SOD** : La grille est centrée aux coordonnées  $X = 25.123$ ,  $Y = 18.456$ ,  $Z = 72.789$ , avec un espacement de grille de 0.375.
- **CYP** : La grille est centrée aux coordonnées  $X = 14.567$ ,  $Y = 21.234$ ,  $Z = 55.890$ , avec un espacement de grille de 0.400.

Ces grilles personnalisées garantissent une couverture optimale des sites actifs de chaque enzyme, permettant au ligand d'interagir efficacement avec les résidus clés. La sélection virtuelle des orientations et conformations du ligand est réalisée avec **AutoDock Vina**. Les paramètres de chaque grille, y compris les coordonnées centrales et l'espacement, ont été enregistrés dans des fichiers texte, assurant une exécution fluide du processus de docking moléculaire.

#### **4. Analyse des résultats de docking**

Après le processus de *docking*, les résultats sont analysés pour évaluer les interactions entre les ligands et les protéines cibles. Les poses générées sont examinées en fonction de leur énergie de liaison, et les meilleures poses sont sélectionnées pour des analyses plus approfondies (Forli et al., 2016).

#### **5. Visualisation des interactions**

Les complexes ligand-protéine sont visualisés à l'aide de Discovery Studio Visualizer. Des figures sont générées pour illustrer les interactions clés, notamment les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobe (Huey et al., 2012).

#### **6. Validation des résultats**

Les résultats de *docking* sont validés par comparaison avec des données expérimentales.

# **Chapitre III : Résultats**

## 1. Caractéristiques physico-chimiques des molécules étudiées

Le tableau (12) présente une comparaison des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques du glyphosate, d'AP1 et d'AP2. Il en ressort que le glyphosate et AP2 présentent une très bonne solubilité dans l'eau, tandis qu'AP1 est classé comme soluble avec des logP modérés pour AP1 et AP2 et plus faible pour le glyphosate. Tous trois montrent une bonne absorption gastro-intestinale sans traverser la barrière hémato-encéphalique. Glyphosate et AP2 inhibent les protéases, tandis qu'AP1 cible les kinases. Dans l'ensemble, les profils d'AP1 et AP2 suggèrent une meilleure compatibilité biologique comparée au glyphosate.

Tableau 12 : Comparaison des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques du glyphosate, AP1 et AP2

Nom des molécules	Poids moléculaire (g/mol)	Lipophilie (LogP)	Solubilité dans l'eau	Perméabilité BBB	Absorption gastro-intestinale	Inhibiteur d'enzyme
<b>Glyphosate</b>	169.07	2.34	Très soluble	Non	Haute	Oui protéase
<b>AP1</b>	320.71	1.74	Soluble	Non	Haute	Oui Kinase
<b>AP2</b>	240.24	1.07	Très soluble	Non	Haute	Oui Protéase

## 2. Répartition des cibles biologiques du glyphosate, AP1 et AP2 selon Swiss Target Prediction

### 2.1. Répartition des cibles biologiques du glyphosate

Cette figure (20) montre la répartition des cibles biologiques du glyphosate, avec une prédominance des protéases, suivies des récepteurs couplés aux protéines G et des transférases. Ce profil suggère que le glyphosate pourrait influencer des enzymes et des récepteurs impliqués dans des fonctions cellulaires variées.

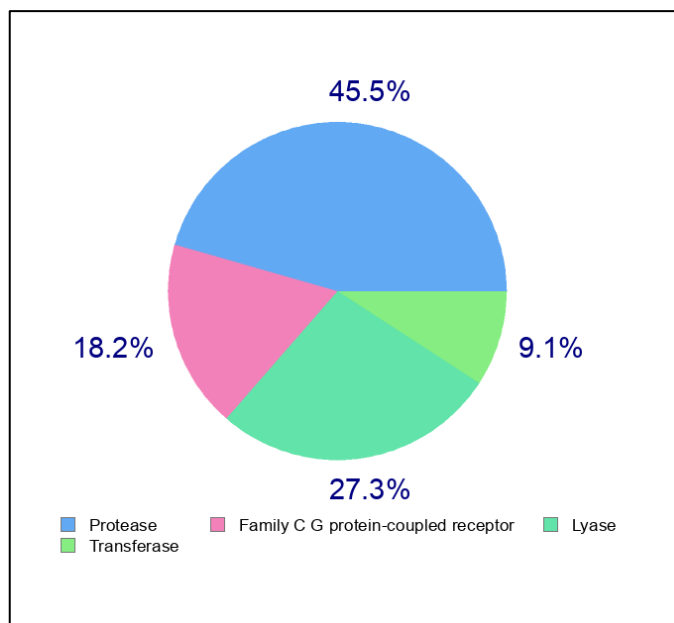


Figure 20: Répartition des cibles biologiques du Glyphosate

## 2.2. Répartition des cibles biologiques pour AP1

La figure 21 illustre les cibles biologiques de la molécule AP1, mettant en évidence une interaction importante avec les kinases, suggérant une influence potentielle sur les voies de signalisation cellulaire. AP1 interagit également avec des récepteurs couplés aux protéines G et des protéines cytosoliques, indiquant une diversité modérée dans ses cibles.

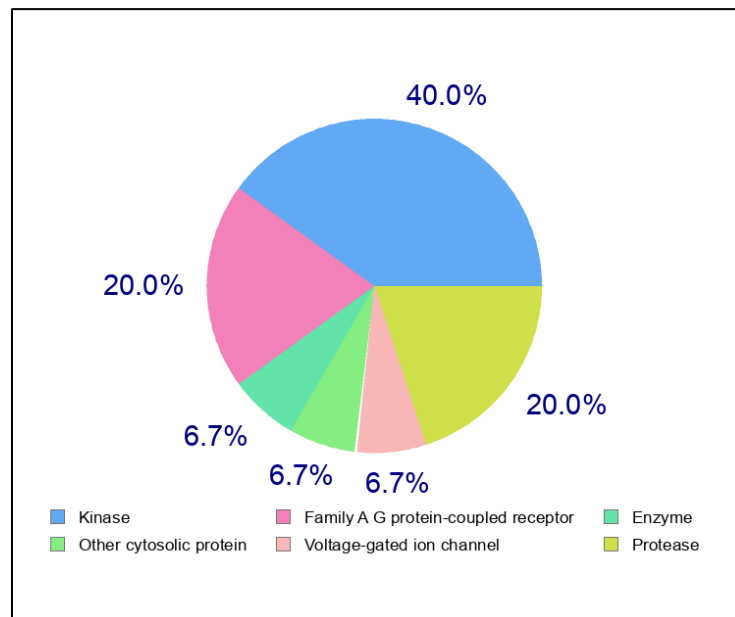


Figure 21: Répartition des cibles biologiques de la molécule AP1

### 2.3. Répartition des cibles biologiques pour AP2

La figure 22 présente les cibles de la molécule AP2, où les protéases occupent une place dominante, suivies des kinases et des récepteurs de la famille G. La distribution des cibles pour AP2 suggère des interactions principalement avec des enzymes et des récepteurs cellulaires, reflétant un profil d'inhibition varié.

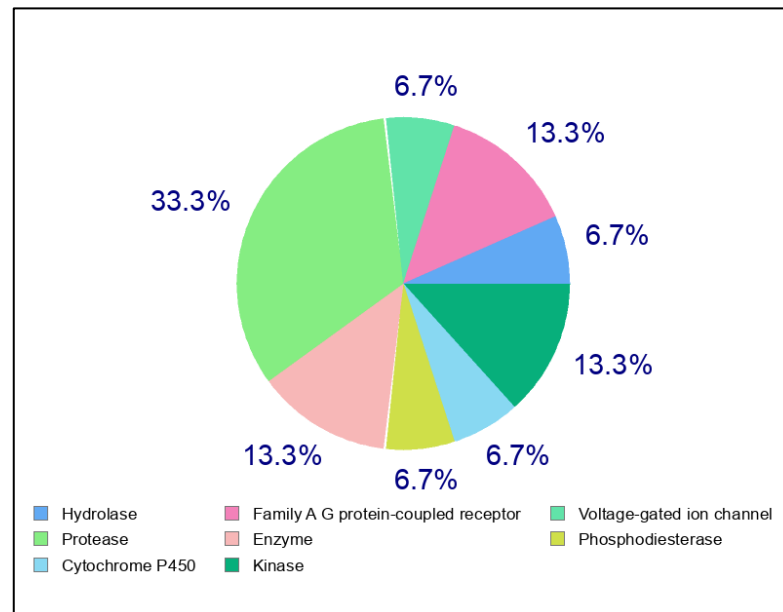


Figure 22: Répartition des cibles biologiques de la molécule AP2

### 3. Interaction du glyphosate, AP1 et AP2 avec l'EPSP synthase, la SOD et le CYP

#### 3.1. Interactions du Glyphosate, AP1 et AP2 avec l'EPSP Synthase

##### 3.1.1. Complexe glyphosate – EPSP synthase

La figure 23 illustre les interactions principales entre le glyphosate et les résidus du site actif de l'EPSP synthase. Le glyphosate est stabilisé par plusieurs liaisons hydrogène impliquant des résidus clés tels que Lys657, Arg339, Ser335, et Thr507. Ces interactions permettent une fixation stable du glyphosate dans la cavité enzymatique, suggérant une forte affinité pour l'enzyme. La disposition des résidus autour du ligand reflète une complémentarité électrostatique et géométrique, essentielle pour l'inhibition de l'activité de l'enzyme.

