

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la Vie
Filière: Biologie Moléculaire
Spécialité/Option: Biologie Moléculaire et Cellulaire
Département :Biologie

Thème:

Contribution au comportement des levures « *Saccharomyces cerevisiae* » vis-à-vis des résidus du dioxyde de titane

Présenté par :

- Amairia Djihane.
- Benkacher Marwa.
- Chelihi Nabila.

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme Drif F.	M.C.A	Université 08 Mai 1945 - Guelma
Examineur :	Mr Bouchelaghem E.H.	M.C.B	Université 08 Mai 1945 - Guelma
Encadreur :	Mme Benosmane S.	M.C.B	Université 08 Mai 1945 - Guelma

Année universitaire: 2019/2020.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciement

Nous remercions en premier lieu, ALLAH le tout-puissant, de nous avoir donné le foie, le courage et la confiance en nous-mêmes pour pouvoir mener à terme ce présent travail.

Notre gratitude et notre profonde reconnaissance à notre promoteur:

Madame Benosmane Sana, pour nous avoir fait l'honneur de nous confier la réalisation de ce sujet et nous avoir permis de travailler sous sa responsabilité en nous guidant et nous encourageant, et aussi qui nous a guidé et aidé durant la réalisation de ce mémoire qu'elle trouve dans ces mots l'expression de nos vifs remerciements. Nous aimerions également remercier très particulièrement et solennellement tous les membres du jury de l'université de Guelma , **Madame Drif F.**, pour l'intérêt et l'attention qu'elle a accordé à ce travail, et pour avoir accepté d'être la Présidente du Jury, nous remercions très vivement **Monsieur Bouchelaghem E.H.**, pour sa disponibilité, sa grande patience, et toutes les corrections qu'il

abien voulu apporter à ce travail et pour avoir accepté d'en être l'examineur. Merci du fond du cœur. Enfin on voudrait également exprimer nos remerciement à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents : autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soientelles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

Qu'Allah, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, qui étude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A mes chers frères « Abdennour, Abdelghani, Mustapha, Loukmene », mes chères sœurs « Norelhouda et Sara », mon futur mari Djalel, et bien sur « Nourchahine », le petit ange qui fait la joie de la famille,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Puisse Allah vous garder et vous protéger et que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

Ames tantes, mes oncles et à toute ma famille, je vous remercie pour vos encouragements.

A mes très chers amis : « Iman, Nabila, Mouna et Djihane » : pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passés avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert et de votre affection dont je ne peux me surpasser, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

A tous mes enseignants tout au long de mes études : Permettez-moi de vous témoigner tout le respect que vous méritez ainsi que ma profonde affection à tous ceux qui occupe une place dans mon cœur.

Marwa



Dédicace



Je dédie ce travail à mes très chers parents « Mohammed et Houria » : autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour

Rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

Qu'Allah, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A mes chers frères « Abd el malek, Abd el salam, Abd el Halim, Bilel et, mes chères sœurs « Linda et fatima »,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Puisse Allah vous garder et vous protéger et que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. A toute ma famille, je vous remercie pour vos encouragements.

A mes très chers amis : « Yousra, Marwa, Widad, Aya, Hadia et Djihane » : pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passés avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert, de votre affection dont je ne peux me surpasser, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

A tous mes enseignants tout au long de mes études : Permettez-moi de vous témoigner tout le respect que vous méritez ainsi que ma profonde affection à tous ceux qui occupent une place dans mon cœur.

Nabila



Dédicace



Je dédie ce travail à mes très chers parents: autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soientelles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

Qu'Allah, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, qui étude de l'esprit et vous protège de tout mal.

A mon cher frère «Seyfe Eddine », mes chères sœurs «Kawther et OK Oumaima » et mon futur mari Amine,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Puisse Allah vous garder et vous protéger et que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. A toute ma famille, je vous remercie pour vos encouragements.

A mes très chers amis : «Marwa, Nabila, Roufaida, Ikhlas, Ikram, Imane, Inase et Khawla » : pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passés avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert, de votre affection dont je ne peux me surpasser, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

A tous mes enseignants tout au long de mes études : Permettez-moi de vous témoigner tout le respect que vous méritez ainsi que ma profonde affection à tous ceux qui occupe une place dans mon cœur.



Djihane

Sommaire

Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	viii
Résumé	ix
Abstract	x
ملخص	xi
Introduction générale.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Historique et généralité de levures	4
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.1. Définition	5
2.2. Taxonomie	5
2.3. Caractéristiques	5
2.4. Métabolisme	8
2.4.1. En aérobiose.....	8
2.4.2. En anaérobiose	9
2.5. Cycle biologique.....	9
2.5.1. Reproduction asexuée	10
2.5.2. Reproduction sexuée	11
2.6. Conditions de culture de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.6.1. Des besoins nutritionnels	11
2.6.2. Besoins physico-chimiques.....	14
3. Généralité sur la toxicité	14
4. Le dioxyde de Titane.....	15
4.1. Généralités sur le dioxyde de titane.....	15
4.2. Propriétés du Dioxyde de titane	15
4.2.1. Propriétés structurales.....	15
4.2.2. Les propriétés physiques.....	16
4.2.3. Propriétés chimiques	17
4.3. Application du TiO ₂	17
4.4. Mode d'action	18
4.5. Toxicité du TiO ₂	19
4.5.1. Effet aigue	19
4.5.2. Effets chroniques	20
5. Intérêt de l'utilisation de Levure	21

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Objectif du travail	23
------------------------------	----

2. Matériel biologique	23
3. Matériel chimique	23
3.1. Définition de dioxyde de titane	23
4. Mode expérimental.....	24
4.1. Préparation de la culture de levures.....	24
4.1.1. Lavage de levure	24
4.1.2. Protocole de lavage	24
4.1.3. La mise en culture	24
4.2. Traitement.....	25
5. Les paramètres à étudier.....	25
5.1. Cinétique de croissance cellulaire	25
5.2. Calcul du pourcentage de réponse	26
5.3. Dosage des protéines totales.....	26
5.3.1. Principe de la méthode	27
5.3.2. Technique du dosage des protéines.....	27
5.4. Dosage des biomarqueurs enzymatiques.....	27
5.4.1. Mesure de l'activité Catalase (CAT).....	27
5.4.2. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST).....	28
5.5. Dosages des biomarqueurs non enzymatiques	29
5.5.1. Dosage du Glutathion (GSH)	29

Chapitre III : Discussion et conclusion

Discussion	32
1. Evaluation de l'effet toxique du Dioxyde de titane sur la croissance de <i>S. Cereviae</i>	33
2. L'effet de TiO ₂ sur les macromolécules (les protéines)	34
3. l'effet du TiO ₂ sur les biomarqueurs enzymatiques (CAT et GST) et non enzymatiques (GSH)	35
Conclusion.....	37
Perspectives.....	38
Références bibliographiques	41

Liste des abréviations

Abréviation	Mots correspondants
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
CAT	: Catalase
CL50	: Concentration létale pour 50% des individus
CE 50	: Concentration efficace qui entraîne 50% de l'effet maximum
DL50	: Dose létale à 50%
FeO	: Oxyde de fer
GPX	: Glutathion peroxydase.
GR	: Glutathion réductase
GST	: Glutathion-s-transférase
GSH	: Glutathion
H ₂ O ₂	: Peroxyde d'hydrogène
Mn ₂ O ₃	: Oxyde de manganèse.
NPs	: Nano-particules.
Mn	: Nanomatériaux
ROS	: Reactive oxygen species (Radicaux libres)
<i>S.cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
SOD	: Superoxyde-dismutase
TiO ₂	: Dioxyde de titane.
UV	: Ultra-violets
ZnO	: Oxyde de zinc

Liste des figures

Figure 1: Schéma général d'une cellule de levure.	8
Figure 2: Le cycle biologique de <i>Saccharomyces cerevisia</i>	10
Figure 3: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en bourgeonnement.	10
Figure 4: Multiplication par bourgeonnement.	11
Figure 5: Dioxyde de titane sous forme poudre.	15
Figure 6: Cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> au microscope optique état frais X400	23
Figure 7: Structure cristalline des phases de dioxyde de titane de rutilé, brookite et anatase.	16
Figure 8: Protocole expérimentale du dosage des protéines	27

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques physiques de Dioxyde de titane.....	16
--	----

Résumé

La réactivité des nanoparticules (NPs) dans les systèmes biologiques est bien connu, mais il y a d'énormes lacunes dans notre compréhension de la toxicité du NP chez les levures.

Les nanoparticules d'oxyde de Titane (TiO₂- NPs) sont des nanoparticules communes et largement utilisées dans de nombreux domaines tels que les produits de protection solaire, les cosmétiques, les pigments, les revêtements industriels, les additifs de matière plastique, les semi-conducteurs, les textiles et les agents antibactériens.

Dans notre travail, nous avons évalué l'effet des TiO₂-NPs sur un modèle levurien (*Saccharomyces cerevisiae*), largement utilisée en biologie cellulaire et moléculaire et parmi les modèles de base en expérimentation toxicologique.

Le métabolisme et le stress oxydant ont été évalués par le suivi de la croissance, le taux des protéines totales et les biomarqueurs du stress oxydatif.

Les résultats des travaux déjà menés sur l'impact des nanoparticules (TiO₂) sur les micro-organismes et particulièrement la levure (*S. cerevisiae*) ont indiqué qu'ils y'avait des effets indésirable surtout sur la croissance cellulaire de levures exposées à des concentrations élevées de NPs, ainsi qu'il y'avait des changements remarquables sur les autres biomolécules (protéines totales, GSH, GST, CAT) des micro-organismes similaire de la levure, ce qui indique clairement le déclenchement d'un stress oxydatif.

Tandis que d'autres travaux ont constaté une non toxicité du NPs-TiO₂ à des concentrations importantes sur des organismes unicellulaires.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, NPs-TiO₂, biomarqueures, risque toxicologie, stress oxydatif.

Abstract

The reactivity of nanoparticles (NPs) in biological systems is well known, but there are huge gaps in our understanding of NP toxicity in yeast.

Titanium oxide nanoparticles (TiO₂- NPs) are common and widely used nanoparticles in many areas such as sunscreen products, cosmetics, pigments, industrial coatings, plastic additives, semiconductors, textiles and antibacterial agents.

In our work, we evaluated the effect of TiO₂-NPs in a yeast model (*Saccharomyces cerevisiae*), widely used in cell and molecular biology and among basic models in toxicological experimentation.

Metabolism and oxidative stress were evaluated by monitoring growth, total protein levels and biomarkers of oxidative stress.

The results of previous work on the impact of nanoparticles (TiO₂) on microorganisms and particularly yeast (*S. cerevisiae*) indicated that there were adverse effects mainly on the cell growth of yeast exposed to high concentrations of NPs, as well as noticeable changes on other bio-molecules (total proteins, GSH, GST, CAT) of yeast-like microorganisms, which clearly indicate the onset of oxidative stress.

While other work has found non-toxicity of NPs-TiO₂ at significant concentrations in single-celled organisms.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, NPs-TiO₂, biomarkers, toxicological risk, oxidative stress.

ملخص

إن تفاعل الجسيمات النانوية (NPs) في الأنظمة البيولوجية معروف جيداً ، ولكن هناك فجوات كبيرة في فهمنا لسمية NP في الخمائر.

الجسيمات النانوية لأوكسيد التيتانيوم (TiO_2 - NPs) هي جسيمات نانوية شائعة وتستخدم على نطاق واسع في العديد من المجالات مثل منتجات الحماية من الشمس ، ومستحضرات التجميل ، والأصبغ ، والطلاءات الصناعية ، والإضافات البلاستيكية ، وشبه الموصلات والمنسوجات والعوامل المضادة للبكتيريا.

في عملنا ، قمنا بتقييم تأثير TiO_2 -NPs على نموذج الخميرة (*Saccharomyces cerevisiae*) ، المستخدم على نطاق واسع في البيولوجيا الخلوية والجزيئية وبين النماذج الأساسية في التجارب السمية.

تم تقييم الأيض والإجهاد التأكسدي من خلال مراقبة النمو ومستوى البروتين الكلي والعلامات الحيوية للإجهاد التأكسدي.

أشارت نتائج دراسات تمت بالفعل من قبل على تأثير الجسيمات النانوية (TiO_2) على الكائنات الحية الدقيقة وخاصة الخميرة (*S. cerevisiae*) إلى وجود تأثيرات غير مرغوب فيها خاصة على نمو الخلايا في الخمائر المعرضة الى تركيزات عالية من NPs، وكذلك كانت هناك تغييرات ملحوظة في الجزيئات الحيوية الأخرى (البروتينات الكلية، GSH، GST، CAT) للكائنات الحية الدقيقة التي تشبه الخميرة ، والتي تشير بوضوح إلى بداية الإجهاد التأكسدي.

بينما وجدت دراسات أخرى تشير الى عدم سمية TiO_2 -NPs بتركيزات عالية على الكائنات وحيدة الخلية.

الكلمات الأساسية: *Saccharomyces cerevisiae* ، TiO_2 -NPs ، المؤشرات الحيوية ، مخاطر السموم ، الإجهاد التأكسدي.

