

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
Département de Biologie



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire.

Thème:

Impact toxicologique des résidus du dioxyde de titane sur des microorganismes bio-indicateurs de pollution « la paramécie »

Présenté par :

- Boukharouba Besma
- Bouregbi Amira
- Hanifi Lydia

Devant le jury composé de :

Président : M^{me}. Zidi Sourour	M.C.B	Université 08 Mai 1945 de Guelma
Examineur : M^{me}. Djemaa Fatma	M.C.B	Université 08 Mai 1945 de Guelma
Encadreur : M^{me}. Benosmane Sana	M.C.B	Université 08 Mai 1945 de Guelma

Septembre 2020

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant et miséricordieux qui nous a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur, Madame Benosmane Sana, pour ses judicieux conseils, ses directives précieuses, et de son soutien scientifique et moral au cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.

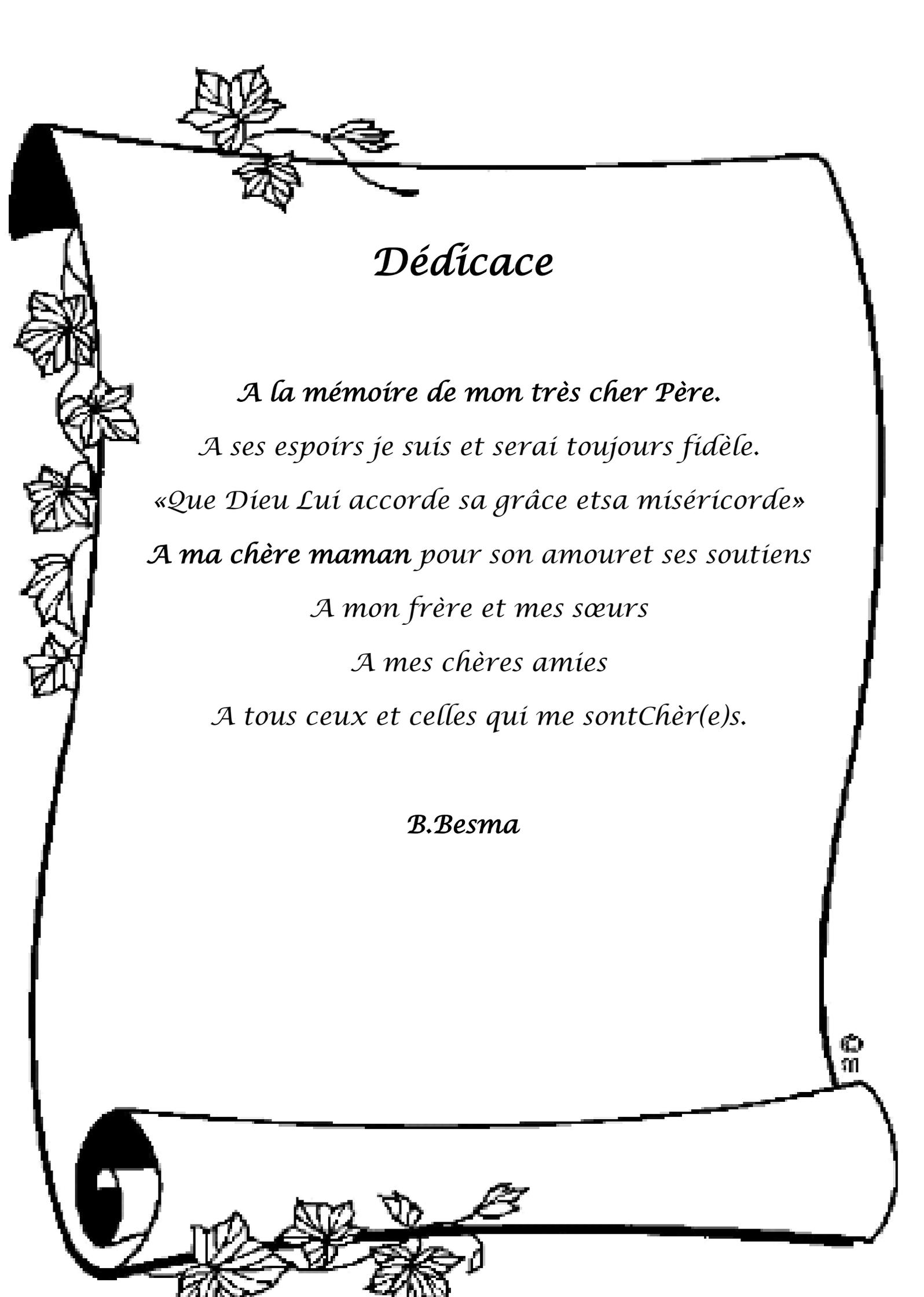
Nous remercions aussi Madame Zidi Sourour, De nous avoir honorés de sa présence et d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance de ce mémoire.

Nous voudrions également remercier vivement Madame Djemaa Fatma pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi à toutes les techniciennes des laboratoires pour leur gentillesse et leur disponibilité tout au long de la période du travail.

Nos remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

MERCI



Dédicace

A la mémoire de mon très cher Père.

A ses espoirs je suis et serai toujours fidèle.

«Que Dieu Lui accorde sa grâce et sa miséricorde»

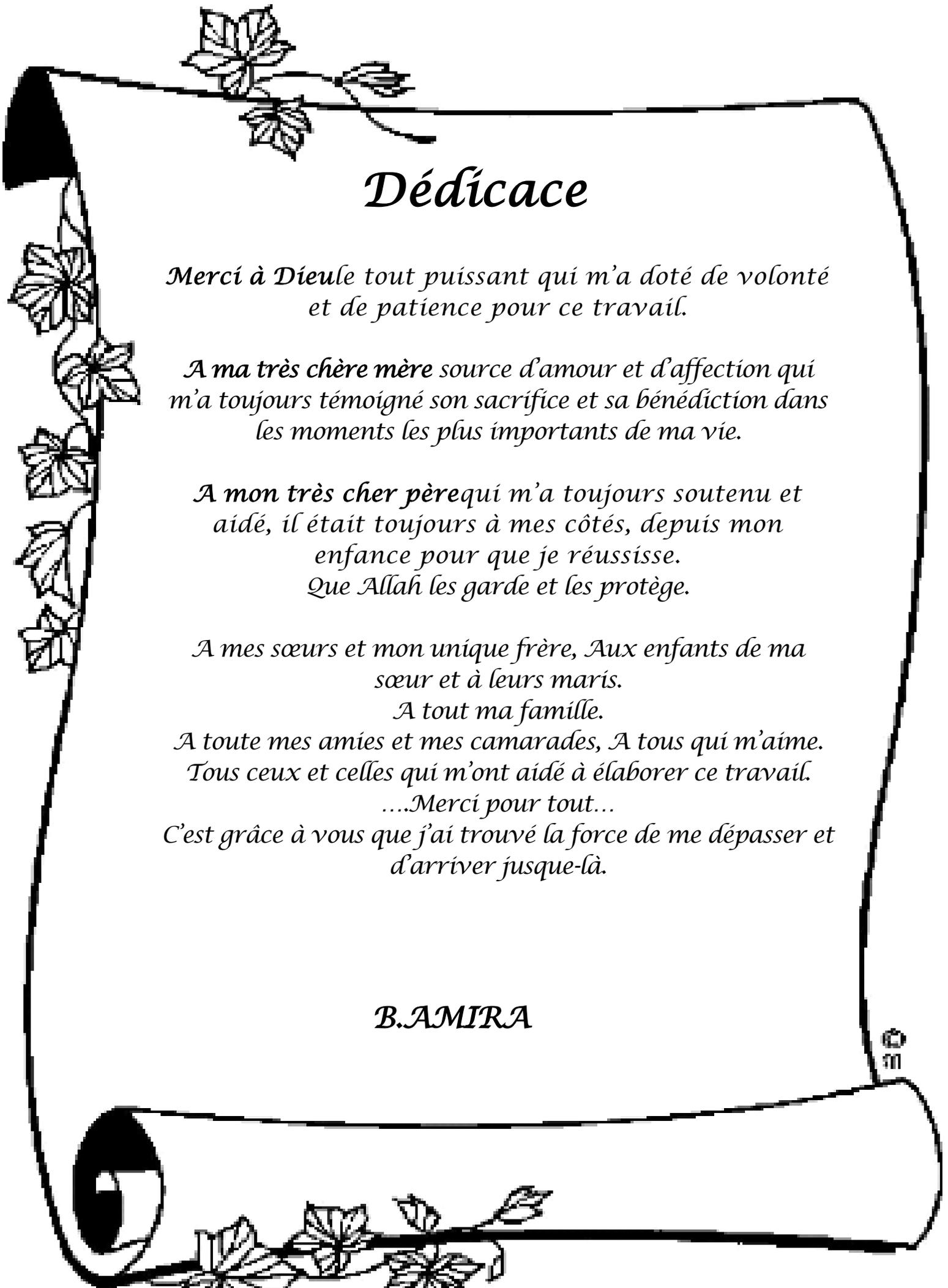
A ma chère maman pour son amour et ses soutiens