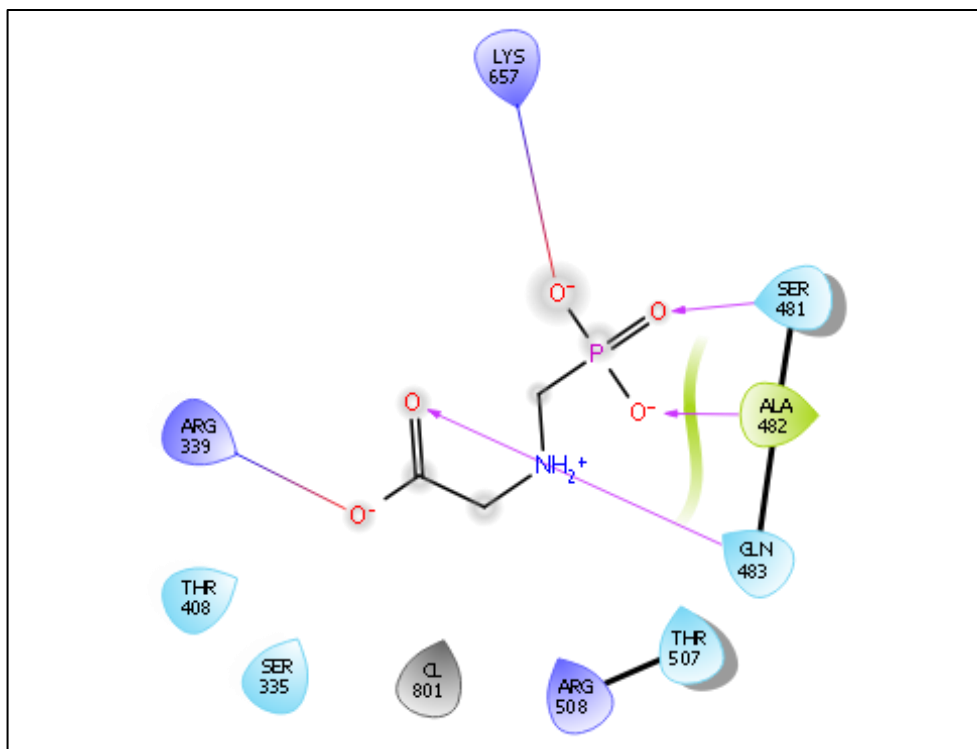


Figure 23 : Interactions moléculaire entre le glyphosate et l'EPSP synthase.

### 3.1.2. Complexe AP1 – EPSP synthase

La figure (28) illustre les interactions entre AP1 et le site actif de l'EPSP synthase en deux dimensions. Plusieurs résidus clés, tels que Lys657, Ser481, Ala482, et Gln483, participent à la stabilisation de AP1 dans la cavité enzymatique via des liaisons hydrogène. Ces interactions permettent un ancrage stable du ligand, suggérant une forte affinité entre AP1 et l'enzyme.

Les résidus Ser481 et Ala482 forment des liaisons hydrogène directes avec le groupe fonctionnel de AP1, contribuant à l'ancrage de la molécule. De plus, Lys657 interagit avec la structure principale de AP1, indiquant une participation importante à la fixation du ligand. Le résidu Thr507, situé à proximité, apporte une stabilisation supplémentaire par des interactions hydrogènes.

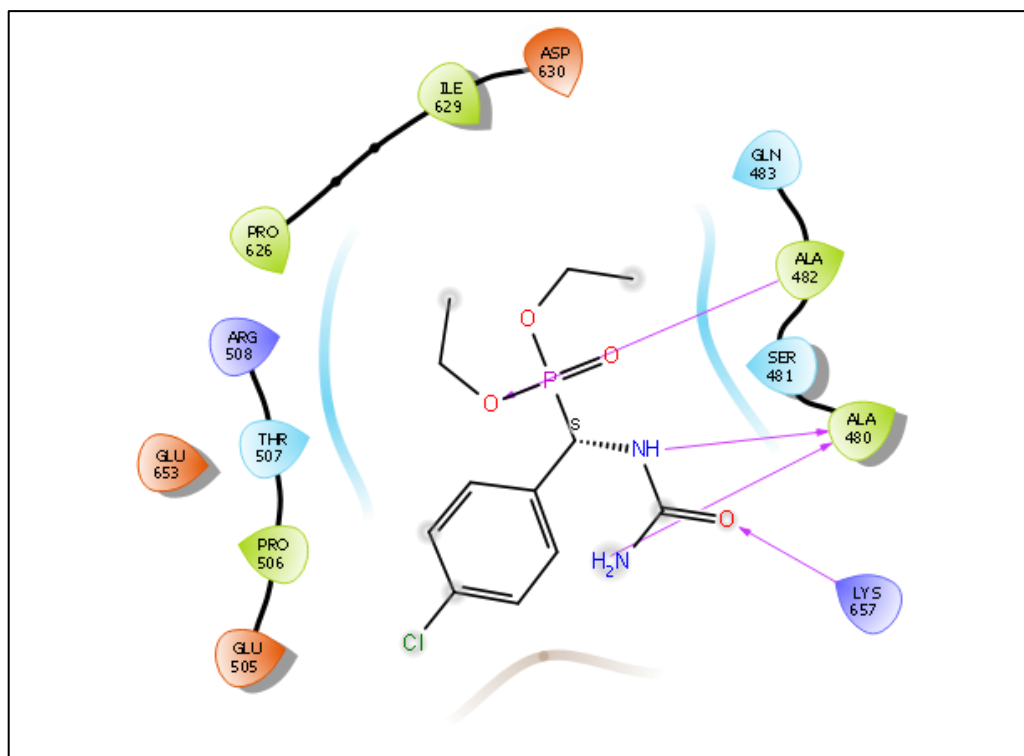


Figure 24 : Interactions moléculaires entre AP1 et l'EPSP synthase

### 3.1.3. Complexe AP2 – EPSP synthase

La figure 29 représente les interactions entre AP2 et l'EPSP synthase, illustrées en deux dimensions. La vue 2D met en évidence les liaisons hydrogène formées entre AP2 et des résidus clés du site actif de l'enzyme, notamment Lys657, Ser481, Ala482, et Thr507. Ces interactions jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la molécule AP2 dans la cavité enzymatique.

Le résidu Lys657 interagit directement avec le groupe phosphate de AP2, ancrant le ligand de manière stable. Les résidus Ser481 et Ala482 forment des liaisons hydrogène supplémentaires avec d'autres groupes fonctionnels de la molécule, renforçant son alignement. Thr507 contribue également à stabiliser la structure via des interactions proches.

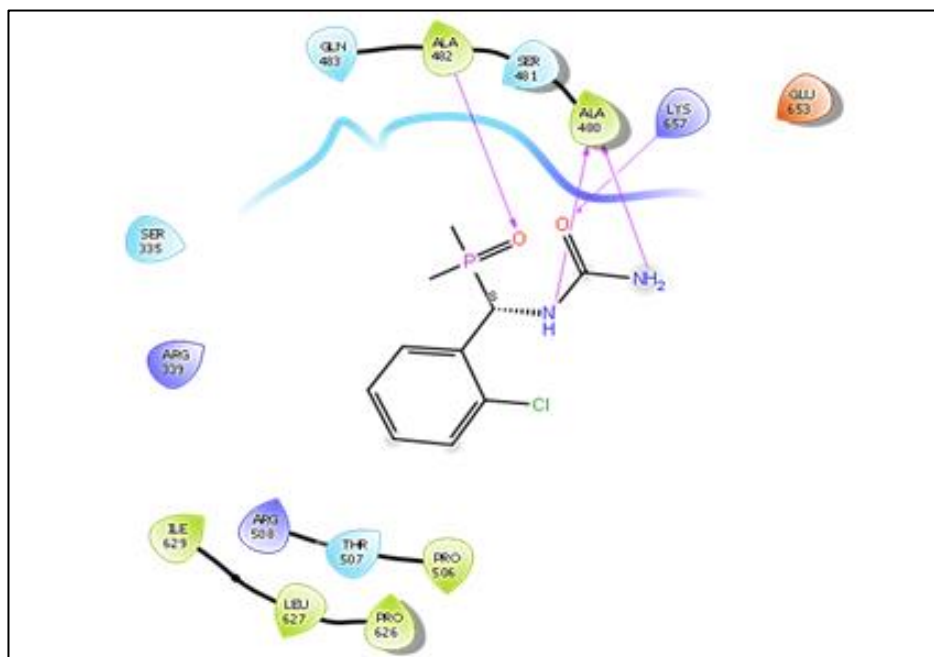


Figure 25: Interactions moléculaires entre AP2 et l'EPSP synthase

### 3.1.4. Scores d'interaction des molécules testées avec l'EPSP synthase

Le tableau (13) représente les scores d'interaction en kcal/mol entre chaque molécule testée et l'EPSP (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate) synthase, mesurés en énergie libre. Plus le score est négatif, plus l'affinité de la molécule pour l'enzyme est élevée.

AP2 affiche le score le plus bas (-3.947 kcal/mol), indiquant l'affinité la plus élevée avec l'EPSP, suivie de AP1 avec un score de -3.586 kcal/mol. Glyphosate a le score le plus élevé (-3.485 kcal/mol), ce qui suggère une affinité légèrement inférieure par rapport aux deux nouvelles molécules testées. Ces résultats suggèrent qu'AP2 pourrait potentiellement être un inhibiteur plus efficace de l'EPSP que le glyphosate.

Tableau 13: Scores d'interaction des molécules testées avec l'EPSP synthase

Molécule testé	Score d'interaction avec EPSP (kcal/mol)
<b>Glyphosate</b>	-3.485
<b>AP1</b>	-3.586
<b>AP2</b>	-3.947

### 3.2. Interactions du glyphosate, AP1 et AP2 avec la superoxyde dismutase (SOD)

#### 3.2.1. Complexe glyphosate – superoxyde dismutase (SOD)

La figure met en évidence les interactions entre le glyphosate et la SOD. Le glyphosate forme des liaisons hydrogène essentielles avec des résidus clés tels que Thr33, Asn180 et MLY182, stabilisant sa position dans la cavité enzymatique.

Des interactions supplémentaires impliquant Tyr34 et Glu171 renforcent cette fixation, indiquant une affinité notable entre le ligand et l'enzyme. Ces interactions suggèrent une potentielle influence du glyphosate sur l'activité de la SOD.