Introduction générale

Sous le terme générique micro-organismes, sont regroupés des êtres vivants microscopiques et ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. On considère qu'ils sont apparus il y a environ 3,8 milliards d'années et leur mise en évidence, qui a bénéficié des progrès de l'optique, remonte au XVII^e siècle. Ces micro-organismes seront observés pour la première fois en 1677 par Antoni van Leeuwenhoek et son microscope.

A partir de 1857, Louis Pasteur met en évidence le rôle des micro-organismes dans les fermentations lactique et alcoolique.

Ils sont avant tout indispensables à l'équilibre de la biosphère en participant aux cycles élémentaires de la nature, mais peuvent s'avérer néfastes. Ils sont également largement utilisés pour la production de biens ou de services dans le contexte des biotechnologies.

Les micro-organismes participent ainsi au développement de la biotechnologie, il s'avère donc indispensable d'avoir une idée sur les différents types de micro-organisme qui existent, leur influence sur le développement de la biotechnologie, leur utilité et leurs limites [1].

D'après son étymologie, le mot micro-organisme signifie « petit organisme ». En effet, les micro-organismes sont de minuscules organismes vivants invisibles à l'œil nu et présents presque partout sur terre. Ils ont un rôle essentiel dans la nature mais sont source de nombreux problèmes dans l'industrie alimentaire. Leur activité métabolique modifie la composition des aliments qu'ils ont infecté (**Guiraud et Joseph-Pierre, 2012**). Le terme de micro-organisme englobe à la fois les bactéries, certains champignons (moisissures, levures) mais aussi les virus (pour certains biologistes). Ces organismes sont donc un groupe très hétérogène (comprenant des procaryotes et des eucaryotes) dont les seuls points communs sont la taille et la forme [2].

C'est avec la production d'aliments fermentés que l'utilisation empirique de micro-organismes pour la conservation des aliments annonce la naissance des biotechnologies dès le néolithique.

Les substances chimiques font partie de notre vie quotidienne, Toute matière vivante ou inanimée est composée de substances chimiques et la fabrication de la quasi-totalité des produits implique l'utilisation de substances chimiques.

Correctement utilisés, de nombreux produits chimiques peuvent contribuer sensiblement à l'amélioration de notre qualité de vie, de notre santé et de notre bien-être. Mais d'autres sont très dangereux et mal gérés, ils peuvent avoir un effet nocif sur la santé et l'environnement [3].

Parmi ces produits chimiques se trouvent les xénobiotiques ; les xénobiotiques sont des produits de synthèse, pour la plupart issus de l'industrie agrochimique et pharmaceutique, autrement dit les pesticides et les médicaments.

Le Xénobiotique en lui-même n'est pas dangereux, La toxicité vient de la réaction complexe entre le corps étranger et la structure moléculaire de l'organisme sur laquelle il vient se fixer [4].

Les pesticides et les additifs alimentaires sont les xénobiotiques les plus répandus. Un additif alimentaire est une substance qui n'est pas habituellement consommée comme un aliment ou utilisée comme un ingrédient dans l'alimentation.

Ces composés sont ajoutés aux denrées dans un but technologique au stade de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, du transport ou de l'entreposage des denrées et se retrouvent donc dans la composition du produit fini [5].

Leur Rôle :garantir la qualité sanitaire des aliments (conservateurs, antioxydants), améliorer l'aspect et le goût d'une denrée (colorants, édulcorants, exhausteurs de goût), conférer une texture particulière (épaississants, gélifiants) et garantir la stabilité du produit (émulsifiant) [6].

La première partie de ce mémoire est consacré e à une étude bibliographique et une revue générale de la littérature.

Nous avons ainsi présenté nos micro-organisme *Saccharomyces cerevisiae* ; leur caractéristiques ;métabolisme ; cycle biologique et leur conditions de culture .et nous avons aussi présenté nos molécule chimique, en l'occurrence le dioxyde de titane ; leur utilisations, mode d'action et toxicité ; et à partir de ces données, nous avons pu mettre au point, une stratégie bien structuré pour mener nos série d'expérimentation et justifier par la même les objectifs et les méthodes utilisées.

La deuxième partie correspond à l'étude expérimentale proprement dite avec une revue générale sur les différents essais à réaliser.

Ce travail est clôturé par une discussion générale suivie de conclusion et perspectives.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

1. Historique et généralité de levures :

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisées par l'homme depuis des Millénaire, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation (**Bouix et Leveau, 1991; Pol, 1996**). Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par **Van Leeuwenhoek A. en 1680** qui les à dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. À l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (**pol, 1996**).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un des microorganismes les plus utilisés dans le domaine des biotechnologies. Notamment, pour la production du vin, de la bière et du pain. Mais aussi, elle est largement utilisée comme "usine cellulaire" pour plusieurs applications, comme la production de protéines recombinantes d'intérêt pharmaceutique, de divers produits chimiques et plus récemment pour la production de bioéthanol (**Lim et al., 2011; Martin et al., 2012; Neagu et Bahrim, 2012**).

- **Généralités sur les levures :**

Les levures sont des champignons unicellulaires qui présentent donc une structure cellulaire eucaryote. Quoique les cellules des levures ne soient pas mobiles par elles-mêmes, l'état unicellulaire favorise leur dissémination dans les liquides qui constituent leur milieu de prédilection surtout lorsqu'ils sont sucrés. Mais on trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les sols, dans les eaux et dans l'atmosphère.

Les levures furent reconnues comme "des champignons" par **DeBary en 1866** lorsqu'il détecta des ascospores chez les levures de bière.

L'état unicellulaire, la capacité de se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des microorganismes procaryotes. Comme l'écrivait **Watson**, ce sont «les *Escherichia Coli*. Des eucaryotes» (**Bounicourt, 1995**).

2. *Saccharomyces cerevisiae* :

2.1. Définition :

Selon **Larpen et Gourgaud (1985)**, *Saccharomyces cerevisiae* vient du mot saccharose qui signifie «sucre», mycès « champignon ». Tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», est un terme scientifique, qui est le nom qu'on donnait autrefois à la bière.

Ainsi, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures intervenant dans la fermentation. Donc, elle est littéralement connue comme levure du sucre.

Les levures sont des eucaryotes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leurs caractères unicellulaires. Elles sont microscopiques et immobiles (**Guiraud et Galzy, 1998**).

2.2. Taxonomie :

La place de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* dans la classification de levure est comme suite (**Bacha A .2008**) :

Règne : champignons

Classe : Ascomycètes

Sous Classe : Héli-ascomycètes

Ordre : Endomycétales

Famille : saccharomycetaceae

Sous famille : saccharomycetoideae

Genre : *Saccharomyces*

Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Caractéristiques :

Les cellules de levures du genre *saccharomyces*, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, sont arrondies, plus ou moins ovalaires, elles ont la forme d'une ellipsoïde de révolution dont le grand axe atteint une longueur d'environ 5 µm chez les cellules diploïdes.

L'aspect de levure à la coloration de Gram, on peut visualiser les parois (translucides) qui entourent les cellules.

- **la paroi** : c'est une structure dynamique externe qui englobe toute la cellule conférant sa rigidité et sa forme caractéristique. Elle représente 15 à 20% de la matière sèche de la cellule, d'épaisseur 150 à 230 nm. Sa composition chimique qui est sujette à des variations importantes suivant les espèces, le cycle cellulaire et les conditions de culture (**Aguilar- Uscanga et François, 2003**). Comprend environ 80% de polysaccharides principalement des mannanes(**Peat et al., 1961; Gorin et al., 1969 et Mc Ellan et Lampin, 1969**).Et des glucanes (**Bacon et al., 1969; Manners et masson, 1969**), en proportion quasi égales, 10 à 20% de protéines, 7 à 10% de lipides, 5% de sels minéraux et 1 à 3% de chitine qui se trouve majoritairement au niveau des cicatrices de bourgeonnement afin de maintenir l'intégrité de la paroi (**Suarit et al., 1988; Lipke et Ovalle, 1998**). La couche intérieure de la paroi est en grande partie responsable de sa force mécanique et fournit aussi les sites d'attachement pour les protéines qui forment sa couche extérieure (**Klis et al., 2002**).
- **L'espace périplasmique** : c'est un espace qui est délimité par la membrane plasmique et la couche interne de la paroi et représente le seul site de localisation cellulaire des enzymes telles que l'invertase (**Neumann et Lampen, 1967**). la phosphatase acide (**Schurr et Yagile, 1971 ; Arnold, 1981**), les β -galactosidases, les β -glucanases (1-3) et β (1-6) et des protéases (**Barnett et Robinow, 2002**).
- **Une membrane cytoplasmique** : c'est une membrane simple et fragile qui se trouve sous la paroi avec une épaisseur de 7,5 nm, retenant l'ensemble des constituants intracellulaires et résistante aux pH acides mais altérée par des pH alcalins. Les membranes biologiques sont composées de deux types de constituants principaux: les lipides et les protéines. La diversité des membranes étant très grande, les compositions lipidiques diffèrent selon les organismes. Dans la composition lipidique de la membrane plasmique, on distingue les phospholipides et les stérols. Parmi ces derniers c'est l'ergostérol qui est le dérivé majeur et dont la teneur varie d'une espèce à l'autre et en fonction de l'âge des cellules. Les autres stérols sont des précurseurs de l'ergostérol (**Bayley et Parks, 1975**).

- **le cytoplasme** : Le cytoplasme renferme en plus des organites cellulaires tels que les mitochondries (qui contiennent des ADN, ARN, ARN polymérase et des enzymes respiratoires) et l'appareil de Golgi, des vacuoles et des ribosomes. Il contient également des enzymes, notamment celles de la glycolyse et de la fermentation alcoolique, des polysaccharides, des polyphosphates, du glycogène et du tréhalose (**Larpent, 1991**).
- **Le noyau et le réticulum endoplasmique** : La levure possède en général un seul noyau qui est entouré d'une enveloppe à deux membranes où la membrane externe est en relation continue avec un système membranaire cytoplasmique important, le réticulum endoplasmique. En de multiples endroits les membranes externe et interne fusionnent pour former des pores, ces derniers permettent les échanges entre le noyau et le reste de la cellule. Il contient le génome de la levure qui est réparti sur les chromosomes dont la structure est semblable à celle des autres eucaryotes avec un enroulement de l'ADN en «grains de chapelet» formés par des nucléosomes constitués d'histones de type H2a, H2b, H3 et H4.
- **Les mitochondries** : Lorsque les levures se développent en aérobiose, elles possèdent de 30 à 50 mitochondries bien développées dans lesquelles la membrane interne forme de nombreux replis en crêtes. En anaérobiose, ces organismes dégénèrent, leur surface interne décroît, les crêtes disparaissent (**Larpent, 1997**).
- **Les caractéristiques génétiques** :
 - **Chromosome** : les levures sont des organismes eucaryotes et possèdent un noyau avec des chromosomes linéaires. Chez les Saccharomyces, les chromosomes sont au nombre de 16 simples ou 16 paires selon la forme haploïde ou diploïde de la cellule.
 - **plasmide** : à côté des chromosomes, il existe dans le noyau des petites molécules d'ADN circulaire d'environ 6000 paires de base, les plasmides, présents entre 50 et 100 exemplaires par cellule. Ces plasmides sont autorépliquables et autotransférables sans affecter la viabilité de la cellule. Ils portent l'information génétique de quelques caractères non essentiels à la viabilité de la levure.
 - **ADN mitochondrial** : chaque mitochondrie renferme plusieurs molécules circulaires d'ADN de certaines enzymes de la chaîne respiratoire (**Atailia et Bousena, 2012**).

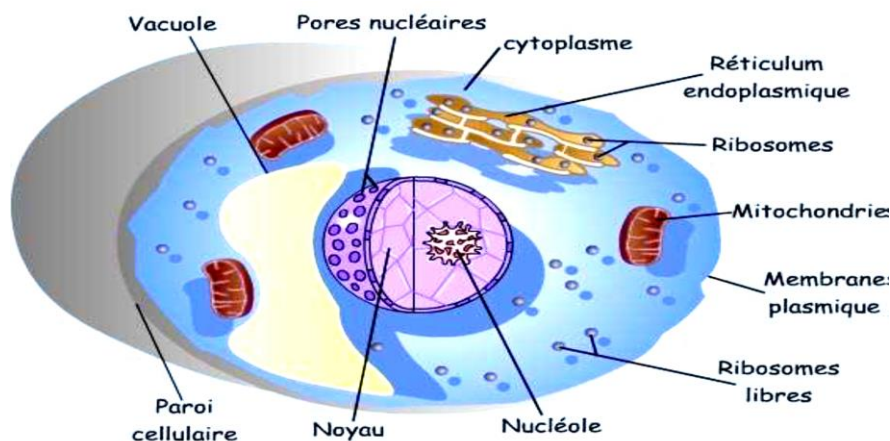


Figure 1 : Schéma général d'une cellule de levure (Guery et Mcirdi, 1994).