A mon frère et mes sœurs

A mes chères amies

A tous ceux et celles qui me sont Chèr(e)s.

B. Bisma



Dédicace

*Merci à Dieu tout puissant qui m'a doté de volonté
et de patience pour ce travail.*

*A ma très chère mère source d'amour et d'affection qui
m'a toujours témoigné son sacrifice et sa bénédiction dans
les moments les plus importants de ma vie.*

*A mon très cher père qui m'a toujours soutenu et
aidé, il était toujours à mes côtés, depuis mon
enfance pour que je réussisse.
Que Allah les garde et les protège.*

*A mes sœurs et mon unique frère, Aux enfants de ma
sœur et à leurs maris.*

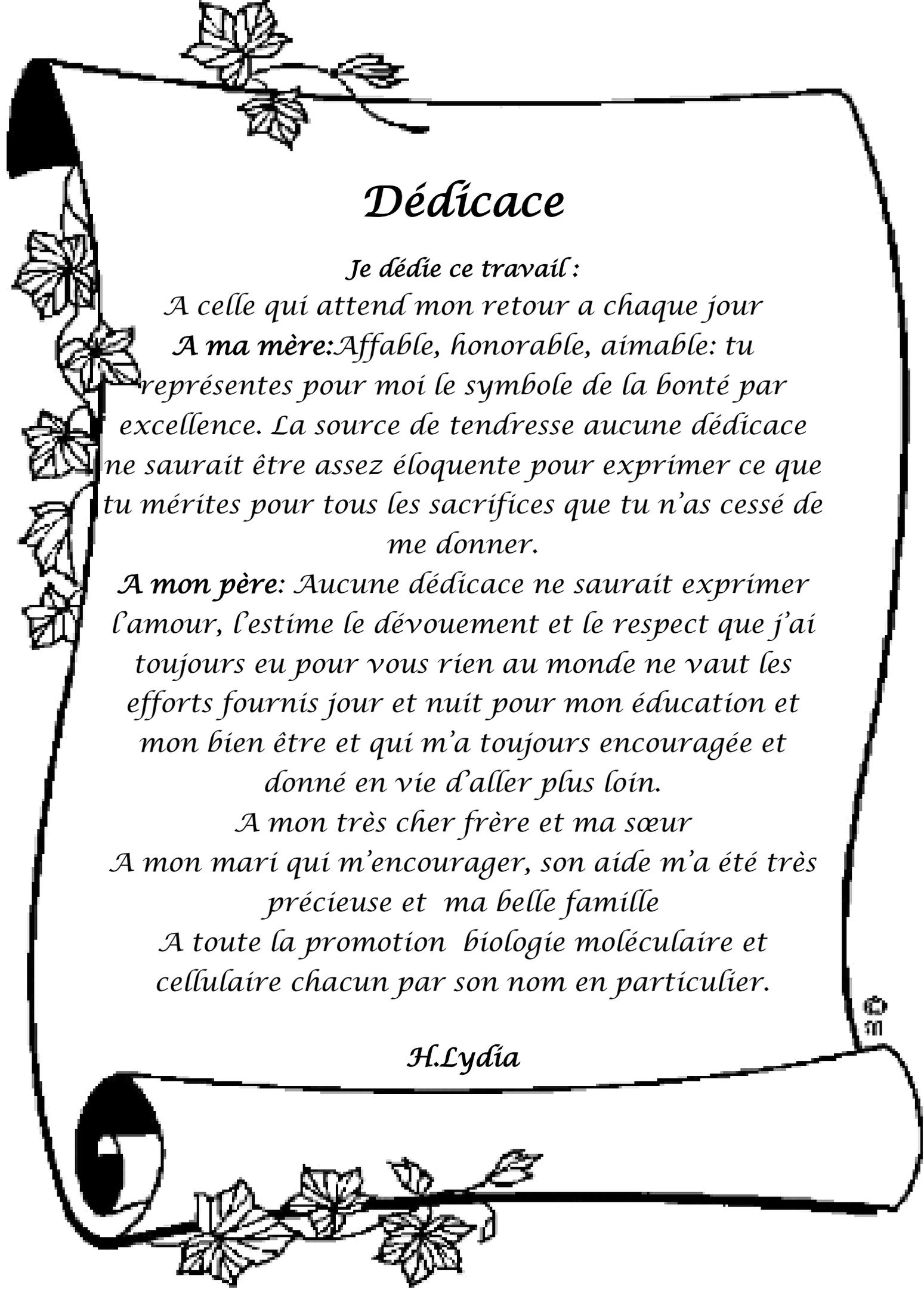
A tout ma famille.

*A toute mes amies et mes camarades, A tous qui m'aime.
Tous ceux et celles qui m'ont aidé à élaborer ce travail.*

....Merci pour tout...