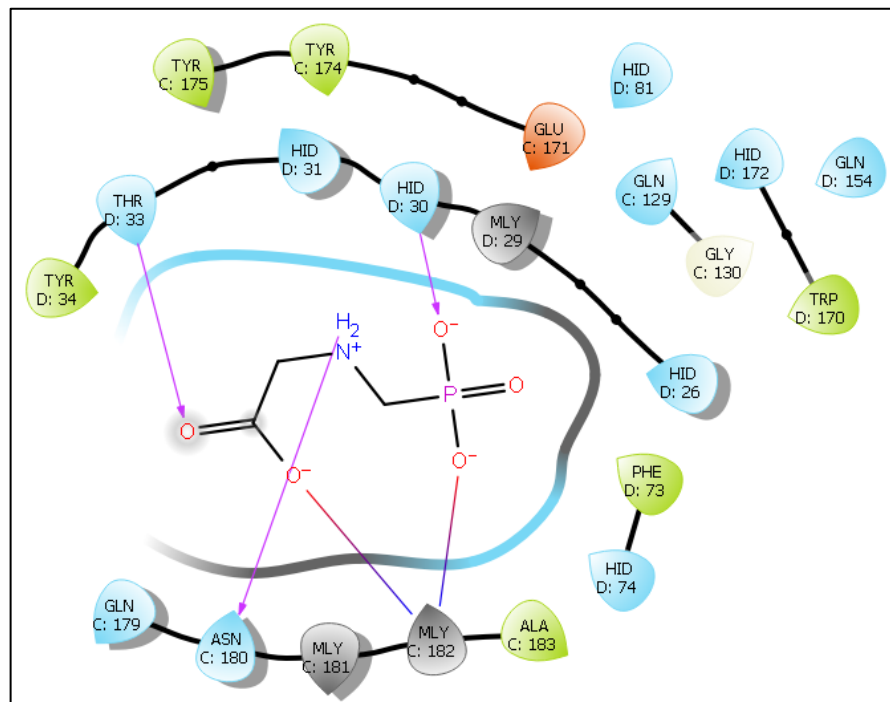


Figure 26 : Interactions moléculaire entre le glyphosate et la super oxyde dismutase.

### 3.2.2. Complexe AP1 – superoxyde dismutase (SOD)

La figure (27) illustre les interactions principales entre la molécule AP1 et la SOD. AP1 établit des liaisons hydrogène avec des résidus clés, notamment Gln179, Asn180, et MLY182, permettant une stabilisation dans le site actif de l'enzyme.

Des interactions supplémentaires impliquent Tyr185 et Glu24, renforçant l'affinité entre AP1 et la SOD. Ces interactions suggèrent une fixation stable AP1, pouvant potentiellement influencer l'activité enzymatique.

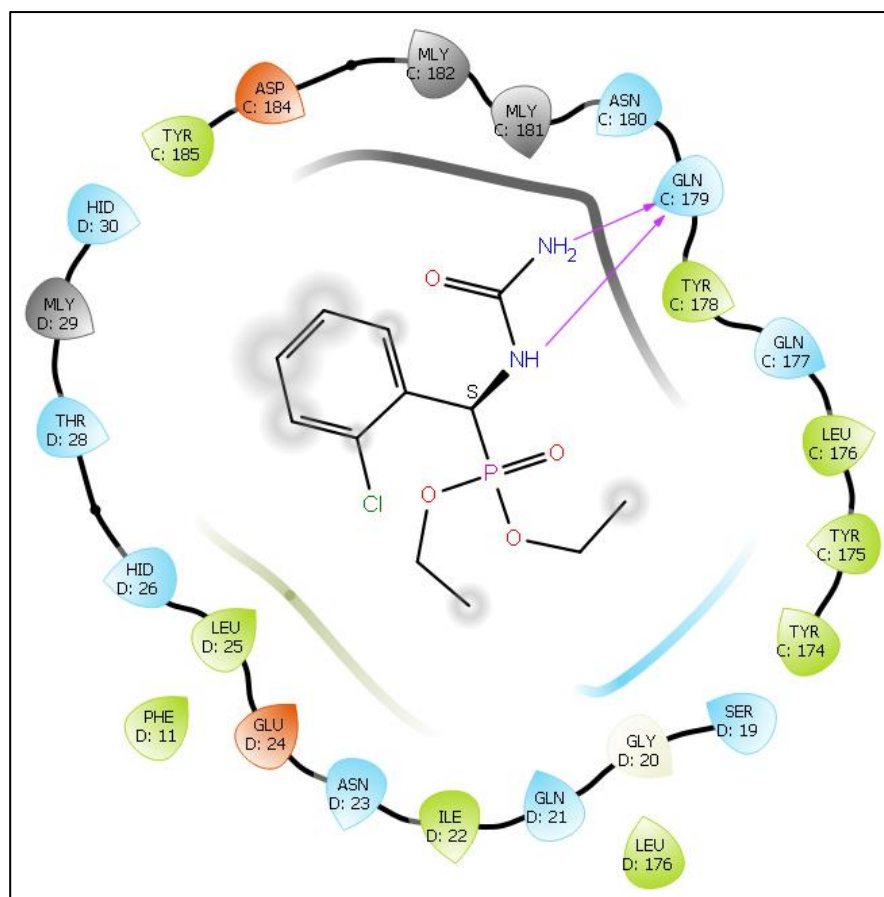


Figure 27 : Interactions moléculaire entre la molécule AP1 et la super oxyde dismutase.

### 3.2.3. Complexe AP2 – superoxyde dismutase (SOD)

La figure (28) met en évidence les interactions entre la molécule AP2 et la SOD. AP2 établit des liaisons hydrogène avec des résidus critiques tels que Gln21, Glu24, et Ser19, stabilisant sa position dans le site actif de l'enzyme.

Ces interactions, renforcées par la complémentarité géométrique et électrostatique entre AP2 et la SOD, suggèrent une fixation stable, pouvant potentiellement moduler l'activité enzymatique.

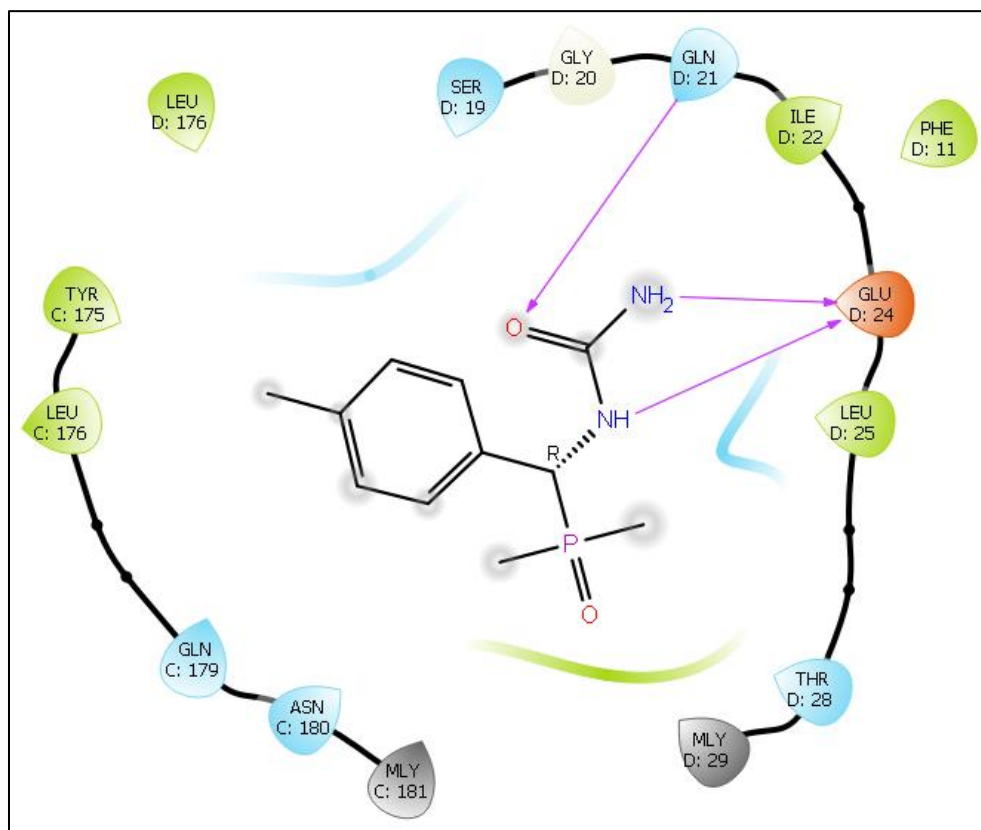


Figure 28 : Interactions moléculaire entre AP2 et la super oxyde dismutase.

### 3.2.4. Scores d'interaction du glyphosate, AP1 et AP2 avec la superoxyde dismutase (SOD)

Le tableau (14) représente les scores des interactions obtenus entre les trois molécules (glyphosate, AP1, et AP2) et la Superoxyde Dismutase (SOD).

Ces scores, exprimés en kilocalories par mole (kcal/mol), reflètent l'énergie libre de liaison calculée lors du *docking* moléculaire. Une valeur plus négative indique une interaction plus stable et une affinité plus forte entre la molécule et l'enzyme.

Ce paramètre permet d'évaluer et de comparer l'affinité des différentes molécules pour le site actif de la SOD, les scores plus négatifs traduisant une meilleure fixation.

Tableau 14 : Scores d'interaction des molécules testées avec la superoxyde dismutase (SOD)

Molécule testé	Score d'interaction avec la SOD (kcal/mol)
<b>Glyphosate</b>	-5.049
<b>AP1</b>	-3.367
<b>AP2</b>	-4.404

### 3.3. Interactions du glyphosate, AP1 et AP2 avec le cytochrome P450 (CYP450)

#### 3.3.1. Complexe glyphosate – cytochrome P450 (CYP450)

La figure (33) illustre les interactions entre le glyphosate et le CYP450, représentées en deux dimensions. Le glyphosate établit plusieurs liaisons hydrogène avec des résidus clés, notamment Gly315, Thr318, et Lys151, contribuant à sa stabilisation dans le site actif de l'enzyme. Ces interactions permettent un ancrage efficace du glyphosate, favorisé également par des contacts hydrophobes avec des résidus tels que Leu312 et Phe463.

La présence de l'hème (HEM601) à proximité du ligand suggère une interaction potentielle avec le centre actif catalytique de l'enzyme, ce qui pourrait influencer son activité. La disposition générale des résidus autour du glyphosate indique une complémentarité géométrique et électrostatique, reflétant une affinité notable entre le ligand et le CYP450.