2.4. Métabolisme :

La levure comme tout être vivant vit en présence d'oxygène (aérobiose). Mais elle a aussi la remarquable faculté de s'adapter à un milieu sans air (anaérobiose). Pour assurer ses dépenses énergétiques, elle peut utiliser différents substrats carbonés, principalement des sucres. Il faut noter que le glucose est l'aliment carboné préférentiel de *S. cerevisiae* (Queiroz, 1991). En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolismes (Botton, 1991).

2.4.1. En aérobiose :

Lorsque la levure se trouve en présence d'air, elle produit à partir du sucre et de l'oxygène du gaz carbonique, de l'eau et une grande quantité d'énergie. C'est le processus métabolique de la respiration. Dans ces conditions l'oxydation du glucose est complète (Guinet et Godon, 1994). Elle extrait ainsi 40% de l'énergie contenue dans ce métabolite. Grâce à cette énergie, elle réalisera ses travaux cellulaires et se reproduira par bourgeonnement. Selon (Scriban, 1988 ; Guinet et Godon, 1994 ; Hesclot et Vladescu, 1994 ; Ferreira et Fennesy, 1997 ; Guiraud, 1998), la réaction est la suivante :

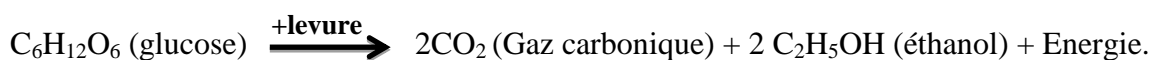


Il se forme donc 13 fois plus d'ATP que par métabolisme anaérobie (Vladescu, 1994 ; Bellam et Fould, 1996 ; Ferreira et Fennesy, 1997). Toute l'énergie biochimique potentielle contenue dans le glucose étant libérée, la levure peut seulement assurer son maintien en vie, mais aussi synthétiser de la matière organique. Donc elle va entrer en croissance et se multiplier.

La respiration fait intervenir de nombreuses enzymes mitochondriales. Cette fois, le pyruvate, en présence d'oxygène sera transformée en acétyl coenzyme A qui permettra l'entrée dans un cycle de dégradation des acides tricarboxyliques (Cycle de Krebs). La chaîne respiratoire, dont le rendement énergétique est beaucoup plus efficace, est préférentiellement utilisée par la levure. Néanmoins, cette préférence est limitée par l'effet Crabtree (**Guinet et Godon, 1994**).

2.4.2. En anaérobiose :

Lorsque la levure ne dispose pas d'oxygène, elle peut néanmoins utiliser des sucres pour produire l'énergie nécessaire à son maintien en vie. Ce processus métabolique a été défini par Pasteur comme étant celui de la fermentation. Les sucres sont transformés en gaz carbonique et en alcool (**Leyral et Vierlin, 2007 ; Lai, 2010**). L'oxydation du glucose est incomplète on parle de fermentation ou de vie sans air (Regnault, 1990). Selon **Scriban (1988), Guinet et Godon (1994), Hesclot et Vladescu (1994), et Ferreira et Fennes (1997), Guiraud (1998)**, la réaction est la suivante :



L'alcool formé contient encore beaucoup d'énergie. Il n'y a donc qu'une partie de l'énergie biochimique potentiellement présente dans le glucose qui a été libérée. Minimum vital à la levure, sans lui permettant de se multiplier rapidement (**Guinet et Godon, 1994**).

Ce métabolisme se caractérise généralement par un ensemble de réactions qui se produisent en absence d'oxygène comme accepteur final d'électron.

Le métabolisme en anaérobiose porte le nom scientifique de glycolyse, Il s'agit de la dégradation des glucides en pyruvate, qui fait intervenir 30 à 65 % des protéines cellulaires que constituent les enzymes. Le glucose qui est un sucre à 6 atomes de carbone pénètre dans la cellule où il subit des phosphorylations consommatrices d'énergie avant d'être scindé en 2 molécules et à 3 atomes de carbone.

Ces dernières entrent chacune dans une série de réactions aboutissant au pyruvate, qui en l'absence d'oxygène est transformé en acétaldéhyde puis en éthanol et sera ensuite excrété par la cellule (**Guinet et Godon 1994 ; Tchango, 1996**).

2.5. Cycle biologique :

Une levure présente un cycle haplodiplophasique. La plupart d'entre elles peuvent se multiplier par reproduction asexuée aussi bien sous la forme haploïde.

A l'état diploïde, elles peuvent aussi subir la méiose et donner alors des spores haploïdes capables de se multiplier par voie asexuée en un clone haploïde. Deux cellules haploïdes de signe sexuel opposé peuvent fusionner (Fig 2).

Le zygote qui en résulte est à l'origine de la phase diploïde du cycle (**Didier, 1996**).

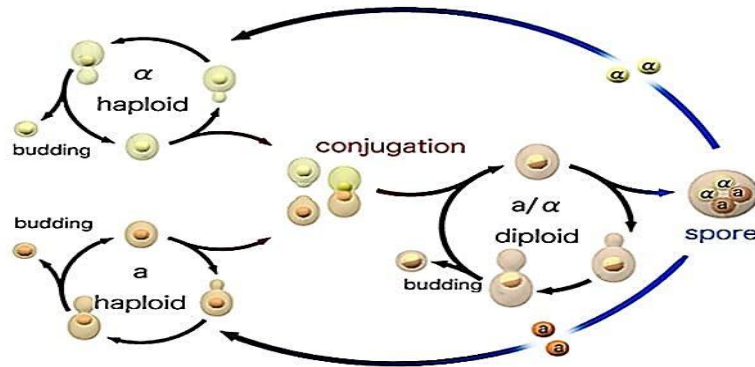


Figure 2 : Le cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae* [7].

2.5.1. Reproduction asexuée :

La multiplication asexuée s'effectue chez *saccharomyces cerevisiae* par une forme de division cellulaire atypique : " le bourgeonnement " (**Didier, 1996**).

Le bourgeonnement :

Les cellules de *S. cerevisiae* ont un mode de division cellulaire assez exceptionnel. Chez les eucaryotes, le bourgeonnement, qui crée une différence dans la durée individuelle des cycles. En effet, le bourgeon est plus petit que la cellule mère à l'issue de la division, d'où une période de croissance plus longue qu'il ne produise lui-même un nouveau bourgeon, faute de quoi les cellules deviendraient plus petites à chaque division (**Thuriaux, 2004**).

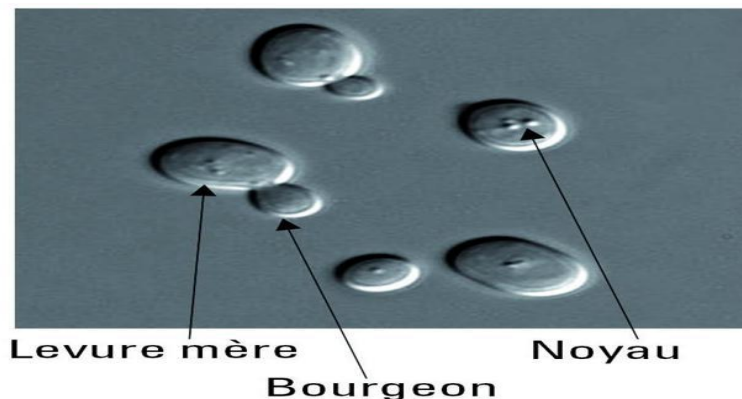


Figure 3: *Saccharomyces cerevisiae* en bourgeonnement (**Kreger-Van, 1984**).

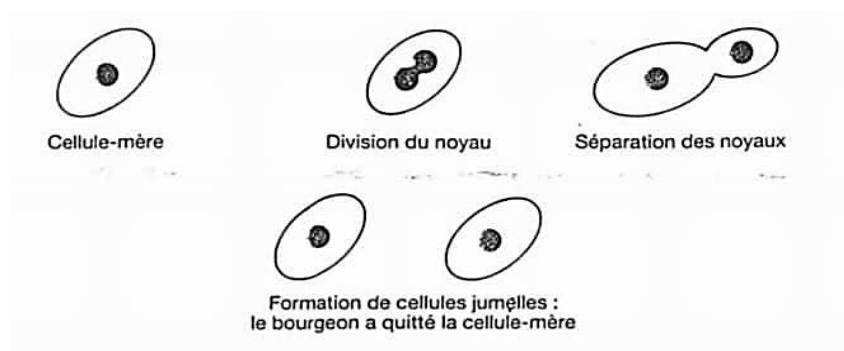


Figure 4: Multiplication par bourgeonnement (Bellam et Fould Springer, 1996).

2.5.2. Reproduction sexuée:

Chez *S. cerevisiae* les spores issues de la méiose germent pour donner des cellules haploïdes qui, en milieu riche, produisent en permanence la phéromone sexuelle correspondant aux haplotypes MATa et MATa. Ces cellules s'engagent donc spontanément dans un processus de fécondation qui produit un zygote ou les deux noyaux fusionnent immédiatement formant un diploïde MATa /MATa qui est certes compétent pour la méiose, mais où celle-ci ne se produit que dans des conditions de carence sévère, et pour autant que les cellules soient compétentes pour la respiration la présence d'acétate favorise la méiose pour des raisons inconnues (Thuriaux, 2004).

2.6. Conditions de culture de la *Saccharomyces cerevisiae* :

Pour sa culture, la levure boulangère exige certaines conditions tels que :

2.6.1. Des besoins nutritionnels :

Les nutriments sont apportés au milieu de culture de façon graduelle pour maintenir une faible concentration de glucose afin d'encourager la respiration et la reproduction cellulaire des levures. Les éléments chimiques nécessaires à la croissance des levures sont :

a) Le Carbone :

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, etc. (Aguilar-Uscanga, 2003). Les levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* peuvent fermenter le glucose, le saccharose, le maltose, le raffinose, le cellobiose et le galactose et peuvent assimiler l'éthanol, l'acide lactique, l'acide citrique (Aguilar-Uscanga, 2003).

b) L'Azote :

L'azote joue un rôle capital il entre dans la constitution de molécules simples et des macromolécules essentielle au fonctionnement cellulaire. La plupart des levures sont capables d'utiliser les sources azotés minérales simples, mais aussi des composés organiques divers, tels que les acides aminés et les peptides (**Larpent, 1990**). En levurerie, l'apport d'azote est assuré par l'addition de l'urée, des sels d'ammonium comme le sulfate d'ammonium ou le dihydrogénophosphate d'ammonium.

c) Le Phosphore:

Source de Phosphore : dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), ou hydrogénophosphatedisodique (Na_2HPO_4) (**Leblonc, 1988**). L'ion PO_4^{3-} régule la synthèse des lipides et des glucides.

En conditions limitantes, la cellule synthétise une phosphatase acide appartenant à la paroi qui libère du phosphore à partir d'esters phosphoriques.

Le phosphore est utilisé pour la synthèse des acides nucléiques, nucléosides di et triphosphates et polymères de polyphosphates. Il est intimement lié au mécanisme de la fermentation alcoolique.

d) Le Magnésium :

Sulfate ou chlorure de magnésium active les multiples enzymes glycolytiques, stimule la synthèse des acides gras, régule les ATPases membranaires, participe avec K^+ à la pénétration du phosphate. Enfin, il est impliqué dans la structure des ribosomes, de la membrane cellulaire et des acides nucléiques. (**Leblonc, 1988 ; Leveau et Bouix, 1993**).

e) Le Manganèse :

Il augmente le niveau d'azote, la synthèse protéique et la croissance. Le manganèse peut remplacer le calcium et s'avère 500 fois plus efficace pour favoriser le processus du cycle cellulaire (**Loukin et Kung, 1995**).

f) Le Soufre :

Source de soufre : sulfate d'ammonium, méthionine, sulfites, thiosulfate. Le soufre est utilisé à 60 % dans les protéines, à 5 % sous forme de sulfate inorganique et il participe à la formation d'acides aminés soufrés et de vitamines. La méthionine permet une croissance plus rapide qu'avec les ions sulfate (**Leveau et Bouix, 1993**).

g) Le Potassium :

C'est l'élément minéral quantitativement le plus important. Source de Potassium :phosphate mono et dipotassique (K_2HPO_4 ou KH_2PO_4). Le potassium intervient dans les échanges avec les cations métalliques ; il stimule la respiration et la fermentation à $pH < 7$; c'est un effecteur de nombreuses enzymes, enfin, il intervient dans la structure des ARN. La consommation est 2 fois plus grande en fermentation qu'en respiration (**Leveau et Bouix, 1993**).

h) Le Zinc :

Il a un rôle essentiel car c'est un co-facteur enzymatique indispensable dans la glycolyse. Il est nécessaire à la synthèse de vitamines (riboflavine), stimule l'action du magnésium et la pénétration du maltose et du maltotriose. La carence en traces de zinc réduit le pouvoir fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae*. (**Guinet et Godon, 1994 ;Leveau et Bouix, 1993**).

i) Autre minéraux :

Ils sont nécessaires à l'état de traces, mais ils jouent un rôle primordial dans l'activation de certaines réactions enzymatiques. Ainsi dans la constitution de certaines vitamines et des coenzymes (**Scriban, 1984**). D'après Simon et Munier (1970), ces éléments sont en général présents en quantité suffisante dans les divers constituants carbonés ou azotés du milieu de culture. Parmi ces éléments, nous citons : le cuivre, le fer, le cobalt, zinc, manganèse.

j) Les vitamines :

Les vitamines du groupe B ont été identifiées comme étant des facteurs de croissance : biotine (B8), acide pantothénique (B5), inositol (B7), thiamine (B1), pyridoxine (B6) et niacine (B3) (**Guinet et Godon, 1994**). On appelle «facteur de croissance », toute substance organique, apportée en petite quantité, dont la carence perturbe le métabolisme de la levure. Ce sont des métabolites essentiels : ils sont indispensables aux micro-organismes auxotrophes. Ils doivent leur être fournis car ils sont, pour la plupart, incapables de les synthétiser (**Leblonc,1988**). En leur absence, il n'y a pas fermentation ; quand ils sont épuisés, la fermentation s'arrête.