*C'est grâce à vous que j'ai trouvé la force de me dépasser et
d'arriver jusque-là.*

B.AMIRA



Dédicace

Je dédie ce travail :

*A celle qui attend mon retour a chaque jour
A ma mère: Affable, honorable, aimable: tu
représentes pour moi le symbole de la bonté par
excellence. La source de tendresse aucune dédicace
ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que
tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de
me donner.*

*A mon père: Aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, l'estime le dévouement et le respect que j'ai
toujours eu pour vous rien au monde ne vaut les
efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et
mon bien être et qui m'a toujours encouragée et
donné en vie d'aller plus loin.*

*A mon très cher frère et ma sœur
A mon mari qui m'encourager, son aide m'a été très
précieuse et ma belle famille*

*A toute la promotion biologie moléculaire et
cellulaire chacun par son nom en particulier.*

H. Lydia



Table des matières



Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste Des Figures

Liste Des Abréviations

Résumé

Abstracts

ملخص

Introduction générale Erreur ! Signet non défini.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.La paramécie	4
1.Rappel sur la paramécie	4
1.1.Structure de la paramécie	4
1.2.Locomotion de la paramécie	5
1.3.Nutrition de la paramécie	6
1.4.Respiration de la paramécie	7
1.5.Reproduction de la paramécie	7
1.6.Dimorphisme nucléaire et cycle de vie	7
1.6.1. Dimorphisme nucléaire	7
1.6.2.Cycle de vie	8
1.7.La classification de la paramécie	9
1.8.Le choix de la paramécie comme modèle biologique	9
II.le Dioxyde de Titane	9
1.Généralité sur le TiO₂	9
2.Origine du TiO₂	10
3.Les applications de TiO₂	11
4.Mécanisme d'action de TiO₂	12
5.Structure cristalline de TiO₂	12
6.Toxicocinétique	13
6.1.Absorption	14
6.1.1.Absorption broncho-pulmonaire	14
6.1.2.Absorption cutanée	14

6.1.3.Absorption gastro-intestinale	14
6.2.Distribution	15
6.3.Métabolisme	15
6.4.Elimination	15
7.Cytotoxicité des nanoparticules de TiO ₂	16
7.1.Etude de survie /prolifération cellulaires	16
7.2.Stress oxydant	17
7.3.Internalisation cellulaire	17
8.Les effets de TiO ₂	18
8.1.Sur l'homme	18
8.2.Sur les animaux (le rongeur in vivo)	18
8.3.Effet toxique de TiO ₂ sur les microorganismes	18

Chapitre II : Matériel et méthodes

1.Matériel	21
1.1.Matériel biologique	21
1.2.Matériel chimique	21
1.2.1.Propriétés physiques	21
1.2.2.Propriétés chimiques	22
2.Méthodes	23
2.1.Préparation de la culture de paramécies	23
2.1.1.Culture mixte	23
2.1.2.Préparation du milieu de culture	23
2.1.3.Incidence du milieu de culture sur la croissance des paramécies	23
2.1.4.Protocol de traitement	24
2.2.Paramètre mesurés	25
2.2.1.Cinétique de croissance cellulaire	25
2.2.2.Calcul du pourcentage de réponse	26
2.2.3.Dosages des protéines totales	27
2.2.4.Dosages des biomarqueurs enzymatiques	28
2.2.4.1.Dosage de l'activité Catalase (CAT)	28
2.2.4.2.Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST)	29
2.2.5.Dosages des biomarqueurs non enzymatiques	30
2.2.5.1.Dosage du Glutathion (GSH)	30

Chapitre III : Discussion et conclusion

Discussion	34
1.Evaluation de la toxicité du Dioxyde de titane sur la croissance des paramécies	35
2.Evaluation de la toxicité du TiO₂ sur la synthèse des macromolécules (protéines) des Paramécies	35
3.Effet des NPs TiO₂ sur les bio-indicateurs de stress oxydatif	36
Conclusion Générale	39
Perspectives	40
RéférencesBibliographiques	42

Liste Des Figures

N° Figure	Titre	Page
01	paramécie sous microscope.	04
02	Représentation schématique de l'organisation générale des principaux organites de la paramécie.	05
03	Formation de vacuole alimentaire et processus de cyclose dans le <i>Paramecium</i> .	06
04	Dimorphisme nucléaire chez la paramécie.	08
05	cycle de vie du <i>Paramecium</i> .	08
06	Les principaux domaines d'application du TiO ₂ .	10
07	TiO ₂ comme (a) : pigment, (b) dans les médicaments, (c) dentifrice.	11
08	Toxicocinétique et sites d'accumulation des NPs de TiO ₂ . Les flèches en pointillé représentent les points d'incertitude.	16
09	Formule développée du Dioxyde de titane.	22
10	Poudre de dioxyde de titane.	22
11	lame de comptage pour les cellules de paramécies. (a) : représentation schématique. (b) : photo sous microscope optique.	26
12	Conjugaison du glutathion (GSH) avec le 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB).	29
13	Formule chimique du Glutathion.	30
14	Réaction d'Ellman entre le glutathion et le DTNB.	31

Liste Des Abréviations

BBC : Bleu brillant de coomassie.
BSA : l'Albumine de sérum de bœuf.
CAT : Catalase.
CDNB :1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène.
CL : concentration létale.
CNRS : Centre National de Séquençage.
DTNB :Acide 5,5''Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.
EDTA :Ethylène diamine tétra-acétique.
GPx : Glutathion peroxydase.
GSH : Glutathion.
GST :Glutathion-S-transférases.
GSSH : Glutathion réduit.
H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène.
IES: Internal Eliminated Sequences.
MIC : micronoyau.
NC :Nombre des cellules témoins.
NP : Nanoparticule.
RO :alkoxyl.
ROO :alkoxylradical.
ROS :Espèces réactives oxygénées .
SOD:Superoxyde dismutase.
SSA : acide sulfo-salicylique.
TiO₂ :Dioxyde de titane.
Ti₄⁺ :ion de titane.
TNB :Thionitrobenzoïque.
Tp :Tampon phosphate.
Tris:Tris-hydroxyméthyl-aminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3).

Résumé

Notre travail concerne l'évaluation de la toxicité potentielle des nanoparticules de Dioxyde de Titane (TiO₂) sur un modèle cellulaire alternatif en l'occurrence un protiste cilié d'eau douce «*Paramecium sp*» pour son utilisation dans le cadre de la lutte contre la pollution des milieux aquatiques puisqu'il est considéré comme bio-indicateur et qui est parfaitement adapté aux études toxicologiques pour évaluer aisément la toxicité des xénobiotiques. D'après la synthèse bibliographique et des études effectuées sur l'impact toxicologique des nanoparticules TiO₂ sur certains micro-organismes comme les paramécies et autres, ce xénobiotique montre une action sur les paramètres physiologiques et biochimiques, qui révèlent des variations dues à l'exposition aux différentes concentrations des nanoparticules sur le matériel biologique testé. Selon la bibliographie, des perturbations physiologiques concernant la mobilité et la croissance des protistes traités par des concentrations croissantes du TiO₂ (entre 90 et 120 mg/l) seront enregistrés. Parallèlement, l'étude biochimique indiquera des modifications et des perturbations métaboliques dans la teneur en protéines totales, dans l'activité des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques (CAT, GST et GSH) chez les organismes traités par rapport aux témoins.

Mots clés : TiO₂, nanoparticules, toxicité, stress oxydatif, *Paramecium sp.*, biomarqueur.