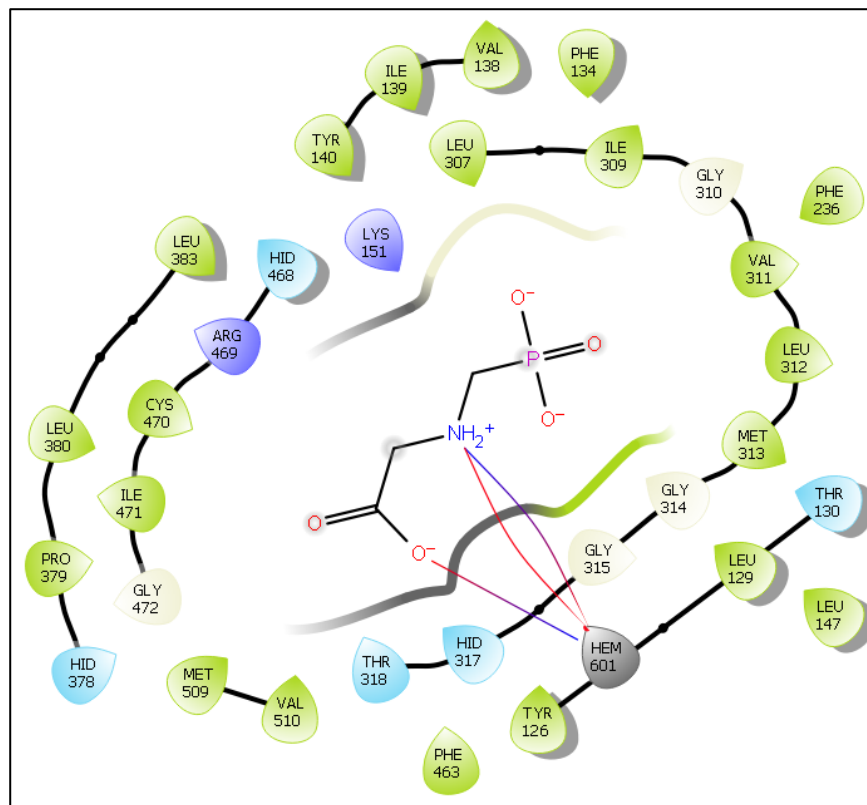


Figure 29: Interactions moléculaire entre le glyphosate et le CYP450

### 3.3.2. Complexe AP1 – cytochrome P450 (CYP450)

La figure (34) représente les interactions entre AP1 et le CYP450, visualisées en deux dimensions. AP1 forme des liaisons hydrogène importantes avec des résidus clés comme Tyr140 et Thr318, contribuant à sa stabilisation dans le site actif. Une interaction directe est également observée avec l'hème (HEM601), indiquant une proximité avec le centre catalytique de l'enzyme.

En outre, des interactions hydrophobes impliquant des résidus tels que Leu312, Phe463 et Met509 renforcent la fixation de la molécule dans la cavité enzymatique.

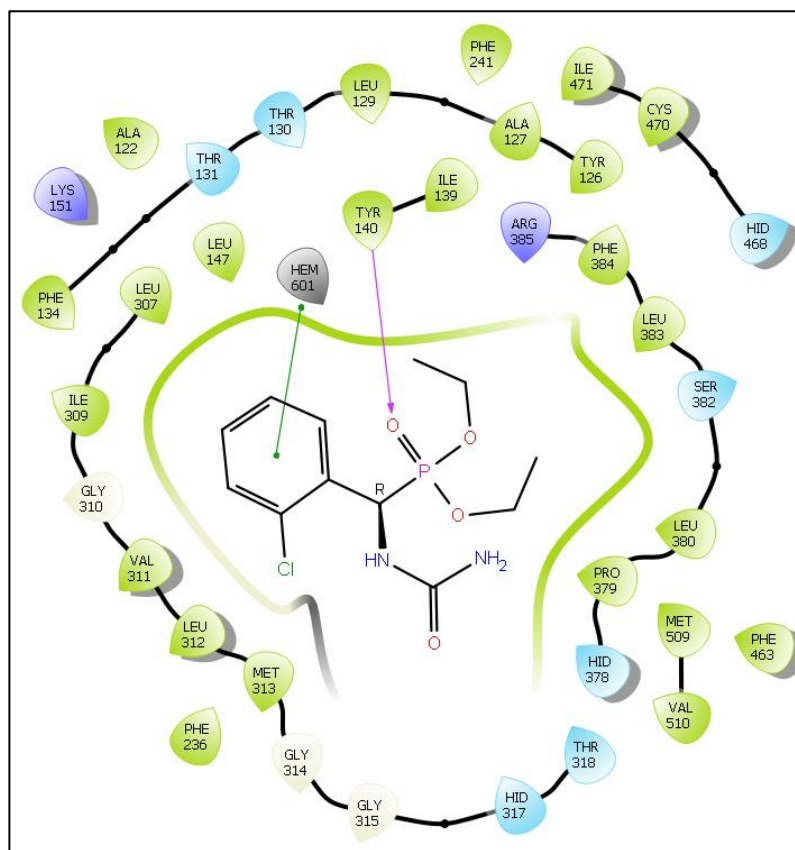


Figure 30 : Interactions moléculaire entre AP1 et le CYP450.

### 3.3.3. Complexe AP2 – cytochrome P450 (CYP450)

La figure met en évidence les interactions entre la molécule AP2 et le CYP450, représentées en deux dimensions. AP2 forme des liaisons hydrogène notables avec les résidus Tyr140 et Thr318, stabilisant efficacement le ligand dans le site actif de l'enzyme. Une interaction directe est également observée avec le groupement hème (HEM601), indiquant une proximité significative avec le centre catalytique de l'enzyme.

Les interactions hydrophobes impliquant les résidus Leu312, Met313 et Gly315 renforcent également la fixation d'AP2 dans la cavité enzymatique. Les interactions observées entre AP2 et le CYP450 révèlent une correspondance géométrique et électrostatique suffisante, traduisant une affinité modérée pour cette enzyme.

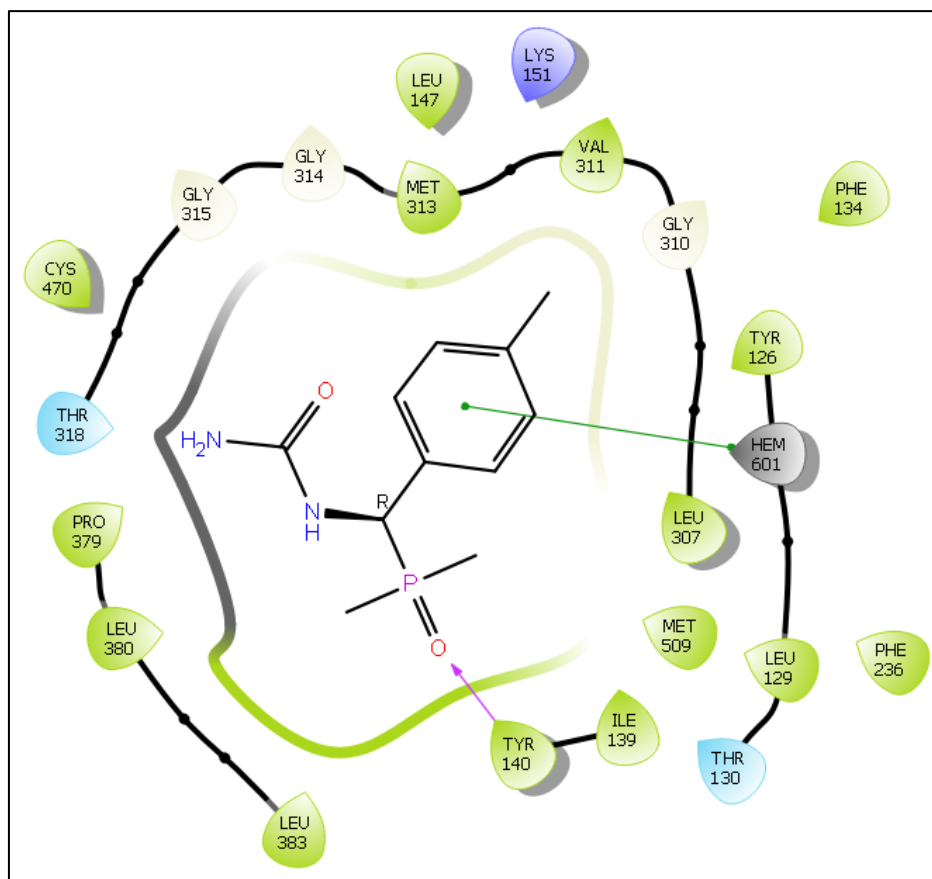


Figure 31 : Interactions moléculaire entre AP2 et le CYP450.

### 3.3.4. Scores d'interaction des molécules testées avec le cytochrome P450 (CYP450)

Le tableau (15) présente les scores d'interaction calculés entre les trois molécules (glyphosate, AP1, et AP2) et le CYP450. Ces scores, exprimés en kilocalories par mole (kcal/mol), représentent l'énergie libre de liaison obtenue lors des simulations de docking moléculaire.

Tableau 15 : Scores d'interaction des molécules testées avec le cytochrome P450 (CYP450)

Molécule testé	Score d'interaction avec le CYP (kcal/mol)
Glyphosate	-6.744
AP1	-6.246
AP2	-6.955

# **Chapitre IV: Discussion et Conclusion**

Les analyses *in silico* ont permis d'évaluer de manière comparative la capacité des molécules glyphosate, AP1 et AP2 à interagir avec les protéines cibles EPSP synthase, SOD et CYP450, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques, mettant en évidence des informations pertinentes pour la compréhension de leur potentiel toxique et de leurs mécanismes d'inhibition.