2.6.2. Besoins physico-chimiques :

a) La température :

En général, la température de croissance optimale des levures est comprise entre 25-35 °C (Larpen, 1990).

b) Le pH :

Le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites (Larpen, 1990). Les levures poussent mieux à des pH relativement acides (3-6). L'optimum de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* se situe souvent entre (4- 4,5) (Noui, 2001).

c) L'aération :

Elle a pour but d'une part d'apporter l'oxygène nécessaire à la croissance des levures et d'autre part d'homogénéiser et d'assurer la circulation du moût dans le fermenteur. Cependant, il est intéressant de rappeler que la levure boulangère s'adapte à deux modes de vie, en présence ou en absence d'oxygène (Noui, 2001).

d) La pression osmotique :

Elle intervient également sur le développement des levures (Leclerc, 1975). La levure "*Saccharomyces cerevisiae*" est une espèce osmophile qui peut se développer sur des milieux à forte concentration en sucre ou en sel (Larpen, 1991).

3. Généralité sur la toxicité :

La toxicité d'un composé chimique étranger à l'organisme (xénobiotique) est une caractéristique biologique qui dépend de la structure atomique ou moléculaire du composé, et donc de son interaction avec la matière vivante.

Cette toxicité dépend aussi de la dose du xénobiotique nécessaire pour produire un effet.

Plus les effets néfastes d'un xénobiotique sont importants, plus la dose limite de ce composé est faible, et plus ce composé est toxique. Cette toxicité est exprimée en dose létale capable de tuer 50% d'une population : la DL 50 (Klaassen, 2001).

4. Le dioxyde de Titane :

4.1. Généralités sur le dioxyde de titane :

Le dioxyde de titane (TiO_2) est un oxyde naturel du titane (Ti) le neuvième élément chimique le plus abondant de la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium (0,6 %). Il appartient à la famille chimique des oxydes des métaux de transition (**Buzea et al., 2007**).

Le TiO_2 utilisé dans l'industrie est extrait de gisements constitués de différentes formes minérales de Ti. C'est un composé très inerte qui est extrait à partir des minerais par un procédé utilisant des chlorures ou par des traitements à l'acide sulfurique.

Il a un indice de réfraction particulièrement élevé et son insensibilité à la lumière visible, en raison de sa large bande interdite lui permet de s'absorber que dans le proche ultraviolet.

Il existe principalement sous 3 formes cristallines : le rutile, l'anatase et la brookite, qui se distinguent par un motif cristallin différent.

Le rutile est le minéral qui contient le plus de TiO_2 (85-90 %) mais il est peu disponible naturellement. De ce fait, le TiO_2 utilisé dans les produits de consommation est majoritairement extrait d'autres minerais plus abondants (**Pautrat, 2011**).



Figure 5: Dioxyde de titane sous forme poudre [8].

4.2. Propriétés du Dioxyde de titane :

4.2.1. Propriétés structurales :

Le Dioxyde de Titane TiO_2 se trouve dans la nature sous trois différentes formes Cristallographiques qui sont, dans l'ordre d'abondance, le rutile, l'anatase et la brookite. L'anatase est la phase plus stable à l'échelle nanométrique. A des pressions élevées, le TiO_2 possède un diagramme de phase riche avec plusieurs séquences de transformations de phases, dont la dernière phase accessible à des pressions de 60 GPa est la cotunnite.

Ce matériau serait (Oganov, et Lyakhov, 2010) en outre l'oxyde le plus dur, découvert à ce jour (Muscat et al., 2002).

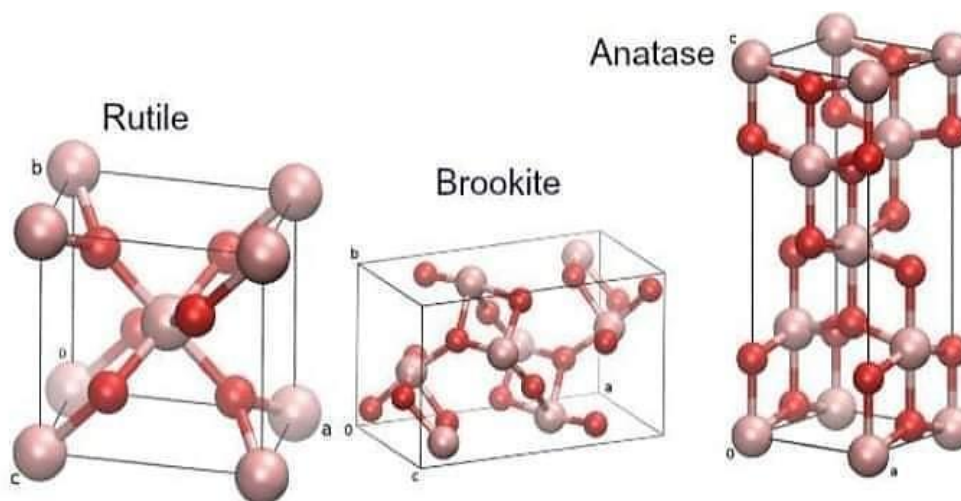


Figure 6: Structure cristalline des phases de dioxyde de titane de rutile, brookite et anatase (Pelaez et al., 2012).

4.2.2. Les propriétés physiques :

Les propriétés physiques du Dioxyde de titane sont résumées dans le tableau :

Tableau 1: caractéristiques physiques de Dioxyde de titane (IARC, 2010).

Formule allotropique	Rutile	Anatase	Brookite
Masse molaire :	79.9	79.9	79.9
Structure cristalline :	Quadratique	Quadratique	Orthorhombique
Point de fusion :	1830-1850° C avec des compositions à 1860°C	transforme en rutile à partir de 915°C	Se transforme en rutile à partir de 750°C
Point d'ébullition :	à partir de 2500° C	À partir de 2500° C	À partir de 2500° C
Densité (D) :	4.13- 4.24	3.8- 3.9	4.13
Indice de réfraction (à 550nm) :	2.75	2.54	-

4.2.3. Propriétés chimiques :

Le TiO_2 non ultra- fin est un produit très peu réactif. Il n'est pas attaqué par les acides chlorhydrique ou nitrique, mais attaqué par l'acide sulfurique concentré chaud ainsi que par l'acide fluorhydrique avec lequel il forme l'acide fluotitanique. Il peut également être attaqué par les bases concentrées.

Le lithium, le magnésium et le zinc peuvent réduire le Dioxyde de titane avec plus ou moins d'incandescence. En raison de leurs surface spécifique plus élevée, le Dioxyde de titane présente des propriétés photocatalytiques améliorées par rapport aux particules de plus grande taille : elles sont susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, radical superoxyde) après exposition aux rayons ultraviolets et réactions avec l'eau ou l'oxygène [9].

4.3. Application du TiO_2 :

L'oxyde de titane est parmi les produits les plus utilisés dans le monde, l'oxyde de Titane avec un volume de vente annuel supérieur à 3,5 millions de tonnes et une consommation mondiale augmentant d'environ 2% par an.

Il est produit industriellement depuis le 20ème siècle comme pigment pour peintures blanches, en remplacement des oxydes de plomb, très toxiques.

Le dioxyde de titane est utilisé dans les denrées alimentaire, est interdit en France depuis le 1^{er} janvier 2020 et en 2006, détecté par le centre international de recherche sur le cancer comme un des substances cancérigènes chez l'homme (Groupe 2B).

Du fait de ces propriétés, on peut trouver différents champs d'applications pour le TiO_2 , micrométrique et nanométrique:

a) Comme pigment :

Un peu moins de 4 millions de tonnes de TiO_2 sont consommés dans le monde chaque année. Son indice de réfraction et sa blancheur font qu'il est utilisé également, pour la même raison, dans la composition de médicaments et dentifrices.

Enfin, le TiO_2 est un colorant alimentaire (**Sambandan et Ratner, 2011**).

b) Dans les écrans solaires :

Le TiO_2 est beaucoup utilisé dans l'industrie cosmétique comme pigment mais aussi comme écran solaire, du fait de son indice de réfraction et de ses propriétés d'absorption d'UV. Le TiO_2 est, à l'heure actuelle, utilisé dans presque toutes les crèmes solaires, car les absorbeurs d'UV minéraux (à base de TiO_2 ou d'oxyde de Zinc) entraînent moins de problèmes de photoallergie que les absorbeurs d'UV chimiques. De plus, le TiO_2 nanométrique est plus intéressant que le TiO_2 micrométrique pour les crèmes solaires car il laisse moins de traces sur la peau (**Sambandan et Ratner, 2011**).

c) Dans les implants biologiques :

Le TiO_2 micrométrique a longtemps été considéré comme un matériau inerte, ce qui en faisait un bon composant des implants biologiques. De plus, la présence de TiO_2 nanométrique dans les implants biologiques permet d'augmenter la prolifération et la différenciation cellulaire, ce qui augmente la biocompatibilité de l'implant comparé aux implants contenant du TiO_2 (**Mendonça et al., 2008**).

d) Comme photocatalyste :

Les UV adsorbés à la surface du TiO_2 nanométrique permettent d'oxyder l'eau en O_2 et H_2 . Il peut également oxyder l'oxygène ou la matière organique, ce qui fait qu'il est également incorporé dans les peintures, ciments ou fenêtres pour ses propriétés autonettoyantes, bactéricides et désodorisantes, micrométrique (**Fujishima et Honda, 1972**).

4.4. Mode d'action :

Le TiO_2 a des effets indésirables (cytotoxicité, dommages à l'ADN) liés à sa forme cristalline (rutile ou anatase) et à la surface spécifique très grande (particules nanométriques). Cependant, en l'état actuel des connaissances, il est difficile d'évaluer si les données de toxicité in vitro peuvent se transposer à l'individu entier, exposé par voie orale et à des doses compatibles avec l'exposition humaine. Jusque-là une seule étude in vivo témoigne d'un effet génotoxique du TiO_2 chez la souris exposée par l'eau de boisson (**Trouiller et al., 2009**).

Si ces auteurs concluent à un risque de promotion de la cancérogenèse colorectale après exposition orale, leur conclusion est toutefois à pondérer compte tenu de doses d'exposition (>50mg/kg/j) très supérieures à celles estimées pour l'homme (4-6 mg/personne et par jour) (**Lomer, 2004**).

Cette étude ne permet pas non plus d'apprécier le devenir des éléments de TiO₂ dans l'intestin et sous quelle forme il est absorbé pour produire ces effets (**Houdeau, 2012**).

La majorité des études portant sur l'effet des NP de TiO₂ sur le processus inflammatoire décrivent leurs effets au niveau de l'inflammation pulmonaire. Il s'agit de la principale voie d'entrée d'une NP à l'intérieur du corps humain puisque les NP sont souvent absorbées sous forme d'aérosol. Le TiO₂ est aussi connu comme étant capable de transmigration à travers l'épithélium, il peut donc être absorbé par la peau et se retrouver dans la circulation sanguine affectant ainsi d'autres organes. Dans une étude effectuée chez le rat, celui-ci y suggère que les NP ultrafines de TiO₂ provoquent une plus grande inflammation (augmentation du nombre de PMN « polymorphonucléaires ou neutrophiles ») aigue pulmonaire que celle induite par les NP de TiO₂ avec un diamètre plus grand (**Ferin et al., 1992**).

Les poussières de dioxyde de titane peuvent entraîner une irritation mécanique des yeux et des voies respiratoires, mais l'ingestion de petites quantités de TiO₂ n'entraîne pas de trouble, par contre toute les recherche n'ont montré aucune sensibilisation cutanée ou respiratoire chez l'homme [9].

4.5. Toxicité du TiO₂:

4.5.1. Effet aigue :

Les données disponibles sont essentiellement des études chez l'animal.

a) Voie respiratoire :

De nombreux auteurs ont montré que les particules ultrafines de TiO₂ (taille < 100 nm) étaient plus toxiques que les particules fines (taille > 100 nm) à doses équivalentes en masse [10].

Dans ces études, la dose exprimée en surface était mieux corrélée aux effets observés que la dose exprimée en masse.

Il semblerait que la surface spécifique plus élevée des nanoparticules joue un rôle important, vraisemblablement par libération de radicaux libres.

En revanche, pour une même forme cristalline (anatase), il a été montré que des particules de 5 nm étaient moins toxiques que celles de 21 nm en ce qui concerne l'induction d'une réaction, à la suite d'une exposition corps entier ou par instillation intranasale ([10], Grassian et al., 2007).