Abstracts

Our work concerns the evaluation of the potential toxicity of Titanium Dioxide nanoparticles (TiO₂) on an alternative cellular model, in this case a ciliated freshwater protist "*Paramecium sp*" for its use in the fight against pollution of aquatic environments since it is considered as a bio-indicator and which is perfectly suitable for toxicological studies to evaluate easily the toxicity of xenobiotics. According to the literature review and studies carried out on the toxicological impact of TiO₂ nanoparticles on certain microorganisms such as *paramecia* and others, this xenobiotic shows an action on physiological and biochemical parameters, which reveal variations following the different concentrations of nanoparticles on the biological material tested. According to the bibliography, physiological disturbances concerning the mobility and growth of protists treated with increasing concentrations of TiO₂ (between 90 and 120 mg / l) will be recorded. At the same time, the biochemical study will indicate changes and metabolic disturbances in the content of total protein, in the activity of enzymatic and non-enzymatic biomarkers (CAT, GST and GSH) in the treated organisms compared to the controls.

Keywords: TiO₂, nanoparticles, Toxicity, Oxidative Stress, *Paramecium sp*, Biomarker.

ملخص

يركز عملنا على تقييم السمية المحتملة للجسيمات النانوية لثاني أكسيد التيتانيوم (TiO₂) على نموذج خلوي وهو في هذه الحالة عنصر مهدب من المياه العذبة "*Paramecium sp*" لاستخدامه في مكافحة تلوث البيئات المائية لأنه يعتبر مؤشراً بيولوجياً مناسباً تماماً للدراسات السمية لتقييم سمية الكائنات الحية الدقيقة بسهولة. وفقاً لمراجعة الأدبيات والدراسات التي أجريت على التأثير السمي لجزيئات TiO₂ النانوية على بعض الكائنات الحية الدقيقة مثل البراميسيوم وغيرها، فإن هذا النوع من الكائنات الحية الدقيقة يظهر عملاً على المعلمات الفيسيولوجية والكيميائية الحيوية، والتي تكشف عن الاختلافات وفقاً للتراكيز المختلفة من الجسيمات النانوية على المواد البيولوجية المختبرة. وفقاً للمراجع، سيتم تسجيل اضطرابات فسيولوجية متعلقة بحركة ونمو البروتستالات المعالجة بتراكيز متزايدة من TiO₂ (بين 90 و 120 مغ / لتر). في الوقت نفسه، ستشير الدراسات البيوكيميائية إلى تغيرات و اضطرابات أيضاً في كمية البروتين الكلي و في نشاط المؤشرات الحيوية و الإنزيمية و غير الإنزيمية عند الكائنات المعالجة مقارنة بالكائنات الحية الشاهدة.

كلمات البحث: ، السمية، إجهاد الأكسدة ثاني أكسيد التيتانيوم *Paramecium sp* المؤشرات الحيوية، .

Introduction

Générale



Au cours des dernières années, les nanotechnologies ont été développées dans plusieurs directions, attirant d'importants investissements gouvernementaux et commerciaux et des intérêts académiques considérables (**Mattia et al., 2014**).

Des études ont montré que les nanoparticules TiO_2 sont l'un des cinq principaux types de NPs utilisés dans les produits de consommation (**Jing et al., 2018**). Le dioxyde de titane est un composé que, sans s'en rendre compte, l'on rencontre dans la vie quotidienne. Il est employé traditionnellement dans les revêtements, cosmétiques, savons, médicaments..., mais depuis quelques années, des chercheurs ont trouvé qu'en réduisant la taille des particules de dioxyde de titane à l'échelle du nanomètre, il présente d'autres propriétés telles qu'une super hydrophile et des propriétés dépolluante (**Alex et al., 2013**).

Cependant, les chercheurs ont soulevé leurs préoccupations à propos de l'impact environnemental et la toxicité des NPs. Actuellement, les études sont croissantes et de nombreux chercheurs sont d'avis que la toxicité et le devenir des nanomatériaux doivent être étudié avant de trop développer leurs applications. Il y'a un sérieux manque d'information concernant la santé humaine et les implications environnementales des nanoparticules (**Sajid et al., 2015**).

Les microorganismes, omniprésents dans l'air, le sol et l'eau, ainsi que sur la peau et les cheveux, sont impliqués dans tous les processus de la terre et ont un impact profond sur nos vies et notre environnement (**Jing et al., 2018**). 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 (**Frédéric, 2014**).

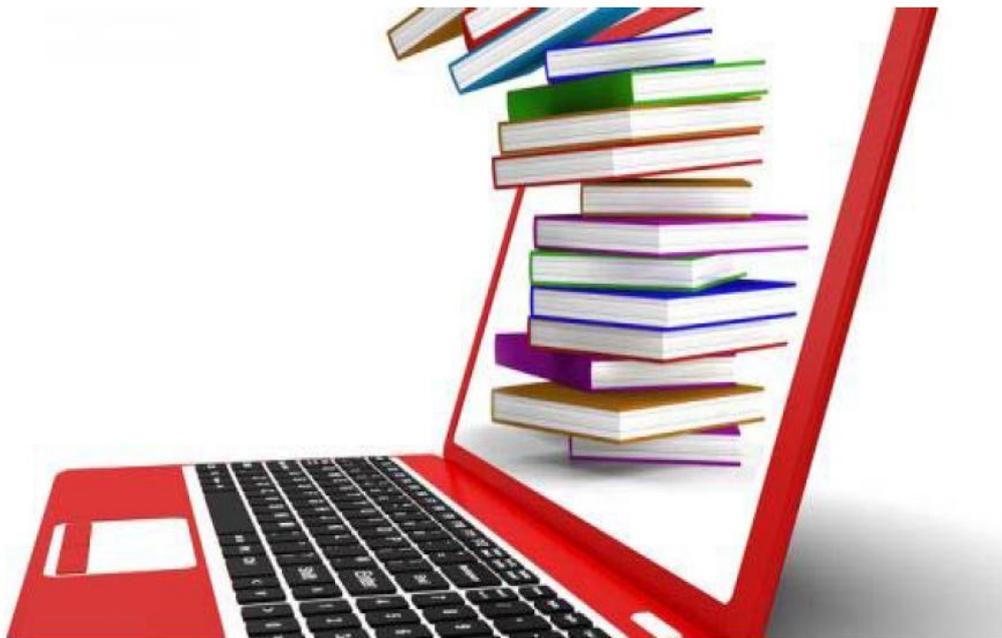
Il est nécessaire de disposer d'indicateurs de perturbation de l'environnement à travers des organismes ou un ensemble d'organismes que l'on utilise comme sentinelles en étudiant les modifications physiologiques, biochimiques et écologiques qui les affectent. Ces êtres vivants très sensibles aux contaminants présentent l'intérêt de se prêter plus facilement que l'homme aux études des effets des polluants et permettent de mettre en évidence des pollutions chroniques ou brutales (**Bouaricha, 2013**).

Cette étude est consacrée à la compréhension de l'effet du TiO_2 sur un modèle biologique bio-indicateur de pollution *Paramecium* sp., en étudiant les différentes modifications qui les affectent. Les modèles cellulaires sont surtout utiles pour détecter les mécanismes d'une toxicité observée in vivo. D'une part, nous voulons étudier l'impact toxicologique de ces xénobiotiques sur la physiologie c'est-à-dire sur la croissance des protistes étudiés et d'une seconde part sur la biochimie de ces derniers.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique



I. La paramécie :

1. Rappel sur la paramécie :

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé au microscope. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille (120 μm de longueur en moyenne et 48 μm de largeur environ), la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle d'étude privilégié pour les biologistes cellulaires.