Les caractéristiques physico-chimiques des trois molécules influencent leur biodisponibilité et leur diffusion dans les systèmes biologiques. Le glyphosate et AP2 présentent une solubilité élevée, ce qui favorise leur distribution dans les milieux aqueux et peut améliorer leur biodisponibilité dans les tissus végétaux et animaux (Di *et al.*, 2003). En revanche, AP1, dont la solubilité est modérée, pourrait présenter des mécanismes d'absorption distincts, possiblement plus adaptés aux environnements cellulaires riches en lipides, ce qui constituerait un avantage potentiel pour cibler certains types cellulaires ou tissus (Benet & Hoener, 2002).

Cette différence de solubilité se reflète également dans les valeurs de logP, où le logP négatif du glyphosate suggère une faible perméabilité membranaire, tandis que les logP plus élevés d'AP1 et d'AP2 indiquent une affinité accrue pour les environnements lipidiques, potentiellement favorables à leur accumulation intracellulaire (Ogata *et al.*, 2018).

Les profils d'interaction obtenus via Swiss Target Prediction révèlent que le glyphosate, en accord avec la littérature, cible principalement les protéases, les récepteurs couplés aux protéines G et les transférases, confirmant son rôle d'inhibiteur de l'EPSP synthase dans la voie du shikimate, essentielle à la biosynthèse des acides aminés aromatiques chez les plantes (Steinrücken & Amrhein, 1980).

Nos résultats montrent qu'AP1 présente une affinité marquée pour les kinases, une caractéristique susceptible de jouer un rôle dans la modulation des voies de signalisation cellulaire, comme cela a été démontré dans d'autres études portant sur des inhibiteurs de kinases à visée thérapeutique (Davies *et al.*, 2000 ; Davis *et al.*, 2011).

Dans ce travail, nous montrons également qu'AP2, dont la distribution cible principalement les protéases et les récepteurs couplés aux protéines G, présente un profil d'inhibition qui pourrait lui conférer une action diversifiée sur plusieurs voies

cellulaires essentielles, renforçant ainsi son intérêt pour des études d'application à cibles multiples (Hauser *et al.*, 2017 ; Drag & Salvesen, 2010).

Nos résultats de docking moléculaire démontrent que les interactions entre les molécules testées et l'EPSP synthase diffèrent sensiblement. AP2, avec le score d'interaction le plus bas (-3,947 kcal/mol), présente une affinité accrue pour l'enzyme, ce qui pourrait en faire un inhibiteur efficace et une alternative potentielle au glyphosate, surtout si des effets écotoxicologiques réduits sont confirmés (Duke, 2018). Bien que le glyphosate demeure un inhibiteur reconnu de l'EPSP synthase, son score d'affinité légèrement supérieur (-3,485 kcal/mol) le place derrière AP2 en termes de liaison potentielle, mais il conserve une forte efficacité d'inhibition dans les systèmes biologiques où son activité herbicide est bien documentée (Rubin *et al.*, 1987). AP1, avec un score d'affinité intermédiaire, pourrait être orienté vers des applications impliquant la modulation de kinases, en vue de stratégies spécifiques de régulation des fonctions cellulaires (Cohen, 2002).

Nous avons également montré que le glyphosate présente une affinité plus élevée vis-à-vis de la SOD (-5.049 kcal/mol), suivi d'AP2 (-4.404 kcal/mol) et d'AP1 (-3.367 kcal/mol). Ces résultats suggèrent que le glyphosate altère plus fortement l'activité de la SOD, probablement en réduisant la capacité de neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (Klátyik *et al.*, 2023). AP2, bien que légèrement moins stabilisé, conserve une fixation significative dans le site actif, tandis qu'AP1, avec une affinité modérée, aurait un impact moindre sur cette enzyme.

Les résultats obtenus pour le CYP450 indiquent qu'AP2 affiche le meilleur score (-6.955 kcal/mol), suivi du glyphosate (-6.744 kcal/mol) et d'AP1 (-6.246 kcal/mol). Ces données traduisent une fixation accrue d'AP2 dans le site actif du CYP, favorisée par des interactions hydrogène avec Tyr140, Thr318 et Gly315, ainsi que par sa proximité avec le groupement hème (HEM601), suggérant une possible modulation du métabolisme enzymatique (Guengerich, 2008). Le glyphosate, avec une affinité similaire, conserve son potentiel inhibiteur, tandis qu'AP1 montre une interaction modérée, dominée par des interactions hydrophobes.

Notre étude *in silico* met en évidence que, bien que le glyphosate soit un inhibiteur avéré de l'EPSP synthase, AP2 se distingue par une affinité potentiellement supérieure, ce qui en fait un candidat prometteur comme herbicide alternatif. À l'inverse, AP1 pourrait présenter un intérêt pour d'autres applications, en raison de sa forte affinité pour les kinases, offrant ainsi des perspectives diversifiées d'utilisation. Ces résultats soulignent l'intérêt des approches *in silico* pour la sélection de composés à profils toxicologiques et écologiques optimisés, ouvrant la voie à des stratégies de gestion environnementale plus durables et responsables.

# **Conclusion générale et Perspectives**

## Conclusion générale et Perspectives

Ce travail s'inscrit dans une démarche visant à évaluer le potentiel toxique de deux nouvelles molécules synthétiques, AP1 et AP2, en les positionnant comme alternatives potentielles au glyphosate, un herbicide largement utilisé mais associé à des préoccupations environnementales et sanitaires. L'approche adoptée, combinant des analyses *in vitro* sur des modèles biologiques alternatifs et des simulations *in silico*, a permis de développer une compréhension intégrée des mécanismes d'action de ces composés et de leur sécurité environnementale potentielle.

Les résultats *in vitro* ont montré que le glyphosate induit une toxicité marquée sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp.*. Chez *Paramecium*, cette toxicité se traduit par une diminution de la croissance cellulaire et une réduction des défenses antioxydantes, tandis que chez *Saccharomyces*, on observe une réponse initiale adaptative avec une augmentation des enzymes antioxydantes, suivie d'une baisse lorsque le stress devient plus important. Ces observations confirment le potentiel toxique élevé du glyphosate et soulignent la pertinence de rechercher des alternatives moins impactantes.

En comparaison, les molécules AP1 et AP2, bien qu'ayant également un effet sur les cellules, ont montré une toxicité moindre. Ces différences traduisent des profils toxicologiques distincts, où AP1 et AP2 apparaissent comme moins perturbateurs des fonctions biologiques, ce qui pourrait leur conférer un intérêt dans une perspective d'alternatives potentielles au glyphosate.

L'approche *in silico* a permis d'approfondir l'analyse des mécanismes moléculaires en étudiant les interactions des composés avec des enzymes clés. AP2 présente la plus forte affinité pour l'EPSP synthase, suggérant un potentiel inhibiteur élevé de cette voie métabolique. Le glyphosate montre également une affinité notable pour l'EPSP synthase, mais ses interactions plus marquées avec la SOD et le CYP450 pourraient expliquer le stress oxydatif élevé observé *in vitro*.

AP1 présente une affinité modérée pour l'ensemble de ces cibles, traduisant un profil toxique globalement plus atténué. Ces résultats confirment que les amidophosphonates AP1 et AP2 constituent des alternatives potentiellement moins toxiques au glyphosate.

## Conclusion générale et Perspectives

Ces résultats confirment non seulement l'implication majeure des enzymes telles que le CYP450 et la SOD dans les réponses cellulaires aux micropolluants, mais soulignent aussi l'importance des interactions spécifiques entre les composés et leurs cibles biologiques. Les propriétés physico-chimiques distinctes des trois molécules, notamment leur solubilité et leur répartition dans les milieux biologiques, pourraient également contribuer aux différences observées et ouvrir des perspectives pour des applications ciblées.

L'intégration d'approches expérimentales et *in silico* met en évidence l'intérêt de recourir à des méthodes prédictives et complémentaires pour l'évaluation de la toxicité des micropolluants. Ce travail montre que les molécules AP1 et AP2 présentent un profil toxique réduit et des effets cellulaires moins délétères que le glyphosate, suggérant leur potentiel comme alternatives. Des modèles biologiques plus complexes, incluant des systèmes multicellulaires ou des études *in vivo*, seraient nécessaires pour confirmer ces observations et affiner les hypothèses mécanistiques liées à l'action des amidophosphonates. Ces résultats ouvrent la voie à une utilisation plus raisonnée et ciblée de nouvelles molécules, dans une optique de réduction des impacts environnementaux.

### Perspectives

- **Validation sur d'autres modèles biologiques alternatifs** : Étendre l'étude à des organismes modèles supplémentaires afin de confirmer et d'affiner les résultats obtenus.
- **Validation *in vivo*** : Compléter les résultats obtenus *in vitro* et *in silico* par des études sur des modèles animaux ou des systèmes plus complexes.
- **Approfondissement des mécanismes de toxicité** : Étudier les mécanismes sous-jacents aux effets observés, analyser les corrélations entre les différents paramètres biologiques (croissance cellulaire, stress oxydatif, enzymes, protéines...) et inclure d'autres enzymes clés impliquées dans le stress oxydatif et le métabolisme cellulaire.
- **Prolongement *in silico* du docking** : Utiliser des simulations dynamiques et analyses multi-cibles pour évaluer la stabilité des interactions ligand-enzyme et prédire la toxicité globale.
- **Évaluation de l'impact environnemental** : Examiner la biodégradabilité et les effets écotoxicologiques des molécules AP1, AP2 et du glyphosate dans des conditions naturelles.
- **Développement de molécules alternatives moins toxiques** : Synthétiser et tester de nouveaux composés inspirés des structures d'AP1 et AP2 afin de proposer des substituts aux pesticides conventionnels.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Référence bibliographique

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267.  
<https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Ahmad, A., Imran, M., & Ahsan, H.. (2023). Biomarkers as Biomedical Bioindicators: Approaches and Techniques for the Detection, Analysis, and Validation of Novel Biomarkers of Diseases. *Pharmaceutics*, 15(6): 1630.  
doi:10.3390/pharmaceutics15061630.
- Amanchi, N.R., & Hussain, M.M.. (2010). Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *Journal of Environmental Biology*, 31, 603–607.
- Aranda-Rivera, A. K., Cruz-Gregorio, A., Arancibia-Hernández, Y. L., Hernández-Cruz, E. Y., & Pedraza-Chaverri, J. (2022). RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen*, 2(4), 437–478. <https://doi.org/10.3390/oxygen2040030>
- Arora, T., Mehta, A. K., Joshi, V., Mehta, K. D., Rathor, N., Mediratta, P. K., & Sharma, K. K. (2011). Substitute of animals in drug research: An approach towards fulfillment of 4R's. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.89750>
- Arrault, A. (2007). Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données : application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma (Thèse de doctorat, Université d'Orléans). Disponible en ligne : <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00275585>

## Référence bibliographique

- Azzouz, Z. (2012). Étude 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, Algérie). Disponible en ligne : <https://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2015/02/AZZOUZ-Zoubir.pdf>.
- Azzouz, Z., Berrebbah, H., & Djebar, 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), 3242–3250. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.322>
- Barzman, M., Bàrberi, P., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Hommel, B., Jensen, J. E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J. R., Messéan, A., Moonen, A.-C., Ratnadass, A., Ricci, P., Sarah, J.-L., & Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 1199–1215. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0318-4>
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G.. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clin Microbiol Rev*, 26(2): 335. doi:10.1128/CMR.00059-12.
- Benamer, E., Khirani, S., & Chouchene, L. (2024). Biodegradation and decolorization of Reactive Red 2 azo dye by *Paramecium jenningsi* and *Paramecium multimicronucleatum* in industrial wastewater. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14, 7753–7761. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03057-3>
- Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., & Djebar, M.-R. (2012). Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 557–565.