Ces différences seraient liées aux formes d'agrégation qui joueraient un rôle aussi important que la surface spécifique et les caractéristiques physiques de la nanoparticule initiale.

b) Voie orale :

Par voie orale, la toxicité aiguë est faible [10]. Les rares effets rapportés sont une augmentation statistiquement significative du poids relatif du foie chez les femelles exposées à des nanoparticules (25- 80 nm) par rapport au témoin (Wang et al., 2007).

Les nanoparticules sont à l'origine d'une réponse inflammatoire hépatique (augmentation du taux de transaminases sériques) et de légères altérations histopathologiques du foie (présence d'hépatocytes nécrosés) et des reins (présence de protéines dans les tubules rénaux et augmentation du volume glomérulaire) ainsi qu'une augmentation par rapport aux témoins des biomarqueurs enzymatiques d'atteinte cardiaque.

c) Voie cutanée :

Aucune irritation cutanée ou sensibilisation n'a été rapportée.

d) Voie oculaire :

Au niveau oculaire, une légère rougeur de la conjonctive est observée, chez le rat, après l'instillation des particules ultrafines de TiO₂; elle est réversible au bout de 48 h.

4.5.2. Effets chroniques :

Le dioxyde de titane pénètre dans l'organisme essentiellement par inhalation, et dans une moindre mesure, par voie orale. Que ce soit sous forme micrométrique ou nanométrique, les données disponibles à ce jour ne sont pas suffisantes pour pouvoir conclure quant à la présence d'une absorption percutanée.

A la suite d'une exposition par voie inhalatoire, l'accumulation se fait principalement au niveau des ganglions lymphatiques alors que par voie orale, les particules micro et nanométriques s'accumulent au niveau du foie, de la rate, des poumons et des reins, suite à une translocation (migration des particules à partir de leur site de déposition) circulatoire.

Par inhalation, différents types d'effets ont été rapportés au niveau des poumons, à la suite d'une exposition répétée : inflammatoire, cytotoxique, prolifératif, avec altérations histopathologiques. L'intensité des effets dépend notamment, de la taille des particules, de la forme cristalline et de l'enrobage éventuel des particules.

Par voie orale, le foie, les reins et le cœur sont légèrement atteints suite à une exposition à des nanoparticules [11].

5. Intérêt de l'utilisation de Levure :

Notre choix s'est porté sur ce champignon unicellulaire (*Saccharomyces cerevisiae*) pour multiples raisons :

- Les levures sont parmi les microorganismes les plus faciles à cultiver.
- L'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles confèrent à ces eucaryotes des qualités qui permettent de les étudier et les utiliser aussi facilement que des procaryotes.
- Les levures peuvent survivre dans les conditions anaérobies permettant de réaliser des tests non praticables avec les organismes supérieurs (**Zouaghi et Meseddek, 2011**)
- Les levures ont une structure plus complexe que celle des bactéries notamment la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* en a 16) (**Larpent, 1990**).
- La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle pour l'étude des processus cellulaires, et le premier eucaryote dont le génome a été complètement séquencé (**Goffeau et al., 1996**).

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Objectifs du travail :

Notre travail est une contribution au comportement d'une espèce unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis d'un xénobiotique utilisé dans de nombreuses applications, comme additif alimentaire, cosmétiques et pigments; le dioxyde de titane TiO_2 .

2. Matériel biologique :

Nous avons choisi comme modèle biologique les levures *Saccharomyces cerevisiae*, des organismes eucaryotes supérieurs utilisés dans les études de toxicités étant des bio-indicateurs de pollution.

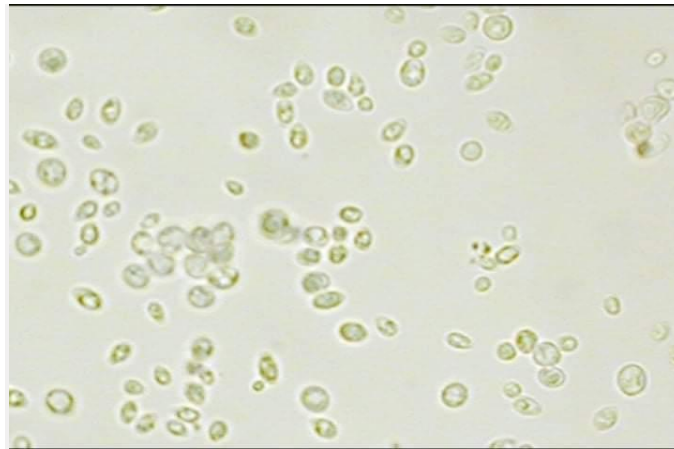


Figure 7: Cellules de *Saccharomyces cerevisiae* au microscope optique à l'état frais X400 [11].

3. Matériel chimique :

3.1. Définition de dioxyde de titane :

Nous avons choisi comme matériel chimique le dioxyde de titane TiO_2 , un matériau qui peut être toxique quand il est sous forme de poudre mais ayant des propriétés physico-chimiques intéressantes dans les plusieurs domaines. En plus de ça, il est très stable chimiquement. Les propriétés de dioxyde de titane dépendent de plusieurs paramètres à savoir la nature de la phase, la structure cristalline et la cristallinité comme les propriétés optiques et électriques (**Ben atia ,2016**).

4. Mode expérimental :

Le pratique a été réalisée dans laboratoire pédagogique de **Université 08 Mai 1945 Guelma**

4.1. Préparation de la culture de levures :

4.1.1. Lavage de levure :

La levure d'origine industrielle comme la levure de boulanger est conditionnée en pâte ou lyophilisée à partir de culture menée dans un milieu riche en substrats. En conséquence, ces substrats sont souvent présentes dans ces préparations et les levures mises en suspensions dans l'eau respirent et/ou fermentent spontanément.

Dans ces conditions, il est difficile voire impossible de mener des mesures fiables sur le métabolisme énergétique. Aussi, avant toute expérience comportant des mesures sur le métabolisme énergétique, il est nécessaire de laver soigneusement les levures pour éliminer toute trace de substrat dans le milieu (**Pol, 1996**).

4.1.2. Protocole de lavage :

- Préparer une suspension de levure en mettant les cellules dans un tube à essai puis rajouter de l'eau physiologique (Solution NaCl à 9 g/L) sur un vortex en agitant suffisamment.
- Centrifuger la suspension (3000 tours/ 5 min) et éliminer le surnageant.
- Remettre les cellules en suspension dans de l'eau physiologique (Solution NaCl à 9g/l) en agitant puis centrifuger.
- Recommencer et mettre les levures en suspension dans le milieu désiré (**Pol , 1996**).

4.1.3. La mise en culture :

- Préparer une suspension de levure (1 g dans 100 ml de Tampon Phosphate) après avoir procéder au lavage de levures, avec un pH= 5 qui est optimal pour le développement des levures et trop bas pour permettre un développement de bactéries, de même, la température de 26°C est optimale.
- Mettre en agitation douce et faire buller de l'air pendant 2 heures.
- Préparer une dilution de 1/20 avec le milieu de culture dans une cuve standard chaque 30 minutes.

- Après avoir fait le zéro d'absorbance sur le milieu nutritif qui contient 1g de glucose et de l'eau distillée (sans levures), Mesurer l'absorbance de l'échantillon dilué avec un spectrophotomètre (JENWAY 6100) à une longueur d'onde à $\lambda = 660 \text{ nm}$, sans oublier d'agiter la cuve avant chaque mesure.
- Élaboration de la courbe de l'absorbance en fonction du temps, $DO = f(T)$ (**Zouaghi et Meseddek, 2011**).

4.2. Traitement :

Nous avons opté pour un type de toxicité qui nous permet d'obtenir une réponse biologique en un temps assez court. De plus la recherche sur la toxicité sublétales est nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux puisque ce sont ces effets qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution environnementale.

Selon de la CL50 des tests de toxicité sublétales du Dioxyde de Titane chez les microorganismes suivants : *E. Coli*. la CL50= 585 mg/L /30min (**Dasari et al., 2013**), *Daphnia magna*. la CL50> 100mg/L (**Fiche de donnée de sécurité du Tio2 conformément au règlement(CE) n°1907/2006**) et chez les poissons la CL50= 165mg/L (**Gatoo et al., 2014**); nous avons déterminé une échelle de concentrations dans un intervalle de $50 > C > 150 \text{ mg/l}$.

À partir de la poudre du Dioxyde de Titane, nous avons préparé une solution mère de 120 mg de TiO_2 dans un litre d'acétone à 2%, puis nous avons choisi 04 concentrations de TiO_2 (C1, C2, C3 et C4) correspondant respectivement à 90, 100, 110 et 120 mg/l et un échantillon témoin (T) ainsi qu'un échantillon témoin acétone.

5. Les paramètres à étudier :

5.1. Cinétique de croissance cellulaire :

Le paramètre physiologique étudié est la cinétique de croissance des levures qui s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 660 \text{ nm}$ en fonction du temps (**Pol, 1996**).

Les différents traitements du Dioxyde de titane sont effectués dans les milieux de culture et une cinétique de croissance est suivie en fonction du temps aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

T_{0min} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm

T_{30min} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{1h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{2h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{3h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{4h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{5h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{24h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

T_{48h} : Observation microscopique + lecture de la densité optique à $\lambda = 660$ nm.

**TEMPS
COURT.**

**TEMPS
LONG.**

Les cellules sont observées sous microscope photonique (Leica DL 1000) au grossissement x 40 et x 100.

5.2. Calcul du pourcentage de réponse :

C'est un calcul qui évalue la réponse de la croissance des levures vis-à-vis du Dioxyde de titane basée sur l'équation suivante :



$$\text{Le pourcentage de réponse} = \frac{[NC-NE]}{NC} \times 100$$

NC : Nombre de cellule témoins.

NE : Nombre de cellule 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**).

5.3. Dosage des protéines totales :

Les protéines sont mesurées par colorimétrie selon la méthode de **Bradford, (1976)**.

5.3.1. Principe de la méthode :

Le principe de la méthode de Bradford est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de coomassie) sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques.

5.3.2. Technique du dosage des protéines :

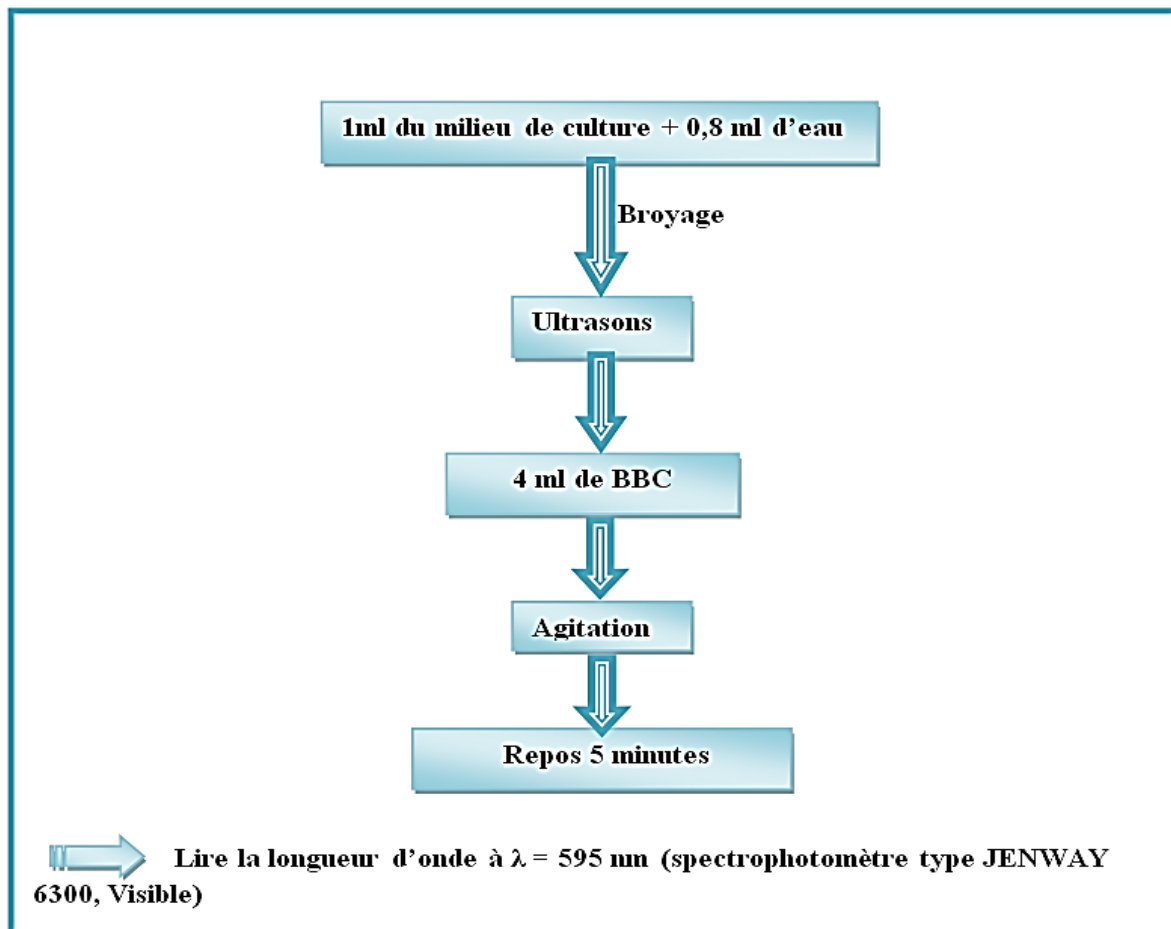


Figure 8: Protocole expérimentale du dosage des protéines (Bradford, 1976).