Elle est abondante dans les étangs d'eau douce et appartient au groupe d'organismes appelés protozoaires. La plupart d'entre eux sont microscopiques avec plus de 80 000 espèces différentes identifiées (Samworth et Morgan, 2000).

1.1. Structure de la paramécie :

La paramécie, polarisée et asymétrique, présente de nombreux organites différenciés ayant des fonctions très spécialisées : **le goulet** de phagocytose permet l'ingestion des bactéries, **le cytoprocte** (ou anus cellulaire) est nécessaire à l'expulsion des déchets, et **les vacuoles pulsatiles** servent à réguler l'osmolarité.

Une des plus grandes caractéristiques de la paramécie est la présence de milliers de **cils vibratoires** sur sa surface, permettant la locomotion et la nutrition.

La paramécie possède également une voie de sécrétion régulée, la voie d'exocytose, **des trichocystes**, moyen de défense contre ses prédateurs, ainsi qu'un cortex complexe (Damaj, 2012).

La paramécie possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires : **un macronucléus et un micronucleus**.

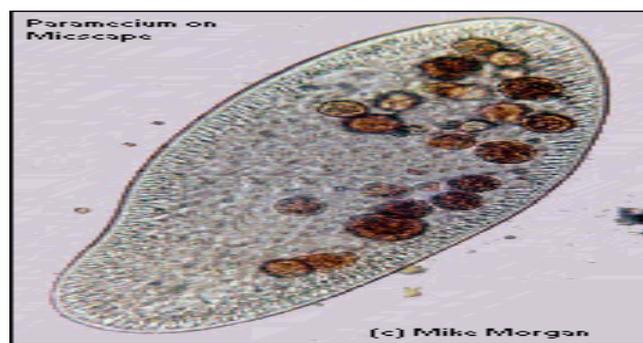


Figure 1: Paramécie sous microscope (Grossissement $\times 40$). (Samworth et Morgan, 2000)

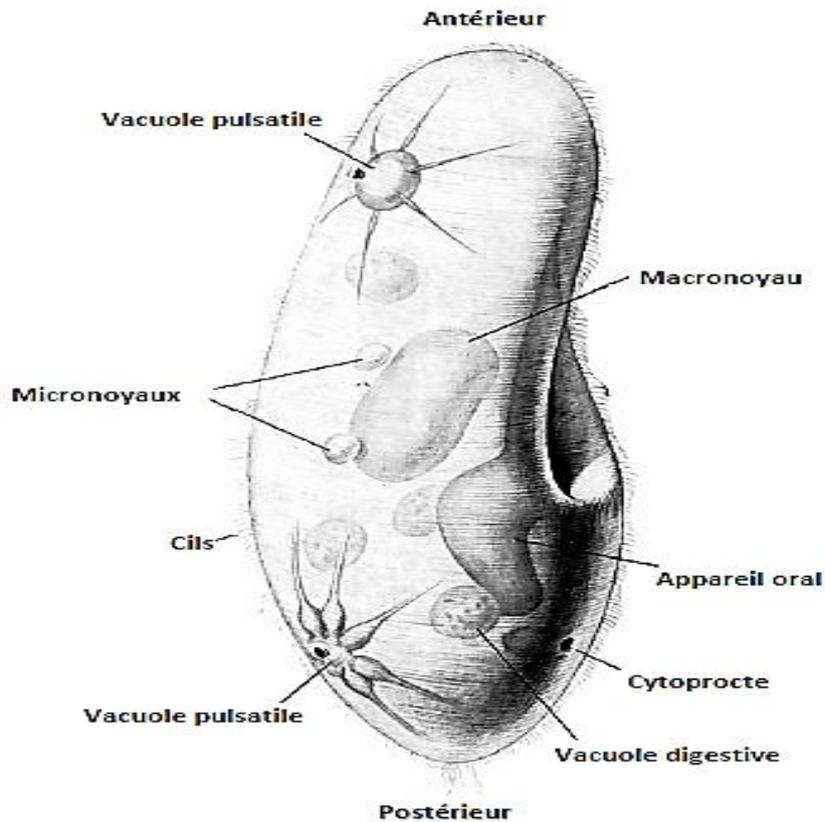


Figure 2: Représentation schématique de l'organisation générale des principaux organites de la paramecie. (Bengueddach, 2016)

1.2. Locomotion de la paramecie :

La surface extérieure de la cellule est recouverte de plusieurs centaines de minuscules structures ressemblant à des cheveux appelées cils. Ceux-ci agissent comme des rames microscopiques pour pousser à travers l'eau, permettant à l'organisme de nager. La vitesse de déplacement est environ quatre fois sa propre longueur par seconde. Il se déplace si rapidement que les microscopistes doivent ajouter un agent épaississant à l'eau pour la ralentir et l'étudier.

En se déplaçant dans l'eau, il tourne sur son axe et de petites particules de débris et de nourriture sont collectées et balayées dans l'œsophage. Si le *Paramecium* rencontre un obstacle, il s'arrête, inverse le battement des cils, nage en arrière, tourne à travers un angle et avance à nouveau sur un parcours légèrement différent (Samworth et Morgan, 2000).

Il le fera à plusieurs reprises jusqu'à ce qu'il dépasse l'obstruction [1].

1.3. Nutrition de la paramécie :

La paramécie se nourrit de manière holozoïque et est un nourrisseur sélectif. Il se nourrit de bactéries, de petits protozoaires, d'algues unicellulaires, de diatomées, ...etc. Un *Paramecium* unique peut se nourrir de 2 à 5 millions de bactéries en 24 heures[2].

Il ne peut absorber de nourriture qu'au niveau du cytostome. Les cils dans la rainure buccale créent un courant d'eau qui fait remonter les organismes alimentaires jusqu'au cytostome où ils sont ingérés dans une vacuole alimentaire. Cette vacuole alimentaire suit alors une route spécifique à travers le cytoplasme. Au cours de ses voyages, les enzymes sont sécrétées dans la vacuole et la nourriture est digérée. Les substances digérées sont ensuite absorbées dans le cytoplasme. Toute matière non digérée est expulsée par le pore anal [1].