## Référence bibliographique

- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28, Article 3. DOI: 10.1186/s12302-016-0070-0.
- Benet, L. Z., & Hoener, B. A. (2002). Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 71(3), 115–121.  
<https://doi.org/10.1067/mcp.2002.121829>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.23>.
- Bhatt, P., Bhandari, G., & Bilal, M. (2022). Occurrence, toxicity impacts and mitigation of emerging micropollutants in the aquatic environments: Recent tendencies and perspectives. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3): 107598. doi:10.1016/j.jece.2022.107598.
- Bilgici, Z., Demir-Ordu, Ö., Isik, M., & Avcı, D. (2011). Synthesis and Polymerizations of Six Aminophosphonate-Containing Methacrylates. *Journal of Polymer Science A Polymer Chemistry*, 49. doi:10.1002/pola.24965.
- Bliss, C. I. (1934). The method of probits. *Science*, 79(2037), 38-39. doi:10.1126/science.79.2037.38.
- Boitard, L., Cottinet, D., Kleinschmitt, C., & Baudry, J. (2015). "Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets." *Analytical Chemistry*, 87(12), 6185-6192.

## Référence bibliographique

- Boland, J., Koomen, I., van Lidth de Jeude, J., & Oudejans, J. (2004). Les pesticides : composition, utilisation et risques (Agrodok 29). Fondation Agromisa. ISBN : 90-77073-01-9.
- Boone, M. D., Semlitsch, R. D., Little, E. E., et Doyle, M. C. (2007). Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecological Applications*, 17(1), 291-301. doi:10.1890/1051-0761(2007)017.
- Bouaricha, H. (2013). Évaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium* sp.). Thèse de Doctorat, Université de Annaba - Badji Mokhtar, Département de Biologie.
- Bouayed, J., & Bohn, T.. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4): 228237. doi:10.4161/oxim.3.4.12858.
- Bouchard, M. F., Bellinger, D. C., Wright, R. O., & Weisskopf, M. G. (2010). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides. *Pediatrics*, 125(6), e1270–e1277.
- Bouraiou, C., Berrebbah, H., Djekoun, M., & Djebbar, M. R. (2019). Growth inhibition and oxidative stress in the freshwater ciliate *Paramecium* sp. exposed to copper oxide nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2765–2774. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3765-9>
- Bouzina, A., Aouf, N., & Berredjem, M.. (2016). Ultrasound assisted green synthesis of  $\alpha$ -hydroxyphosphonates under solvent-free conditions. *Research on Chemical Intermediates*, 42, 5993–6002. ] Boyd C., « What is a molluscicide? », *Chemservice News*. Consulté le: 4 mars 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.chemservice.com/news/what-is-a-molluscicide/>.

## Référence bibliographique

- Boyd, P. W., & Brown, C. J. (2015). Modes of interactions between environmental drivers and marine biota. *Frontiers in Marine Science*, 2, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00009>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Briand, C., Bressy, A., Chebbo, G., Deroubaix, J.-F., & Deshayes, S. (2018). Que sait-on des micropolluants dans les eaux urbaines ? ARCEAU Île-de-France / Agence française pour la biodiversité.
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. [doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04691](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691).
- Browne, P., Judson, R. S., Casey, W. M., Kleinstreuer, N. C., et Thomas, R. S. (2015). Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model. *Environmental Science & Technology*, 49(14), 8804-8814. [doi:10.1021/acs.est.5b02641](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02641).
- Bálint, E., & Keglevich, G. (2016). Synthesis of ethyl octyl  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives. *Current Organic Synthesis*, 13, 638–645.
- Caetano, M. S., Ramalho, T. C., da Cunha, E. F. F., Josa, D., & Souza, T. C. S. (2009). Analysis of Wild-Type and Gly96Ala Mutant EPSP Synthase Structures via in Silico Docking with Inhibitors and Molecular Dynamics Simulation. *Current Bioactive Compounds*, 5(2), 110–118. <https://doi.org/10.2174/157340709788451966>.

## Référence bibliographique

- Camacho-Pérez, M. R., Araujo-Romero, P., Sánchez-Hernández, J. C., Mena-López, G., Flores-Bocanegra, L., & Martínez-Pacheco, F. O. (2022). Organophosphorus pesticides as modulating substances of inflammation through the cholinergic pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4523. <https://doi.org/10.3390/ijms23094523>
- Cherait, A. (2015). Évaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental bioindicateur de stress (Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba). 152 p.
- Cherkasov, A., Muratov, E. N., Fourches, D., Varnek, A., Baskin, I. I., Cronin, M., Dearden, J., Gramatica, P., Martin, Y. C., Todeschini, R., Consonni, V., Kuz'min, V. E., Cramer, R., Benigni, R., Yang, C., Rathman, J., Terfloth, L., Gasteiger, J., Richard, A., & Tropsha, A. (2014). QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(12), 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In R. A. Greenwald (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (pp. 283–284). Boca Raton, FL: CRC Press.
- CNSforum.com. Schéma des effets des organophosphorés sur la transmission synaptique. Disponible sur : [Neurotorium.org](http://Neurotorium.org) (anciennement CNSforum.com).
- Cohen, P. (2002). Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(4), 309-315. <https://doi.org/10.1038/nrd773>.
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25-year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 596–601. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01769-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01769-1)

## Référence bibliographique

- Costas-Ferreira, C., Durán, R., & Faro, L. R. F. (2022). Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). (4605). <https://doi.org/10.3390/ijms23094605>.
- Croute, F., Vidal, S., Dupouy, D., Soleilhavoup, J.P., & Serre, G. (1985). Studies on catalase, glutathione peroxidase and superoxidismutase activities in aging cells of *Paramecium tetraurelia*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 29, 53–62.
- Damalas, C. A., & Koutroubas, S. D. (2016). Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. *Toxics*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.3390/toxics4010001>
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*, 351(1), 95–105.
- Davis, M. I., Hunt, J. P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L. M., Pallares, G., Hocker, M., Treiber, D. K., & Zarrinkar, P. P. (2011). Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1046–1051. <https://doi.org/10.1038/nbt.1990>.
- Dejoux, C.. (2003). Toxicité pour la faune aquatique de quelques nouveaux insecticides: III - La deltaméthrine. In *Trente ans de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest*. Marseille: IRD Éditions, 263275. doi:10.4000/books.irdeditions.28887.
- Derkaoui, A., Elbouazzaoui, A., Elhouari, N., Achour, S., Labib, S., Sbai, H., Harrandou, M., Khatouf, M., & Kanjaa, N. (2011). Intoxication aiguë sévère par les pesticides organophosphorés: à propos de 28 cas. *The Pan African Medical Journal*, 8(1).

## Référence bibliographique

- Devineni, S. R., Doddaga, S., Donka, R., & Chamarthi, N. R. (2013). CeCl<sub>3</sub>•7H<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub>: Catalyst promoted microwave-assisted neat synthesis, antifungal and antioxidant activities of  $\alpha$ -diaminophosphonates. *Chinese Chemical Letters*, 24(7), 595–598. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2013.04.023>
  - Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., & Jewell, C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, 1103–1123.
  - Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J., & Carter, G. T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(3), 223–232.
  - Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133–7155. <https://doi.org/10.1021/bi00483a001>
  - Djebbar, M. R., & Djebbar, H. (2000). Bioénergétique, les mitochondries végétales. *Synthèse*, 8, 23–25.
  - Drag, M., & Salvesen, G. S. (2010). Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(9), 690-701.
- Dreamstime. (2024). Structure de la cellule de levure. Disponible sur : <https://fr.dreamstime.com/structure-cellule-levure-illustration-vectorielle-graphique-des-diff%C3%A9rents-organites-trouv%C3%A9s-membrane-image252213923>
- Duina, A.A., Miller, M.E., & Keeney, J.B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1): 3348.