5.4. Dosage des biomarqueurs enzymatiques :

5.4.1. Mesure de l'activité Catalase (CAT) :

La mesure de l'activité catalase (CAT) est déterminée selon la méthode de **Regoli et Principato (1995)**, dont le principe repose sur la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une longueur d'onde de 240 nm.

La levure est broyé aux ultrasons dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7). L'homogénat est centrifugé à 15000 g/ 10 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient : 20 µl de surnageant, 200 µl de Peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (500 mM) et 780 µl de tampon (0,1 M, pH 7,5).

La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

L'activité catalase est calculée selon la formule suivante:

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol/min/mg prot}) = \frac{\Delta\text{DO} \times 10}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéines}}$$

X : µmoles de H₂O₂ consommées par minute et par mg de protéines.

Δ Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

ε : Le coefficient d'extinction linéique molaire est de 40 M⁻¹. Cm⁻¹.

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minute toutes les 15 secondes (spectrophotomètre, Jenway 63000) pour une longueur d'onde λ = 240 nm.

5.4.2. Mesure de l'activité de la Glutathion S-transférase (GST) :

La mesure de l'activité GST est réalisée selon la méthode de **Habig et al., (1974)** basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat : le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène (CDNB) en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH).

La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) est homogénéisée dans 1ml de tampon de phosphate de sodium (0,1 M, pH 6) à l'aide d'un broyeur à ultrasons.

L'homogénat est centrifugé à 14000 tours/min pendant 30 minutes et le surnageant récupéré servira de source d'enzyme.

Une fraction aliquote du surnageant de 0,2 ml a été ajoutée à 1,2 ml du mélange [CDNB (1 Mm) -GSH (5 mM)] dans un tampon phosphate (1 mM, pH 6).

La lecture des absorbances est effectuée toutes les 15 secondes pendant une minute à une longueur d'onde de 340 nm (spectrophotomètre, type JENWAY 6300, Visible) contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée.

L'activité de l'enzyme est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Activité GST } (\mu\text{M/ min/ mg de prot}) = \frac{\Delta\text{DO/min}}{9,6} \times \frac{\text{Volume total de la cuve}}{\text{Prise d'essai} \times \text{mg de protéine}}$$

X : micro-moles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines.

Δ DO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Prise d'essai : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

5.5. Dosages des biomarqueurs non enzymatiques :

5.5.1. Dosage du Glutathion (GSH) :

Le dosage du glutathion est effectué après 5 semaines de traitement avec le dioxyde de titane. Il est quantifié selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)**, qui repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5- mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobinzoïque (DTNB) par les groupements thiol (SH-) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation (30 secondes) des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M (7,44 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée) à l'aide d'un ultrason (Sonifer B-30). L'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) 0,25% (0,25 g d'ASS, 100 ml d'eau distillée). Ainsi, 200 µl de l'ASS sont additionnés à 800 µl d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé pendant 15 mn dans un bain de glace, puis centrifugé à 1000 tours /mn pendant 5 mn. Une fraction aliquote (500 µl) du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris /EDTA (0,02 M, pH 9,6) (63,04 g tris, 7,4448 g EDTA et 1000 ml d'eau distillée) et 25 µl de DTNB (0,01 M) (3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu). Le mélange est laissé pendant 5 mn à température ambiante avant la mesure des absorbances contre un blanc où 500 µl du surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée. Le taux de GSH est exprimé par rapport aux quantités de protéines.

La lecture de la longueur d'onde est effectuée à $\lambda = 412$ nm après 5 min de repos (spectrophotomètre type JENWAY 6300) et la concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Taux de GSH } (\mu\text{M/ mg de prot}) = \left(\frac{\Delta\text{DO}}{13,1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \right) / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

V_d : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1ml (0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat).

V_h : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

V_t : volume total dans la cuve : 1,525 ml (0,5 ml surnageant + 1ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB).

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Chapitre III: Discussion et conclusion

Discussion :

Les nanoparticules peuvent se retrouver dans tous les compartiments environnementaux (eau, sol, air et aliment). Par conséquent, l'ensemble des espèces de la chaîne alimentaire, peut être exposé aux nanoparticules. L'accumulation des polluants anthropogéniques dans le réseau trophique avait déjà été montrée (**Thomann, 1989**), il est important d'évaluer le comportement des nanoparticules manufacturées dans les populations d'organismes constituant les premiers maillons de la chaîne alimentaire (**Angélique, 2008**).

Toutes les études sur les bio-indicateurs, convergent vers l'idée que l'espèce de *Saccharomyces cerevisiae* est d'excellent modèle biologique pour les études toxicologiques et pour la compréhension des mécanismes d'action des Xénobiotique in situ. Notre choix a été portée sur la levure en plus particulièrement *S.cerevisiae* qui appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Saccharomyce toideae*, genre *Saccharomyces* (**Kreger-van Rij, 1984 ; Bouix et Leveau, 1993**).

Elle présente un métabolisme respiratoire de capacité limitée (**Vasserot, 1996**), elle est du type fermentaire (**Botton, 1991 ; Belin, 1996**), largement utilisée en fermentation alcoolique industrielle où elle s'est imposée, elle possède une forte tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées de sucre et une stabilité en anaérobiose (**Michel et al.,1990 ; Jackson, 1994; Panon, 1997**). Elle est économiquement avantageuse, elle croit et fermente rapidement aux faibles valeurs du pH spécifique du moût (**Jackson, 1994 ; Drilleau, 1996**).

Le devenir des xénobiotique dans les organismes dépend de diverses voies métaboliques mises en jeu face à l'agression de ces agents (**Vidal, 2001**). En général les changements engendrés par la présence d'un Xénobiotique dans l'organisme sont de deux types : la mobilisation au niveau moléculaire, permettant la protection de l'organisme contre les effets néfastes du contaminant, il s'agirait de l'implication des systèmes de défense (détoxification) qui transforment le contaminant en une forme inoffensive et facile à excréter. La deuxième variante est l'induction des effets toxiques qui sont dus, soit au Xénobiotique lui-même, par le dépassement des systèmes de défense de l'organisme (conformément à la théorie de Spill Over) soit dus aux métabolites, produits de la biotransformation de ce contaminant, qui présentent une toxicité plus élevée que la substance d'origine (**Van der Oost et al., 2003**).

1. Evaluation de l'effet toxique du Dioxyde de titane sur la croissance de *S. cereviae* :

Le suivi de la croissance est un bon indicateur de l'action toxique chez les micro-organismes, elle reflète l'état du métabolisme de la cellule. (Perez-Rama, 2001).

Lila et al. (2013), ont suivi la toxicité des nanoparticules TiO₂, ZnO₂, FeO et Mn₂O₃ sur *S.cerevisiae* et on trouvait que le TiO₂ non toxique à Saccharomyces. Ce résultat est étayé par l'étude de (Kasemets et al., 2009) qui a également étudié l'effet non toxique des NPs de TiO₂ sur *S. cerevisiae* même à 20 g/l. Cependant, d'autres micro-organismes, comme les bactéries ou les daphnies, semblent être également sensible à la toxicité des nanoparticules ; l'exposition d'*E.Coli* à 1000 mg/l de NPs-TiO₂ a entraîné une inhibition de 25% de la croissance (Adams et al., 2006).

D'un autre côté, Boutalbi (2013) a étudié la toxicité des nanoparticules (cas de l'oxyde de titane et l'oxyde de fer) sur le cycle de vie de *Daphnia magna* et leur résultat a porté un taux de mortalité de 90% des daphnies en un traitement à court terme et un taux atteignant 92.5% à long terme pour les NPs-TiO₂ pour la plus forte concentration du TiO₂ qui est de 200 mg/l . L'immobilisation des daphnies est une repense à tous les niveaux d'organisation biologique (physiologique moléculaire, cellulaire, biochimique, tissulaire, morphologique et écologique), ces résultats sont en accord avec les travaux de Manuela et al. (2011) qui ont trouvé qu'une concentration de 0.01mg/l de TiO₂ cause un effet significatif même sur les daphnies [12].

Les travaux de Zhang (2012) qui ont montré l'effet toxique des nanoparticules sur la survie des crustacés d'eaux douces et notamment sur *Daphnia magna* après 7 jour de contact avec les NPs-TiO₂, cependant le taux de mortalité a atteint les 77% à 150 mg/l et 92.5 % à 200 mg/l. Les résultats du test chronique montrent que le taux de mortalité est aussi assez élevé suite à l'administration de plusieurs doses de nanoparticules de (l'oxyde de titane). L'action toxique de cette substance évolue progressivement et la plupart des doses utilisées ont provoqué une action létale (taux de mortalité dépassant 50%) sur les daphnies. l'exposition chronique au TiO₂ pendant 21 jours induit une inhibition significative de la croissance et de la reproduction, et une augmentation du taux de mortalité.

Dans une autre étude de Meseddek et Zouaghi (2011) sur la croissance cellulaire de la levure *S.cerevisiae* traitée par le Cadmium (0,1mM, 0,5mM, 1mM), les résultats obtenus indiquent que plus la concentration du Cadmium augmente plus la croissance des *Saccharomyces* est inhibée.

Ces résultats abondent dans le même sens que ceux de **Khebbab (2016)** qui a étudié la toxicité des nanoparticules de ZnO et a suivi la cinétique de croissance des *S.Cerevisiae*, leur résultats ont montré que le ZnO avait un effet inhibiteur sur la croissance de la levure.

2. L'effet de TiO₂ sur les macromolécules (les protéines) :

De nombreuses molécules sont susceptibles d'être attaquées ou modifiées par les ROS, les protéines sont les premières cibles (**Davies, 1987**).

Une étude de **Meseddek et Zouaghi (2011)** sur la toxicité du Cadmium chez la levure *S.cerevisiae* a mis en évidence son impact sur le taux des protéines cellulaires. Les résultats obtenus, montrent que le taux des protéines totales augmente en fonction des concentrations du Cadmium, ceci peut être expliqué par un phénomène de détoxification puisque les levures comme tout autre microorganisme, développent différents mécanismes de protection par le biais de ses protéines de détoxification vis-à-vis des métaux, comme la synthèse du métallothionéines classe II (**Perez-Rama, 2001**).

Diverses études ont été menées pour étudier l'effet antibactérien des NPs du Cu contre plusieurs organismes, l'activité antibactérienne des NPs du Cu, CuO et de Ag/CuO se fait selon le même mécanisme suivit par les NPs Ag/TiO₂ qui est basée sur la génération des ROS conduisant à la destruction de l'ADN, des protéines, la membrane cellulaire et les autres constituants vivants de la cellule. (**Bahadur et al., 2016**).

Les protéines sont les constituants majeurs de la cellule et toute fluctuation de leur taux peut être considérée comme une réaction au xénobiotique, le démontre le travail de recherche de **Khebbab (2016)**. Ainsi, l'augmentation des teneurs en protéines cellulaires chez les levures traitées témoigne l'induction des systèmes enzymatiques en vue de neutraliser la production des ROS.

3. l'effet du TiO₂ sur les biomarqueurs enzymatiques (CAT et GST) et non enzymatiques (GSH) :

Le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants dans lequel l'activité de l'oxydant est supérieure à la capacité de neutralisation l'antioxydant (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007). Soumis à ce stress exogène, les microorganismes ont la capacité de développer toute une batterie de réponses capables d'enclencher un processus de détoxification vis-à-vis des Xénobiotique afin de lutter, et/ou de s'acclimater face au stress chimique (Lagadic et al., 1997 ; Perez-Rama, 2001).

Les cellules des micro-organismes possèdent des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant appelés antioxydants (Wassmann et al., 2004). Ces principales enzymes antioxydantes sont la Superoxyde-dismutase (SOD) la Catalase (CAT), la Glutathion peroxydase (GPX), la Glutathion réductase (GR) la Glutathion S-transférase (GST) (Matés, 1999).

La formation de ROS peut également être liée à l'inactivation de certaines enzymes impliquées dans la résistance au stress oxydatif que nous avons déjà cité, ou par la baisse du pool intracellulaire de molécules antioxydantes comme le Glutathion (Bhaduri et Fulekar, 2012).

En premier, on s'intéresse sur le suivi de la GSH, un tripeptide antioxydant, représente 90% des thiols non protéiques intracellulaires (Sen et al.,1992; Kidd, 1997) et neutralise l'H₂O₂ cellulaire, l'O₂⁻ et les hydroperoxydes lipidiques par son groupement fonctionnel SH⁻ (Reed et Beatty, 1980).