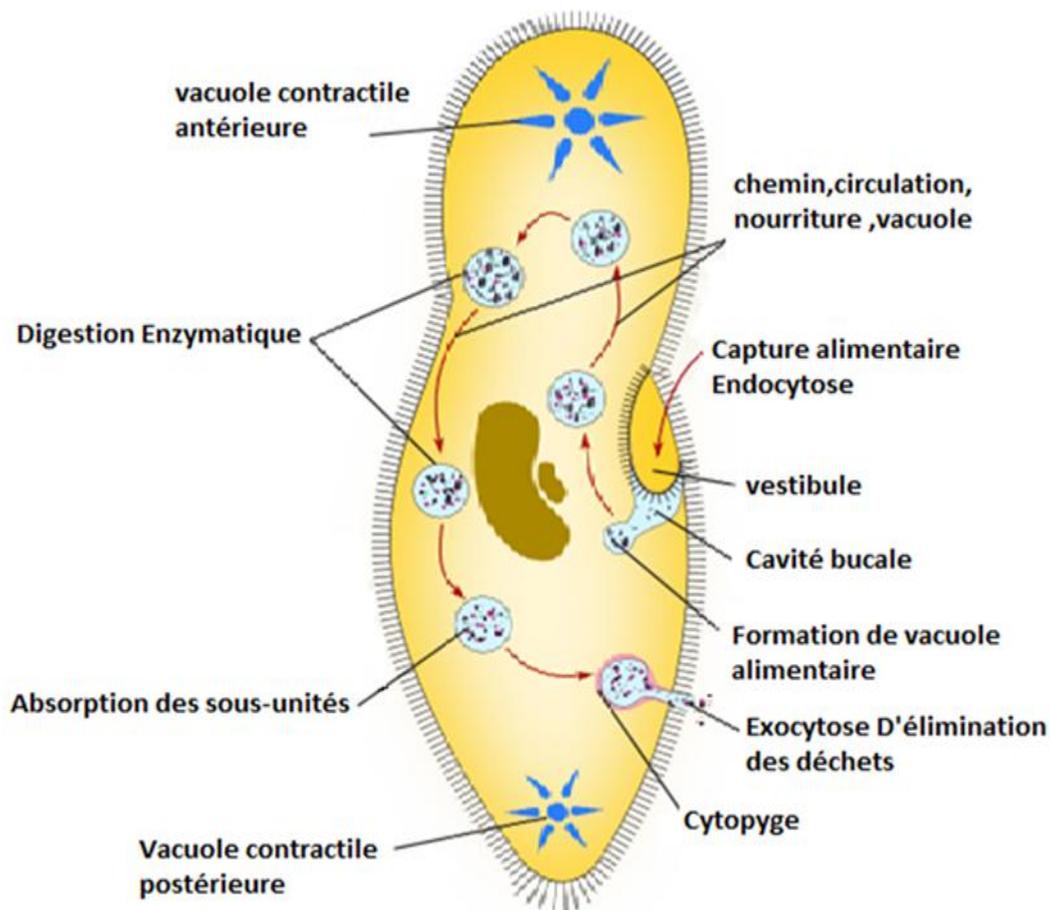


Figure 3: Formation de vacuole alimentaire et processus de cyclose dans le *Paramecium*. [2]

1.4. Respiration de la paramécie:

L'absorption de l'oxygène et le rejet du gaz carbonique se font à travers la membrane cellulaire.

Les gouttelettes d'eau, absorbées au moment de la capture de la nourriture, contiennent de l'oxygène. L'eau rejetée par les vésicules pulsatiles contient une forte proportion de gaz carbonique (Wehner et Gehring, 1995).

1.5. Reproduction de la paramécie:

La paramécie a deux moyens de reproduction, la division simple et la conjugaison.

- **La division** : Dans des conditions favorables, la cellule se divise en deux par un processus appelé fission binaire. Cela forme deux nouvelles cellules, dont chacune se développe rapidement toutes les nouvelles structures nécessaires et augmente en taille. Tout ce processus se déroule deux ou trois fois par jour si les conditions sont réunies.

-**La conjugaison**: Il s'agit d'une méthode plus compliquée. Il s'agit de deux cellules se réunissant pour échanger des matières nucléaires. Les deux cellules se séparent alors et continuent de se reproduire par simple division. Il est similaire à certains égards à la reproduction sexuée chez les animaux plus complexes (Samworth et Morgan, 2000).

1.6. Dimorphisme nucléaire et cycle de vie:

1.6.1. Dimorphisme nucléaire :

Comme tous les ciliés, elle possède deux noyaux différents. Le micronoyau (MIC), diploïde et non transcrit, renferme le génome germinale transmis à la descendance sexuelle. Le macronoyau (MAC) somatique, polyploïde, est le siège de la transcription génique et est essentiel pour la survie. A chaque cycle sexuel, le MAC parental est détruit et un nouveau MAC se différencie à partir d'une copie du noyau zygotique contenant le génome germinale (Bétermier, 2014).

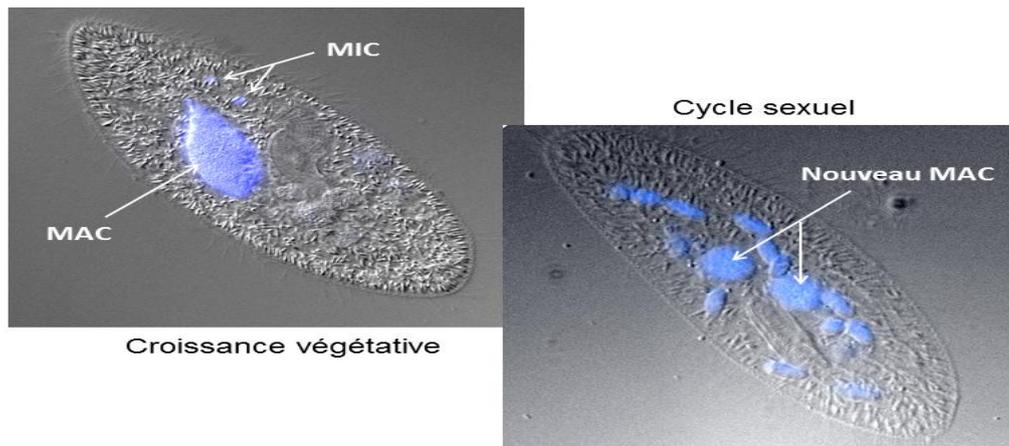


Figure 4: Dimorphisme nucléaire chez la paramécie. (Bétermier, 2014)

1.6.2. Cycle de vie :

Le cycle de vie de la paramécie est représenté dans la figure ci-dessous :