## Référence bibliographique

- Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>.
- Duke, S.O., & Powles, S.B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4): 319-325.
- D’Silva, C., & Krishna, B. (2019). Rodenticide Poisoning. *Indian J Crit Care Med*, 23(Suppl 4): S272 S277. doi:10.5005/jp-journals-10071-23318.
- El-Baky, N.A., & Amara, A.A.A.F. (2021). Recent Approaches towards Control of Fungal Diseases in Plants: An Updated Review. *J Fungi (Basel)*, 7(11): 900. doi:10.3390/jof7110900.
- Enoch, S. J., Hewitt, M., Cronin, M. T. D., Azam, S., & Madden, J. C. (2011). Quantitative and mechanistic read-across for predicting the skin sensitization potential of alkenes as Michael acceptors. *Chemical Research in Toxicology*, 24(6), 1003-1011.
- Eriguchi, M., Iida, K., Ikeda, S., Osoegawa, M., Nishioka, K., Hattori, N., Nagayama, H., & Hara, H. (2019). Parkinsonism relating to intoxication with glyphosate. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*, 1, 66–69. [PMCID: PMC6663540] [PMID: 30799335].
- Eweas, A. F. (2014). Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. ResearchGate.
- Farfar, K., Youbi, A., Kimour, M. E. T., Khebbeb, M. E. H., Djebbar, M. R., & Bouslama, Z. (2022). Predictive effects (study in silico) of cadmium/fungicide cocktail on biomarkers of snail oxidative stress: *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) using the

## Référence bibliographique

forecasting grey model GM (1, N). *International Journal of Biosciences*, 21(6), 197–205. <https://doi.org/10.12692/ijb/21.6.197-205>

- Farid, F., Sideeq, O., Khan, F., & Niaz, K. (2019). Chapter 5.1 - *Saccharomyces cerevisiae*. In S. M. Nabavi & A. S. Silva (Eds.), *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (pp. 501–508). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00066-7>
- Ferguson, F. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., & Gray, N. S. (2018). Structure-based virtual screening for ligands of G protein-coupled receptors. *Pharmacological Reviews*, 73(4), 1698–1736. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014650>
- Finney, D.J. (1952). *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11, 905–919. .
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112.
- Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., & Obuse, C. (2001). Cell cycle dependent topological changes of chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells*, 6(8), 649–663.
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2020). The Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Prevent Nematode Damage to Plants. *Biology*, 9(11), 381.

## Référence bibliographique

- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35–120
- Gilliom, R. J., Barbash, J. E., Crawford, C. G., Hamilton, P. A., Martin, J. D., Nakagaki, N., Nowell, L. H., Scott, J. C., Stackelberg, P. E., Thelin, G. P., & Wolock, D. M. (2006). *Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992–2001*. Circular 1291. U.S. Geological Survey.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Guengerich, F. P. (2008). Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), 70-83.
- Gurr, G. M., Wratten, S. D., Landis, D. A., & You, M. (2017). Habitat Management to Suppress Pest Populations: Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology*, 62, 91-109.
- Gęgotek A. et Skrzydlewska E. (2022). Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid , *Antioxidants (Basel)*, vol. 11, no 10, p. 1993, oct., doi: 10.3390/antiox11101993.
- 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(22), 7130-7139.
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1750-1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644>.

## Référence bibliographique

- Hammad, M., Wang, Y., Hussain, K., Akram, M., Nawaz, A., Afzal, M., Zhang, M., & Qiu, L. (2023). Roles of oxidative stress and Nrf2 signaling in pathogenic and non-pathogenic cells: A possible general mechanism of resistance to therapy. *Antioxidants*, 12(7), 1371. <https://doi.org/10.3390/antiox12071371>.
- Hamza-Chaffai, A. (2014). Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 19–26.
- Hartung, T., & Rovida, C. (2009). "Chemical regulators have overreached." *Nature*, 460(7259), 1080-1081.
- Hartung, T., Luechtefeld, T., Maertens, A., et Kleensang, A. (2013). Integrated testing strategies for safety assessments. *ALTEX*, 30(1), 3-18. doi:10.14573/altex.2013.1.003.
- Haslam, E. (1993). *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley & Sons.
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 829-842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>.
- Hirsch, P. E., Adrian-Kalchhauser, I., Flämig, S., Segelbacher, G., Schmid, M., & Hödl, W. (2003). Fish migration between a channelized river and its floodplain lakes: Restoration projects evaluated. *Ecological Applications*, 13(5), 1256–1269. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[1256:FMBACR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[1256:FMBACR]2.0.CO;2)
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.

## Référence bibliographique

- Huey, R., Morris, G. M., Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock Vina for ligand-receptor docking. *Molecular Docking*, 10, 56-73.
- IARC (2015). Glyphosate. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 112. World Health Organization.
- Impellitteri, F., Multisanti, C.R., Rusanova, P., Piccione, G., Falco, F., & Faggio, C.. (2023). Exploring the Impact of Contaminants of Emerging Concern on Fish and Invertebrates Physiology in the Mediterranean Sea. *Biology*, 12(6): 767.
- Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S., & Komatsu, Y. (2003). Barotolerance is dependent on both trehalose and heat shock protein 104 but is essentially different from thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 24(6), 462–466.
- Janin, J., & Rodier, F. (1995). Protein–protein interaction at crystal contacts. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 23(4), 580-587.  
<https://doi.org/10.1002/prot.340230413>.
- Jeffrey, G. A. (1994). Hydrogen-bonding: An update. *Crystallography Reviews*, 4(2), 135-176. <https://doi.org/10.1080/08893110310001621754>.
- Jones Jr, G. S., et Daly, J. S. (1993). Antibacterial organophosphorus compounds: Phosphoranilidohydrazones of 5-nitro-2-furaldehyde. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(8), 755-757.
- Jouhten P., Ponomarova O., Gonzalez R., et Patil K. R. (2016). « *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context », *FEMS Yeast Res*, vol. 16, no 7, p. fow080, nov., doi: 10.1093/femsyr/fow080.

## Référence bibliographique

- Judson, R. S., Houck, K. A., Kavlock, R. J., Knudsen, T. B., Martin, M. T., Mortensen, H. M., Reif, D. M., Rotroff, D. M., Shah, I., Richard, A. M., & Dix, D. J. (2010). In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. *Environmental Health Perspectives*, 118(4), 485–492.
- Kaboudin B., Daliri P., Faghil S., et Esfandiari H. (2022). Hydroxy- and Amino-Phosphonates and -Bisphosphonates: Synthetic Methods and Their Biological Applications. *Frontiers in Chemistry*, 10, Article 890696. DOI: 10.3389/fchem.2022.890696.
- Kafarski, P., & Zoń, J. (2000). Synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonic and  $\alpha$ -aminophosphinic acids. In *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity* (pp. 33-74).
- Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., & Alferes, F.. (2019). Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants (Basel)*, 8(11): 499. doi:10.3390/plants8110499.
- Keglevich, G., & Bálint, E. (2016). Synthesis of ethyl octyl  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives. *Current Organic Synthesis*, 13, 638–645.
- Khatib, I., Rychter, P., & Falfushynska, H. (2022). Pesticide Pollution: Detrimental Outcomes and Possible Mechanisms of Fish Exposure to Common Organophosphates and Triazines. *J Xenobiot*, 12(3): 236265. doi:10.3390/jox12030018.
- Khebbeb, M. N. (2016). Évaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules (ZnO) sur deux modèles biologiques unicellulaires (*Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium* sp). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.

## Référence bibliographique

- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202-D1213. .
- Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., & Székács, A. (2023). Terrestrial ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010–2023. *Environmental Sciences Europe*, 35, 51. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00758-9>.
- Knepper, T. P. (2003). Synthetic chelating agents and compounds exhibiting complexing properties in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 708–724. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01008-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01008-2)
- Kollman, P. (1993). Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews*, 93(7), 2395-2417. <https://doi.org/10.1021/cr00023a003>.
- Kraicheva, I., Bogomilova, A., Tsacheva, I., Momekov, G., Momekova, D., & Troev, K. (2010). Synthesis, NMR characterization and in vitro cytotoxicity evaluation of new poly(oxyethylene aminophosphonate)s. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 6039–6044. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.10.002>
- Krewski, D., Andersen, M. E., Tyshenko, M. G., Krishnan, K., Hartung, T., Boekelheide, K., Wambaugh, J. F., Jones, D., Whelan, M., Thomas, R., Yauk, C., Barton-Maclaren, T., & Cote, I. (2019). Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future perspectives. *Archives of Toxicology*, 94(1), 1–58.
- Le Mire, G., Nguyen, M. L., Fassotte, B., du Jardin, P., Verheggen, F., Haubruge, E., & Jijakli, M. H. (2016). Review: Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. *Biotechnology*,

## Référence bibliographique

Agronomy, Society and Environment, 20(s1), 299–313.

<https://doi.org/10.25518/1780-4507.12717>

- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., & Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126. doi:10.4103/0973-7847.70902.
- Louat, F. (2013). Étude des effets liés à l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, *Drosophila melanogaster* (Thèse de doctorat, Université d'Orléans).
- Loureiro, I., Santin-Montanyá, I., Escorial, M.-C., García-Ruiz, E., Cobos, G., Sánchez-Ramos, I., Pascual, S., González-Núñez, M., & Chueca, M.-C. (2019). Glyphosate as a Tool for the Incorporation of New Herbicide Options in Integrated Weed Management in Maize: A Weed Dynamics Evaluation. *Agronomy*, 9(12), 876. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120876>.
- Maertens, A., & Hartung, T. (2018). Green Toxicology-Know Early About and Avoid Toxic Product Liabilities. *Toxicological Sciences*, 161(2), 285–289. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx243>.
- Manghi, M. C., Masiol, M., Calzavara, R., Graziano, P. L., Peruzzi, E., & Pavoni, B. (2021). The use of phosphonates in agriculture: Chemical, biological properties and legislative issues. *Chemosphere*, 283, 131187. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131187>

## Référence bibliographique

- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- McDuffie, H. H., Pahwa, P., McLaughlin, J. R., Spinelli, J. J., Fincham, S., Dosman, J. A., Robson, D., Skinnider, L. F., & Choi, N. W. (2001). Non-Hodgkin's Lymphoma and Specific Pesticide Exposures in Men: Cross-Canada Study of Pesticides and Health. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10(11), 1151-1157.
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Asaduzzaman, M., Parven, A., & Megharaj, M. (2020). Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? *Environmental Pollution*, 263(Pt A), 114372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114372>.
- Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M.. (2011). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146-157
- Merabet, Y. (2020). Structure d'une paramécie. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/>.
- Mesnage, R., & Antoniou, M. N. (2017). Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Frontiers in Public Health*, 5, 316.
- 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 IC<sub>50</sub> values for water pollutants. *Journal of Health Science*, 49(6), 429–435. <https://doi.org/10.1248/jhs.49.429>
- Modi, S., Hughes, M., Garrow, A., & White, A. (2012). The value of in silico chemistry in the safety assessment of chemicals in the consumer goods and