En second, nous nous sommes intéressés sur certaines enzymes qui sont encore plus importantes dans le rôle de détoxification des ROS:

La catalase, est une enzyme antioxydant qui apparait dans les premières lignes de défense de la cellule contre les radicaux libre impliquée principalement le peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène (Antonie et al., 2003). C'est un biomarqueur de stress oxydatif et il est sensible à certains contaminants inducteurs de stress oxydatif comme les métaux toxiques (Almeida et al., 2007).

La GST appartient à une famille d'enzymes de la phase II de biotransformation qui détoxifie les substrats Xénobiotique par voie de conjugaison avec le GSH pour produire des composés solubles moins toxiques (Wu et al., 2006), et elle joue un rôle vital dans la protection contre le stress oxydatif (Zheng et al., 2013).

Une contribution à l'étude de la toxicité des nanoparticules (cas de l'oxyde de titane) sur la réponse au stress oxydatif de *Daphnia magna* réalisée par **Kim et al. (2010)** révèle des activités accrues de trois enzymes antioxydantes CAT, GPX et GST chez *D. magna*, avec exposition à des concentrations croissantes des NPs-TiO₂ (1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l).

D'autre part, un travail de recherche de **Ruth Varela-Valencia et al. (2014)** sur l'effet du Dioxyde de titane sur l'expression des antioxydants gènes des poissons en particulier le genre (*Oreochromis niloticus*). Les Poissons ont été injectés par différentes concentrations (0,1, 1,0, 10,0 mg /l), de tailles (7, 14 et 21 nm), et dans les phases (anatase et rutile) des TiO₂-NPs, et sacrifié après 3, 6, 12 et 24 h.

Les résultats ont montré que l'injection de 1,0 mg/l de TiO₂-NPs ont induit une légère augmentation initiale dans l'expression des gènes CAT et GST chez le *Tilapia*, après les niveaux de transcription ont diminué.

Les résultats des études précédentes abondent dans le même sens que ceux d'Al-atrache (2016) qui a étudié l'effet du Cadmium sur les systèmes de détoxification chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'exposition de ces cellules à ce métal aboutit à une augmentation de Malondialdéhyde MDA et du Glutathion et un accroissement de l'activité Catalase et du Superoxyde-dismutase.

Les résultats du travail de **Khebbab (2016)** sur le suivi de la toxicité des nanoparticules de ZnO sur les mêmes systèmes de détoxification (GST, GSH, CAT) chez *S.Cerevisiae* a montré que :

Les concentrations en GSH cellulaire après le traitement par ZnO-NPs (5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) diminuent d'une manière dose dépendante chez les levures traitées indiquant ainsi l'implication du GSH dans les mécanismes de détoxification enclenchés par la cellule. Parallèlement à cela l'activité CAT augmente d'une manière dose dépendante chez ces organismes traités par rapport aux témoins. Ces résultats sont confortés par les travaux de **Daoud (2012)** qui a montré une augmentation de l'activité CAT et GST dans la glande digestive de *L. luteola* traitée au ZnO et cela dès la concentration 10 ug/ml.

Conclusion :

Lorsque les micro-organismes sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont stressés.

Le modèle alternatif cellulaire que nous avons choisi, la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est un micro-organisme très proche des organismes supérieurs, que sa croissance est inhibée en présence de plusieurs Xénobiotique, en fait un excellent bio indicateur/bio-marqueur de la pollution.

Ce stress peut être intense et provoque la mort de ces micro-organismes sans que ces derniers n'aient pu réagir, particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées.

A partir de notre synthèse bibliographique et de la majorité des travaux réalisés sur l'impact toxicologiques des NPs-TiO₂ vis-à-vis de certains micro-organismes et particulièrement la levure *Saccharomyces*, nous pouvons constater que le TiO₂ est très peu toxique mais il est nuisible aux organismes vivants sous sa forme nanoparticulaires à partir d'une certaine concentration.

C'est pour cela qu'on constate une toxicité à partir d'une certaine concentration du NPs-TiO₂, tandis que d'autres travaux montrent une non toxicité de ces derniers face aux levures.

Au niveau métabolique, nous pouvons prévoir une perturbation du taux de protéines totales et des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques impliqués dans la détoxification.

Laissant suggérer que le xénobiotique testé induit la formation de radicaux libres, suite à cela les levures développent une défense cellulaire à travers l'induction d'enzymes de détoxification anti-oxydantes telles la Catalase.

Perspectives :

A partir de ce travail de recherche; il serait intéressant de ressortir les perspectives suivantes :

- Etudier les effets de dioxyde de titane sur le matériel génétique de *Saccharomyces cerevisiae*.
- l'impact des nanoparticules de dioxyde de titane et sa génotoxicité sur des organismes supérieurs.
- L'Effet du TiO₂ sur d'autres enzymes antioxydantes tels que les peroxyrédoxines, une famille de thiol peroxydases et la sulfiredoxine.
- L'impact de cette substance sur l'enzyme ATP-ase et le système respiratoire de levure.

Références bibliographiques

- **Adams L.K., Lyon D.Y. and Alvarez P.J. 2006.** Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Sci. Technol*, 54: pp. 327–334.
- **Aguilar-Uscanga B.R. 2003.** Influence des paramètres de croissance et des conditions de mise en œuvre sur la composition et l'architecture de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse.
- **Aguilar-Uscanga B. and François J.M. 2003.** A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *LetApplMicrobiol*, 37(3) : pp. 268-274.
- **Al-Atrache H. 2016.** Etude de la toxicité idiosyncratique de médicaments sur cellule HepaRG et levure : influence du stress inflammatoire et de la biotransformation. Thèse de doctorat, Université Libanaise et l'Université de Rennes, 1 : P. 92.
- **Almeida E.A., DiasBainy A.C., MeloLoureiro A.P., Martinez Regina R., Miyamoto S. Onuki J. and Fujita Barbosa L. 2007.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: pp. 588–600.
- **Angélique S.D. 2008.** Effets biologiques des nanoparticules manufacturée influence de leur caractéristique. Thèse de doctorat, Université de Paris, p. 5-18.
- **Antonie M.T., Corredor L. and Leret M.L. 2003.** Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicol.Lett.*, 143: pp. 331-340.
- **Arnold W.M. 1981.** Enzymes: In Yeast, cell envelopes. *Biochemistry Biophysics and Ultra structure*, 2: pp. 1-46.
- **Atilia M. et Bousena R. 2012.** Evaluation des risques écotoxicologiques des effluents hospitaliers «Hôpital de Bouchegouf» sur *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire de master, université de Guelma. p.4.
- **Bacon J.C.D., Farmer V.C., Jones D. and Taylor L.F. 1969.** The glucan compounds of the cell wall backer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* considered in relation to its ultrastructure. *Biochem J*, 114: pp. 557-567.
- **Bacha A .2008.** Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur substrat à base de dattes. Mémoire pour l'obtention de diplom de magister en agronomie, Université EL Hadj Lakhdar - Batna, p.34.

- **Bahadur J., Agrawal S., Panwar V., Parveen A. and Pal k. 2016.** Macromolecular research, p. 488.
- **Barnett J.A. and Robinow C.F. 2002.** A history of research on yeasts 4: cytology part I, 1890- 1950. Yeast, 19: pp. 151-182.
- **Bayley R.B. and Parks L.W. 1975.** Yeast sterol esters and their relationship to the growth of yeast. J Bacterial. Journal of bacteriology, 124(2) : pp. 606-612.
- **Belin J. M. 1996.** Les levures, in Microbiologie alimentaire tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp. 35-52.
- **Bellam et Fould .Springer. 1996.** Levure et panification. Nathan Communication Paris, p.73.
- **Ben atia R. 2016.** Elaboration et caractérisation des couches minces d'oxyde de titane (TiO₂) obtenue par procédé Sol-Gel : l'effet de la température du recuit. Mémoire de master, Université de Biskra.
- **Bhaduri M.A. and Fulekar MH. 2012.** Antioxydant enzyme responses of plants to heavy metal stress. Rev Enviro Sci Biotechnol., 11: pp. 55-69.
- **Botton B. 1991.** La physiologie des levures, in Biotechnologie des levures. Masson, Paris, pp. 97-170.
- **Bouix M., and Leveau J.Y. 1993.** Les levures, in Microbiologie industrielle. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, p. 2-93.
- **Bouix M. et Leveau J.Y. 1991.** Les levures. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire. Edition 2, Lavoisier-Tec & Doc, Paris, 3 :pp. 206-229.
- **Boumediou K. 2019.** Etude de l'activité antibactérienne des matériaux nanostructurés à base d'argent. Mémoire de master, Université Abou-BekerBelkaid, Tlemcen, p. 8.
- **Bounicourt M. 1995.** Dictionnaire de Microbiologie Générale, Ellipses, pp. 458-463.
- **Boutalbi K. 2013.** Contribution à l'étude de la toxicité des nanoparticules (cas de l'oxyde de titane et l'oxyde de fer) sur le cycle de vie de *Daphnia magna*. Mémoire de Master. Université 08 Mai 1945 Guelma. p. 43-49.
- **Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensivemethod for the quantitation of microgramquantities of proteinutilizing the Principe of protein-dyebinnding. Anal. Biochem. 72: pp. 248-254.
- **Buzea C., Pacheco I.I. and Robbie K. 2007.** Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Bio-interphases, 2(4): MR17–MR71.

- **Daoud A., Saud A., Sudhir K., Maqsood A. and Maqsood A.S. 2012.** Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwaters nail *Lymnaea luteola* L. *Aquatic Toxicologie*, 124-125: pp. 83-90.
- **Dasari T.P., Pathakoti K. and Hwang H.M. 2013.** Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metaloxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co₃O₄ and TiO₂) to *E. coli* bacteria. *Journal of Environmental Science*, 25(05): pp. 882-888.
- **Davies KJ. 1987.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J BiolChem*, 262: pp. 9895-9901.
- **Didier P. 1996.** Travaux pratique de biologie des levures, ellipses édition marketing S.A, Paris.
- **Djekoun M. 2012.** Evaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le cadmium à l'échelle cellulaire : cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **Drilleau J. F. 1996.** La cidrerie, in *Microbiologie alimentaire, Aliments fermentés et fermentations alimentaires*. Tome 2, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, p. 137-149.
- **Ferin J., Oberdorster G. and Penney D.P. 1992.** Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J RespirCell Mol Biol*, pp. 535-542.
- **Ferreira F. 1997.** *Saccharomyces cerevisiae* Importance dans le développement des sociétés humaines. Rôle dans l'industrie agro-alimentaire et en thérapeutique. Thèse de doctorat, Pharmacie : Univ. Paris XI, p. 119.
- **Fiche de donnée de sécurité du TiO₂ conformément au règlement (CE) n°1907/2006).**
- **Fujishima.A., and Honda. K. 1972.** Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*, 238: pp. 37-38.
- **Gatoo MA., Naseem S. Arfat MY Dar AM., Qasim K. and Zubair S. 2014.** Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associatedtoxic manifestations. *Bio Med Research International*, (498420): pp.1-8.
- **Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel.J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y, Philippsen P., Tettelin H. and Oliver S.G.1996.** Life with 6000 Genes.*Science* 274 (5287):pp. 546-567.

- **Gorin P.A.J., Spencer J.F.T. and Eveleigh D.E.1969.** Enzymatic degradation of yeast-cell-wall manns and galactomanns to polymeric fragments containing α (1 \rightarrow 6) linked D mannopyranon residues. Carb Res, 2: pp. 387-398.
- **Grassian V.H., O'Shaughnessy P.T. Adamcakova-Dodd A. Pettibone J.M. and Thorne P.S. 2007.** Inhalation exposure study of Titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. Environmental Health Perspectives, p. 115.
- **Guery B. et Mcirdi K. 1994.** Levure. Autodidactique. Ed Quillet, Volume Biologie-Géologie, (5) : pp.71-163.
- **Guinet R. et Godon B.1994.** La panification Française. Ed. Tec&Doc, p. 521.
- **Guiraud J. 2012.** Microbiologie alimentaire, Paris : Dunod, p. 576.
- **Guiraud J. et Galzy P. 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, p. 615.
- **Guiraud R. 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, p. 652.
- **Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B. 1974.** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J BiolChem, 249 (22): pp. 7130-7139.
- **Hesclot et Vladescu. B. 1994.** La levure dans les industries alimentaires. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, p. 56.
- **Houdeau E. 2012.** Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement. Carrefour de l'Innovation agronomique, Toulouse, France, pp. 107-108.
- **Institute National de Recherche et de Sécurité. 2013.** Fiche toxicologique : Dioxyde de titane, pp. 9-14.
- **IARC (International Agency for Research on Cancer). 2010.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Carbon Black, TitaniumDioxyde and Talc. France, 93: pp. 193-276.
- **Jackson R. S. 1994.** Wine science, principles and applications. Academic press, San Diego, California, pp. 235-276.
- **Kasemets K., Ivask A. Dubourguier H.C. and Kahru A. 2009.**Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*.Toxicol.in Vitro, 23: pp.1116–1122.
- **Khebbeb M.N. 2016.** Evaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules (ZnO) sur deux modèles biologiques unicellulaires (*Saccharomyces cerevisiae* et *Parameciumsp*).Thèse de doctorat. UniversitéBadji Mokhtar, Annaba, 55-58-59.