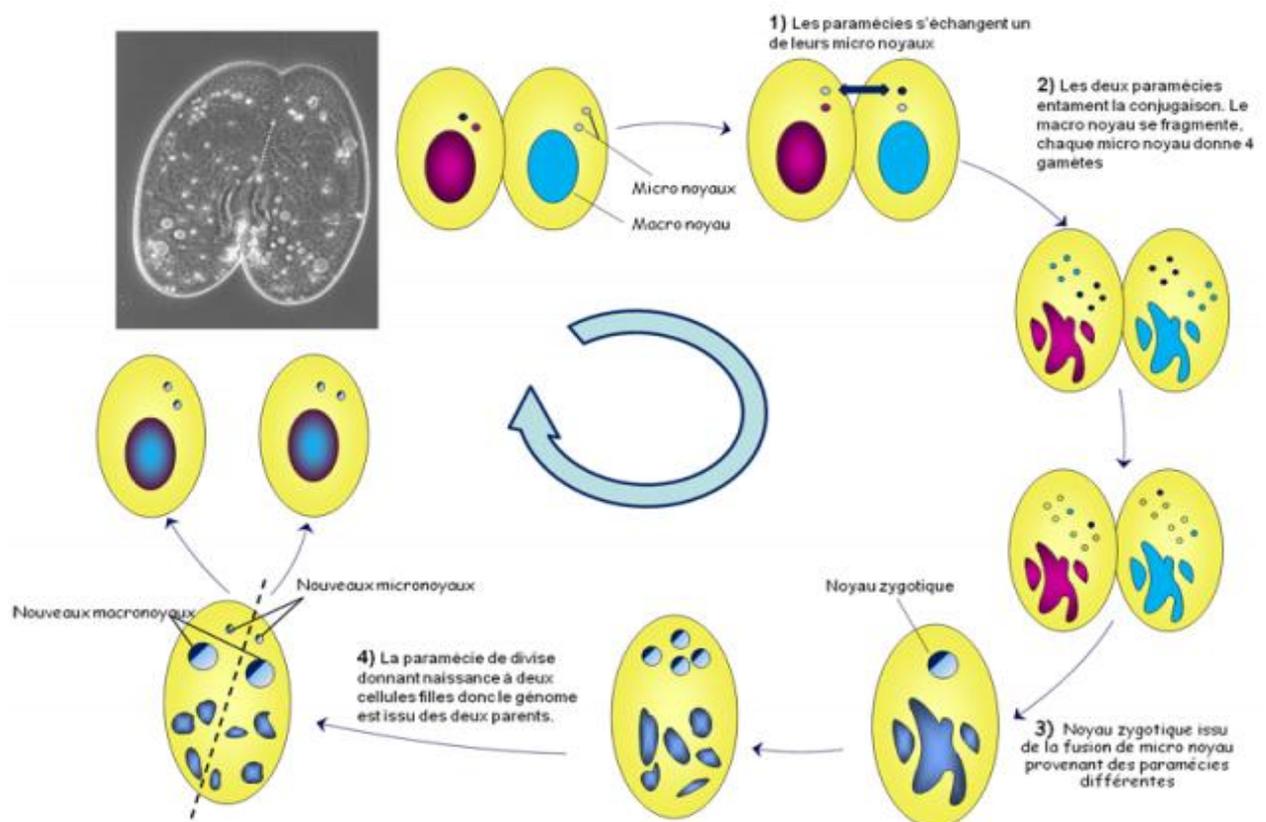


Figure 5: Cycle de vie du Paramecium. (Bétermier, 2010)

1.7. La classification de la paramécie:

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

Règne :Protista

Embranchement : Ciliophora

Classe :Oligohymenophora

Ordre : Peniculida

Famille : Parameciidae

Genre : *Paramecium*

1.8. Le choix de la paramécie comme modèle biologique:

Les paramécies sont utilisées dans les études d'écotoxicologie et de toxicologie puisque ce sont d'excellents bio-indicateurs :

- pour leur facilité de culture et leur faible coût.
- Les cils de la paramécie ont une structure identique à celle des cils de la trachée.
- Elles permettent l'étude des mécanismes d'action des xénobiotiques à l'échelle cellulaire et subcellulaire (Rouabhi et Bazouzi, 2012).

II. le Dioxyde de Titane :

1. Généralité sur le TiO₂ :

Le TiO₂ est un oxyde métallique, et le 9^{ème} composant le plus abondant dans la croûte terrestre. Il a été découvert en 1791 en Angleterre, mais son exploitation commerciale en tant que composé pur n'a commencé qu'en 1913 (Armand, 2013).

Il est traditionnellement utilisé comme pigment dans les revêtements de surface (peintures, vernis et laques), plastiques, papiers et, de façon moins importante, dans les fibres, caoutchoucs, cuirs, céramiques, encres d'imprimerie, cosmétiques, savons, médicaments et certains produits alimentaires, mais également comme support de catalyse (Romero, 2013).

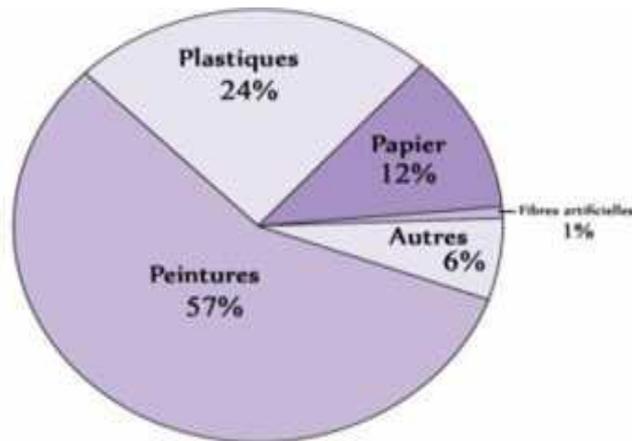


Figure 6: Les principaux domaines d'application du TiO₂. (Akbatche et Tayeb, 2017)

L'oxyde de titane est largement produit dans le monde, avec un volume de vente annuel supérieur à 3,5 millions de tonnes et une consommation mondiale augmentant d'environ 2% par an (Azouani, 2009).

Le TiO₂ est largement considéré comme un photo-catalyseur, car il est très efficace, chimiquement et biologiquement inerte, photostable, peu coûteux et a une bonne dureté mécanique (Tuyet et al., 2011).

2. Origine du TiO₂ :

L'élément Titane et le composé TiO₂ se retrouvent partout dans le monde, liés à d'autres éléments tels que le fer, dans plusieurs types de roches et de sables minéralisés (dont une partie des sables de plage).

Le Titane se présente le plus souvent sous forme d'ilménite minérale (un minéral d'oxyde de Titane et de fer) et parfois sous forme de rutile minéral, une forme cristallographique de TiO₂. Le Titane doit être séparé des autres éléments par un processus chimique pour obtenir du dioxyde de titane pur.

La façon dont le dioxyde de titane pur est extrait des minerais contenant du titane dépend de la composition du minerai ou de la charge d'origine. Deux méthodes sont utilisées pour fabriquer du TiO₂ pur : un procédé au sulfate et un procédé au chlore. Parmi les deux méthodes d'extraction, le procédé au sulfate est actuellement la méthode de production de TiO₂ la plus répandue dans l'Union Européenne [3].

3. Les applications de TiO₂ :

Du fait de ces propriétés, on peut trouver différents champs d'applications pour le TiO₂, micrométrique tout d'abord puis nanométrique à présent (**Haddadi et Rezgui, 2015**).

a) Comme pigment:

Un peu moins de 4 millions de tonnes de TiO₂ sont consommés dans le monde chaque année. Son indice de réfraction et sa blancheur font qu'il est utilisé dans les peintures, revêtements, plastiques, encres. Il est également utilisé, pour la même raison, dans la composition de médicaments et dentifrices. Enfin, le TiO₂ est un colorant alimentaire, le E 171 (**Laidi, 2019**).



Figure 7: TiO₂ comme : (a) pigment, (b) dans les médicaments, (c) dentifrice. (**Laidi, 2019**)

b) Dans les écrans solaires :

Le TiO₂ 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 TiO₂ est, à l'heure actuelle, utilisé dans presque toutes les crèmes solaires, car les absorbeurs d'UV minéraux (à base de TiO₂ ou d'oxyde de zinc) entraînent moins de problèmes de photoallergie que les absorbeurs d'UV chimiques. De plus, le TiO₂ nanométrique est plus intéressant que le TiO₂ micrométrique pour les crèmes solaires car il laisse moins de traces sur la peau (**Haddadi et Rezgui, 2015**).

c) Dans les implants biologiques :

Le TiO₂ micrométrique a longtemps été considéré comme un matériau inerte, ce qui en faisait un bon composant des implants biologiques. De plus, la présence de TiO₂ 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 TiO₂ micrométrique (Armand, 2013).

d) Comme photocatalyste :

Les UV adsorbés à la surface du TiO₂ nanométrique permettent d'oxyder l'eau en O₂ et H₂ (phénomène connu sous le nom d'effet Honda Fujishima), découvert en 1967 par Akira Fujishima. 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 ou désodorisantes (Armand, 2013).