## Référence bibliographique

pharmaceutical industries. *Drug Discovery Today*, 17(3-4), 135–142.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.022>

- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- Mullineaux, P.M., & Creissen, G.P. (1997). Glutathione Reductase: Regulation and Role in Oxidative Stress. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34, 667-713.
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnage, R., Vandenberg, L. N., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., & Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, 15, Article 19. DOI: 10.1186/s12940-016-0117-0.
- Nalecz-Jawecki, G., Demkowicz-Dobrzainski, K., & Sawicki, J. (1993). Protozoan *Spirostomum ambiguum* as a highly sensitive bioindicator for rapid and easy determination of water quality. *Science of the Total Environment*, 134, 1227–1234.
- Nelson, D. R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(1), 14-18.
- Ogata, K., Hatakeyama, M., & Nakamura, S. (2018). Effect of atomic charges on octanol–water partition coefficient using alchemical free energy calculation. *Molecules*, 23(2), 425. <https://doi.org/10.3390/molecules23020425>.
- Ore, O. T., Adeola, A. O., Bayode, A. A., Adedipe, D. T., & Nomngongo, P. N. (2023). Organophosphate pesticide residues in environmental and biological matrices:

## Référence bibliographique

Occurrence, distribution and potential remedial approaches. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2022.10.004>

- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R. M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., & Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Reports*, 5(5), 532–537. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400132>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). "Software for molecular docking: a review." *Biophysical Reviews*, 9, 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154(2), 536-541. doi:10.1016/0003-2697(86)90240-7.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol*, 6(1), 131. doi:10.3934/microbiol.2020001.
- Patterson, D. J. (1980). Contractile vacuoles and associated structures: Their organization and function. *Biological Reviews*, 55(1), 1–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1980.tb00686.x>
- Patterson, D. (2008). Contractile vacuoles and associated structures—Their organization and function. *Biological Reviews*, 55, 146. doi:10.1111/j.1469-185X.1980.tb00686.x.
- Pimentel, D., Zuniga, R., & Morrison, D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, 52(3), 273-288. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002>.

## Référence bibliographique

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, Article ID 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- Pol, D. (1997). *Travaux pratiques de biologie des levures*. Paris : Éditions Ellipses.
- Pretty, J., & Bharucha, Z. P. (2015). Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. *Insects*, 6(1), 152-182.  
  
Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 2014, Article ID 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219–236. <https://doi.org/10.2147/CIA.S2118>.
- Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(2), 147-172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>.
- Rott, E., Steinmetz, H., & Metzger, J. (2018). Organophosphonates: A review on environmental relevance, biodegradability and removal in wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 615, 1112–1127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.223>.
- Rouabhi, R., Berrebbah, H., & Djebbar, M. R. (2006). Toxicity evaluation of flucycloxuron and diflubenzuron on the cellular model, *Paramecium* sp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(3), 157-162.

## Référence bibliographique

- Rubin, J. L., Gaines, C. G., & Jensen, R. A. (1984). Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotiana silvestris*. *Plant Physiology*, 75(3), 839–845.
- Ruiz de Arcaute, C., Larramendy, M. L., Ossana, N. A., & Pérez Iglesias, J. M. (2019). Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 20485–20498.
- Russell, R. J., Scott, C., Jackson, C. J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M. C., Coppin, C. W., Liu, J. W., & Oakeshott, J. G. (2011). The evolution of new enzyme function: Lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 4(2), 225-248.
- Saib, A., Berrebbah, H., Berredjem, M., & Djebar, M.R. (2014). Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Toxicology Research*, 3, 395–399.
- Samsel, A., & Seneff, S. (2013). Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy*, 15(4), 1416–1463. <https://doi.org/10.3390/e15041416>.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 221–231.
- Sauvant, M.P., Pepin, D., & Piccini, E. (1999). *Tetrahymena pyriformis* as a tool for toxicological studies. *Chemosphere*, 38(7), 1631-1669.

## Référence bibliographique

- Sevrain C. M., Berchel M., Couthon H., et Jaffrès P.-A. (2017). Phosphonic acid: preparation and applications », *Beilstein J Org Chem*, vol. 13, p. 21862213., doi: 10.3762/bjoc.13.219.
- Shahul Hamid, F., Bhatti, M. S., Anuar, N., Anuar, N., Mohan, P., & Periathamby, A. (2018). Worldwide distribution and abundance of microplastic: How dire is the situation? *Waste Management & Research*, 36(10), 873–897. <https://doi.org/10.1177/0734242X18785730>.
- Shirts, M. R., & Pande, V. S. (2000). Computational screening of protein-protein docking: The molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area implicit solvation model. *Journal of Computational Chemistry*, 21(9), 947–957.
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P., & Datta, S. (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7519. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W., Jr. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 334–395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>.
- Steinrücken, H.C., & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94(4), 1207-1212.
- Stewart, G. (2017). The structure and function of the yeast cell wall, plasma membrane and periplasm. In [Titre du livre] (p. 5575). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8_5)
- Sturm, M.T., Myers, E., Schober, D., Thege, C., Korzin, A., & Schuhen, K. (2022). Adaptable Process Design as a Key for Sustainability Upgrades in Wastewater Treatment: Comparative Study on the Removal of Micropollutants by Advanced Oxidation and Granular Activated Carbon Processing at a German Municipal Wastewater Treatment Plant. *Sustainability*, 14(18), 11605. doi:10.3390/su141811605.

- Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-Onazi, W. A., Algarni, T. S., Almarri, A. H., & Al-Mohaimed, A. M. (2021). Pesticides in drinking water—A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), Article 468. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020468>.
- Séralini, G.-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., & de Vendômois, J. S. (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>.
- Tajti, Á., & Keglevich, G. (2018). The importance of organophosphorus compounds as biologically active agents. *Organophosphorus Chemistry*.
- Thakur, M., Medintz, I.L., & Walper, S.A. (2019). Enzymatic Bioremediation of Organophosphate Compounds—Progress and Remaining Challenges. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 289. doi:10.3389/fbioe.2019.00289.
- Tiwari A. K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy , *Current Science*, vol. 81, no 9, p. 11791187
- Tomlinson, L., Williams, R., & Turner, J. (2017). Evaluating the toxicological safety of alternative herbicides. *Journal of Environmental Toxicology*, 91(6), 562-573.
- Trela, Z., Kleszczyńska, H., et Sarapuk, J. (2001). Physiological and hemolytic toxicity of some aminophosphonates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(11-12), 838-842.

## Référence bibliographique

- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- Tudi, M., Ruan, H.D., Wang, L. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3). (1112).
- Tushmalova N.A., Lebedeva N.E., Igolkina Yu.V., Sarapultseva E.I. (2014). Spirostomum ambiguum as a bioindicator of aquatic environment pollution. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 69, 67–70.  
<https://doi.org/10.3103/S0096392514020115>
- Twardowska, I., et al. 2007. Risk assessment of organophosphorus pesticide residues in water. *Water Research*, 41(15), 3201-3210.
- UCLouvain. "Les Protistes". Disponible sur :  
[https://oer.uclouvain.be/jspui/bitstream/123456789/322/8/syllabus\\_protistes\\_biol.pdf](https://oer.uclouvain.be/jspui/bitstream/123456789/322/8/syllabus_protistes_biol.pdf)
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268.
- Van Houten, J. (2023). A Review for the Special Issue on Paramecium as a Modern Model Organism. *Microorganisms*, 11(4), 937.
- Venkateswara Rao, J., Arepalli, S. K., Gunda, V. G., & Bharat Kumar, J. (2008). Assessment of cytoskeletal damage in Paramecium caudatum: An early warning system for apoptotic studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91(2), 75-80.
- Venkateswara Rao, J., Gunda, V.G., Srikanth, K., & Arepalli, S.K. (2007). Acute toxicity bioassay using Paramecium caudatum, a key member to study the effects of

## Référence bibliographique

monocrotophos on swimming behaviour, morphology, and reproduction.

Toxicological & Environmental Chemistry, 89, 307–317.

- Venkateswara Rao, J., Srikanth, K., Arepalli, S.K., & Gunda, V.G. (2006). Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 131-137.

Verduyn, C., Stouthamer, A. H., Scheffers, W. A., & van Dijken, J. P. (1991). A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59(1), 49–63. <https://doi.org/10.1007/BF00582119>.

- Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., & Matarrese, P. (2021). The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants*, 10(2), 201. <https://doi.org/10.3390/antiox10020201>
- Wallace, M. A. G., Kormos, T. M., & Pleil, J. D. (2016). Blood-borne biomarkers and bioindicators for linking exposure to health effects in environmental health science. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 19(8), 380–409. <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1215772>
- Wang, Y., Meng, Z., Liang, C., Meng, Z., Wang, Y., Sun, G., Zhu, T., Cai, Y., Guo, S., Zhang, R., & Lin, Y. (2017). Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. *Science China Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9031-y>.
- Weckbecker, G., & Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*, 40, 257–264.
- Wong, C.K.C., Cheung, R.Y.H., & Wong, M.H. (1999). Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate, *Dunaliella tertiolecta*. *Environmental Pollution*, 105, 175–183.

## Référence bibliographique

- Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: A review of the evidence post 2013. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 17285–17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0241-4>.
- Yano, J., Valentine, M., & Van Houten, J. (2015). Novel insights into the development and function of cilia using the advantages of the Paramecium cell and its many cilia. *Cells*, 4(3), 297-314.
- Ye, Z., Wu, F., & Hennessy, D. A. (2021). Environmental and economic concerns surrounding restrictions on glyphosate use in corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(18), e2017470118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017470118>
- Zhang, S., Li, Y., Zhang, T., & Peng, Y. (2015). An integrated environmental decision support system for water pollution control based on TMDL – A case study in the Beiyun River watershed. *Journal of Environmental Management*, 156, 31–40
- Zhang, Shuang, Li, Yafeng, Zhang, Ting, Peng, Yuan. (2023). "Exploring the Impact of Contaminants of Emerging Concern on Fish and Invertebrates Physiology in the Mediterranean Sea." *Biology* 12(6): 767. doi:10.3390/biology12060767.