- **Kidd PM .1997.** Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev*, 2: pp. 155–176.
- **Kim K.T., Klaine J S., Cho J., Kim S-H., Sang D. and Kim S.D. 2010.** Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of the Total Environment*, 408: pp. 2268–2272.
- **Klaassen. C. 2001.** Casarett and Doull's toxicology, the basic of poison 6 edition, McGraw Hill.
- **Klis M. F., Pieterella M., Klaas H. and Stanley B. 2002.** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 23: pp. 234-245.
- **Kreger-van Rij N.J.W. 1984.** The yeasts, a taxonomic study, 3rd Ed. Elsevier Amsterdam, pp. 215 -230.
- **Lagadic L., Caquet T. et Amiard J.C. 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux* (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Masson, Paris, p. 1-9.
- **Lai Q.P. 2010.** Utilisation des levures non saccharomyces en œnologie : études des interactions entre *Torulas poradelbruecki* et *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes. Thèse de doctorat, université de Toulouse, p. 10.
- **Larpent J.P. et Larpent G.M. 1997.** Mémento technique de microbiologie. 3ème édition, Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp. 217- 240.
- **Larpent J.P. 1991.** Biotechnologie des levures. Ed Masson, Paris, p .426-445.
- **Larpent J.P., et Gourgaud M. 1985.** Elément de microbiologie. Ed. Herman, Paris. p. 464.
- **Larpent J.P. 1990.** Biotechnologie des levures masson, Paris. p.132 - 315.
- **Leblonc. 1988.** Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique. Thèse : Pharmacie, Nancy 1, n051 : p .235.
- **Leclerc H. 1975.** Microbiologie générale 3ème édition, Paris, p : 828.
- **Leeuwenhoek A.V. 1680 .** Antoni van Leeuwenhoek et la découverte de bactéries. 41 (1), 217-228.
- **Leveau I.V. et Bouix M. 1993.** Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec & Doc Lavoisier, France, p. 612.
- **Leveau J. Y. and Bouix M. 1993.** Cinétiques microbiennes, in *Biotechnologie*. 4ème édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp. 118-209.

- **Leyral G. et Vierling É. 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires. 4ème édition, Doin, p. 20-36.
- **Lila O.G., Citlali G.S., James A.F. and Reyes S.Á. 2013.** Toxicity of TiO₂, ZnO₂, FeO, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* Chemosphere, 93: p. 1205.
- **Lim S.H.A.D., Ryu J.M.B., Lee H., Jeon J.H., Sok D.E. and Choi E.S. 2011.** Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis. BioresourTechnol, 102: pp. 2109–2111.
- **Lipke N.P. and Ovalle. R. 1998.** Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. J Bacteriol, 180(5): pp. 3735-3740.
- **Lomer M.C., Hutchinson C., Volkert S., Greenfield S.M., Catterall A., Thompson R.P. and Powell J.J. 2004.** Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease. Br J Nutr, pp. 92, 55-947.
- **Loukin S. and Kung C. 1995.** Manganèse effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. Journal of cell Biology, 131(4):10-1025.
- **Lovern S.B. and Klaper R. 2006.** *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. Environ. Toxicol. Chem., 25 (4): pp. 1132– 137.
- **Lykkesfeldt J. et Svendsen O. 2007.** Oxidants and antioxidants in disease:
 - oxidative stress in farmanimals. The Veterinary Journal, 173: pp. 502–511.
- **Manners D.J. and Masson A.J. 1969.** The structure of two glucans yeast cell walls. FEBS Letters, 4: pp. 122-124.
- **Martin C., Galbe M., Wahlbom C.F., Hahn-Hagerdal B. and Jonsson L.F. 2012.** Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme MicrobTechnol, 31 : pp. 274–282.
- **Mates. 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. ClinBiochem, 32: pp. 595-603.
- **Mathilde B.C., 2016.** Génotoxicité et impact de nanoparticules de dioxyde de titane sur la réparation de l'ADN dans des cellules alvéolaires pulmonaires. Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes, p. 161.

- **McEllan J.W.L. and Lampin J.O. 1969.** Phosphomannane In Enzyme required for the formation of yeast protoplasts. *J Bact*, 95: pp. 967-974.
- **Mendonça G., Mendonça DBS., Arago F.J. and Cooper LF. 2008.** Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*, 29 : pp. 3822-3835.
- **Michel A., Bizeau C. et Drilleau J.F. 1990.** Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. *Belgian journal of food chemistry and biotechnology*, 3(45) : 98-104.
- **Mn Simon, 2011.** Determination of Oxygen Utilization Pathways in an Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86, 2, 154-163.
- **Muscat J., Swamy V. and Harrison N. 2002.** First-principles calculations of the phase stability of TiO₂. *Physical Review B*, 65(22): pp. 1-15.
- **Muthukumar.K. and Nachiappan V. 2010.** Cadmium-induce doxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 47: pp. 387 - 383.
- **Neagu C.B. and Bahrim G. 2012.** Comparative study of different methods of hydrolysis and fermentation for bioethanol obtaining from inulin and inulin richfeedstock. *Food Industry*, 13: pp. 63– 68.
- **Neumann N.P. and Lampen J.O. 1967.** Purification and properties of yeast invertase. *Biochemistry*, 6 :pp. 468-475.
- **Noui Y. 2001.** Optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur extrait de datte. Mémoire d'ingénieur, Institut d'agronomie, Batna .p. 3...5-6-12-14-17-20-40-58.
- **Oganov A. R. and Lyakhov A.O. 2010.** Towards the theory of hardness of materials. *Journal of Superhard Materials*, 32(3) : pp. 143-147.
- **Panon G. 1997.** Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var.uvarum,*Hanseniasporavalbyensis* et *Metschnikowiapulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. *Sciences des aliments*, 17 : pp., 193-217.

- **Pautrat J.L. 2011.** Nanosciences : Evolution or révolution ? Comptes Rendus Phys., Nanoscience and nanotechnologies : hopes and concerns Nanoscience et nanotechnologies : espérances et inquiétudes. 12 : pp. 605–613.
- **Peat S., Turvey J.R. and Doyle D. 1961.** The polysaccharides of baker's yeast V.A. Further study of the mannan. J ChemSoc, 7: pp. 3918-3923.
- **Pelaez M., Nolan N.T., Pillai S.C., Seery M.k., Falaras P., Kontos A.G., Dunlop P. SM., Hamilton J.WJ., Byrne J.A., O'shea K., Entezari M.H. and Dionysiou D.D. 2012.** A review on visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental application. Applied Catalysis B: Environmental, 125(0): p. 331-349.
- **Perez-Rama M., Abalde A.J., Herrero L.C. and Torres E. 2001.** Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTCH. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(9) :p. 2061-2066.
- **Pol D. 1996.** Travaux pratiques de biologie des levures. Pellissepe, édition marketing, 158. pp. 21-151.
- **Queiroz M.M.C. 1991.** Aspectos da bioecologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Master Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, Brasil, p.72.
- **Reed DJ. and Beatty PW. 1980.** Biosynthesis and regulation of glutathione: toxicological implications. Rev Biochem Toxicol 2: pp. 213–241.
- **Regnault J.P. 1990.** Microbiologie générale. Montréal, Décarie, Paris, Vigot, p. 859.
- **Regoli F. and Principato G. 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metal under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. Aquatic Toxicology, 31: pp. 143-164.
- **Ruth V.V., Nikte G.O., Gerko O., Romeo C., Jorge R.P., Marceladel R.G., Arnulfo A.M. and Omar Z.P. 2014.** The effect of Titanium dioxide nanoparticles on antioxidant gene expression in tilapia. (*Oreochromis niloticus*). J NanopartRes, 2369: p. 01.
- **Sambandan D.R., and Ratner D. 2011.** Sunscreens: an overview and update. J Am Acad Dermatol, 64: pp. 748-758.
- **Schurr A. and Yagile Y. 1971.** Regulation and characterization of alkaline phosphatase in yeast. J Gen Microbiol, 65: pp. 291-303.

- **Scriban R. 1988.** Les Industries Agricoles Alimentaires. Ed. Tec &Doc, France, p. 382.
- **Sen CK., Marin E., Kretzschmar M. and Hanninen O. 1992.** Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. *J ApplPhysiol*, 73: pp. 1265–1272.
- **Smethurst D. P. and Williams H. C. 2001.** Brief communications: visualization of coronary arteries in rats by 3-dimensional real-time contrast echocardiography. *Nature*, 410: pp. 653-654.
- **Suarit R., Gopal P.K. and Sherped M. G. 1988.** Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J GenMicrobiol*, 134 : pp. 2359-2368.
- **Tchango T. 1996.** Qualité microbiologique des jus et nectars de fruits exotiques. Croissance et thermorésistance des levures d'altération, Thèse en Sciences, Lille ; n 50376-25 : p. 217.
- **Thoman R.V. 1989.** Bioaccumulation model of organic-chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technologie*, 2 : p. 699-707.
- **Thuriaux P. 2004.** Les organismes modèles la levure. Edition: Belin, Paris.
- **Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P. and Schiestl R.H. 2009.** Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res*, 69(22): p. 9-8784.
- **Turner J.R. 2006.** Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical. *The American journal of pathology*, 169(6): p. 1901-1909.
- **Van derOost R., Beyer J. and Vermeulen P.E. 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *EnvironmentalToxicology and Pharmacology*, 3: p. 57.
- **Vasserot Y. 1996.** La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. *Revue française d'œnologie* ,159: p.13-16.
- **Vidal M.L. 2001.** Etude de marqueurs biochimiques de pollution chez le mollusque bivalves d'eau douce *Corbiculafluminea*(Muller)- Purification et caraterisation des Glutathion S-Transferases .Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, 267 : p. 15, 17.
- **Vladescu B.1994.** La levure dans les industries alimentaires. Ed. Tec & Doc Lavoisier, p. 56.

- **Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang .T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y. and Chai Z. 2007.** Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*. 2: p. 176-185.
- **Wassmann S., Wassmann K. and Nickenig G. 2004.** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten*, 44: pp. 381-386.
- **Weckbercker G. and Cory J.C. 1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione -depleted mouse leukemia L 12: O Cells in vitro cancer. *Letters*, 40: p. 257-264.
- **Wong CK., Cheung L. and Ming-Ho Yo. 1999.** Toxicologie assesement of coastalsediment in Hong Kong using a flagellate *Dunalliellatertiolecta*. *Environmental pollution*, 105: p. 175-183.
- **Wu J.F., Yu Z.M., Song X.X. and Wang Y. 2006.** Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabraxjaponicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzenesulfonate. *Ecotoxicol Environ Saf*, 65: pp. 230–236.
- **Zhang. H.Y., Smith. A. and Vinka. O. 2012.** The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers *Water Research* 46 (3): pp. 691-696.
- **Zheng. S., Wang. Y. Zhou. Q. and Chen. C. 2013.** Responses of Oxidative Stress Biomarkers and DNA Damage on a Freshwater Snail (*Bellamyaaeruginosa*) stressed by Ethylbenzene. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 65 : pp. 251–259.
- **Zouaghi M.F. et Meseddek M. B. 2011.** Évaluation de deux stress : le Cadmium, le Saccharose et leur combinaison sur un modèle bio indicateur de la pollution : *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire de master, Université Badjimokhtar, Annaba, p. 9-27-28.

Sites web :

- [1] :<https://www.etudier.com/dissertations/Micro-Organisme/557813.html>. (Consultée le 02/07/2020).
- [2] :**Melquiot Pierre**.Micro-organismes.In:dictionnaireenvironnement.[Enligne]disponiblesur :http://www.dictionnaire-environnement.com/micro-organisme_ID3705.html.(consultée le 29/06/2020).
- [3] :<http://www.mondialisations.org/php/public/art.php?id=36037&lan=FR>. (Consultée le 30/06/2020).
- [4] :<https://www.geo.fr/environnement/xenobiotique-un-corps-etranger-dans-la-nature-169812>. (Consultée le 29/06/2020).
- [5] :https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_291-2/FicheTox_291.pdf. (Consultée le 01/07/2020).
- [6] :<https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-sante-du-quotidien/2605143-additif-alimentaire-definition-liste-risques/#role-additif-alimentaire> (consultée le 03/07/2020).
- [7] :https://www.thpanorama.com/blog/ciencia/Saccharomyces_cerevisiae-caractersticas-morfologa-y-ciclo-de-vida.html. (Consultée le 07/07/2020).
- [8] :<https://www.specchemonline.com/ineos-tio2-cristal-buy>. (Consultée le 01/05/2020).
- [9] INRS (2013) - Fiche toxicologique FT291 - Dioxyde de titane. Institut National de Recherche et de Sécurité.http://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_291-2/FicheTox_291.pdf.(Consultée le 20/04/2020).
- [10] :www.inrs.fr/fichetox. (Consultée le 17/06/2020).
- [11] :<https://www.didier-pol.net/2sacbos.htm>. (Consultée le 20/05/2020).
- [12] : Environmental Pollution 163 (2012) 55e61 Titanium dioxide Nanoparticule *Daphnia* Food contamination Sublethal effect Nanomaterial alteration <http://www.sciencedirect.com/science/journal/02697491>. (Consultée le 18/07/2020).