Le TiO₂ nanométrique est, dans ce cas, utilisé pour ses propriétés autonettoyantes. On estime la production actuelle mondiale de TiO₂ à 4 millions de tonnes, dont une quantité pour l'instant assez faible (de l'ordre de quelques % de la quantité totale de TiO₂ produit) de TiO₂ nanométrique. Ceci est principalement dû au coût élevé de fabrication du TiO₂ nanométrique (plus de 170 \$/ kg contre 2 \$/kg pour le TiO₂ micrométrique) et les prévisions indiquent que cette quantité va croître très rapidement dans le futur, du fait de ses propriétés physicochimiques plus intéressantes que celles du TiO₂ micrométrique (Armand, 2013).

4. Mécanisme d'action de TiO₂ :

Le TiO₂ endommage l'ADN, désorganise les fonctions cellulaires, interfère avec les activités de défense des cellules immunitaires et, en absorbant des fragments bactériens et en les faisant passer à travers le tractus gastro-intestinal, peut provoquer une inflammation (Boumaaza et al., 2013).

5. Structure cristalline de TiO₂ :

Le dioxyde de titane TiO₂ se trouve dans la nature sous trois différentes formes qui sont, dans l'ordre d'abondance, le rutile, l'anatase et la brookite (Muscat et al., 2002).

a) La phase rutile :

Le rutile est un minéral composé principalement de 90 à 95% de dioxyde de titane. Il fut découvert en 1803 par Wener en Espagne. Le rutile de couleur rouge, est la variété de l'oxyde de titane la plus stable à températures élevées. Il se trouve dans les roches magmatiques et métamorphiques. La maille élémentaire de cette phase est de symétrie tétragonale (**Goujil, 2013**). C'est la forme la plus dense du dioxyde de titane, stable à hautes températures et hautes pressions (**Benachour, 2011**).

b) La phase anatase :

C'est une forme de l'oxyde de titane naturel, que l'on rencontre moins fréquemment. L'anatase fut découverte en 1801 par Haüy. Il présente une vaste gamme de teintes, de quasi incolore à brun, en passant par le verdâtre.

La maille élémentaire de l'anatase est également de symétrie tétragonale (**Goujil, 2013**), métastable qui tend à évoluer vers la structure plus compacte du rutile. Comme dans le rutile (**Kertesz, 1991**). Cette structure est généralement formée à des températures plus basses que celles de la formation du rutile et encore plus du brookite (**Aounallah, 2016**).

c) La phase brookite :

La brookite est une phase métastable, donc il est difficile de la préparer pur sous les conditions de laboratoire, mais il est possible de la retrouver comme une phase secondaire avec l'anatase et le rutile. Il fut découvert en 1825 par A Levy en Snowen (Angleterre). La brookite appartient au système cristallin orthorhombique (**Goujil, 2013**).

6. Toxicocinétique :

La Toxicocinétique est la description de la vitesse à laquelle une substance pénètre dans l'organisme par différentes voies d'exposition et son devenir après son entrée dans l'organisme. Le niveau ou la concentration de NPs de TiO₂ dans le système corporel dépend du taux (ou cinétique) d'absorption, de distribution, du métabolisme et de l'excrétion des NPs de TiO₂. Ces processus peuvent survenir après une exposition par inhalation, ingestion, contact cutané et injection intra péritonéale ou intraveineuse. La Toxicocinétique des NPs TiO₂ sera discutée en fonction des différentes cinétiques (**Shi et al., 2013**).

6.1. Absorption :

Après le dépôt de NP au site d'exposition initial, l'absorption et la translocation vers des sites systémiques est une étape critique de la Toxicocinétique. Elle est souvent définie comme la migration du NP vers les organes distaux (Shi et al., 2013).

6.1.1. Absorption broncho-pulmonaire :

La rétention pulmonaire des particules nanométriques (20 nm, anatase) est plus importante que celle des particules fines (250 nm, anatase) : la demi-vie de rétention est estimée à 501 jours pour les nanoparticules et à 174 jours pour les particules fines. Après inhalation, le dioxyde de titane s'accumule dans l'appareil respiratoire, différemment selon la taille des particules ; sous sa forme nanométrique, il est retrouvé au niveau des ganglions lymphatiques et en très faible quantité dans le foie.

Après instillation nasale, les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent subir une translocation neuronale et être retrouvées dans certaines régions du cerveau (Jargot et al., 2013).

6.1.2. Absorption cutanée :

L'absorption cutanée des NPs de TiO₂ est intéressante car de nombreux produits de consommation, tels que les cosmétiques et les écrans solaires peuvent contenir des NPs de TiO₂. La peau extérieure des êtres humains est constituée d'une couche dure cornée formée par les cellules mortes qui est difficile à pénétrer pour les particules inorganiques. Par conséquent, il est peu probable que des particules inorganiques pénètrent la peau intacte dans des conditions normales. Il convient de noter que, bien que les cosmétiques et les écrans solaires contenant du TiO₂ soient normalement utilisés sur une peau intacte. De légères blessures à la peau peuvent survenir dans certaines circonstances, telles que la force physique ou les coups de soleil (Shi et al., 2013).

6.1.3. Absorption gastro-intestinale :

Une étude récente met en évidence le faible taux d'absorption gastro-intestinale, les nanoparticules de TiO₂, localisées au niveau de la muqueuse de l'estomac et de l'intestin grêle de rat ne passant pas dans la circulation systémique (Jargot et al., 2013).

6.2. Distribution :

Après l'absorption initiale des NPs de TiO₂, le système de circulation peut distribuer les particules à tous les organes et tissus dans le corps. Après que les NPs de TiO₂ atteignent la circulation systémique, ces particules interagissent potentiellement avec le plasma, les protéines, facteurs de coagulation, plaquettes et globules rouges ou blancs. La liaison aux composants du plasma peut avoir un effet substantiel sur la distribution, métabolisme et excrétion des NPs, et pourrait neutraliser ou masquer les effets indésirables des NPs de TiO₂ dans la circulation systémique. La plupart des NPs s'accumulent dans le foie. Des NPs de TiO₂ ont été trouvés dans le cerveau après administration intra nasale (Shi et al., 2013).

6.3. Métabolisme :

Jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé de littérature spécifique concernant le métabolisme des NPs TiO₂ (Shi et al., 2013).

6.4. Élimination :

Les NPs de TiO₂ dans le système de circulation a deux voies potentielles de clairance, c'est-à-dire les reins / l'urine et la bile / les fèces.

Liquidation des particules du foie via la bile dans les fèces est bien connue en pharmacie et est également postulé pour les NPs de TiO₂ (Shi et al., 2013).

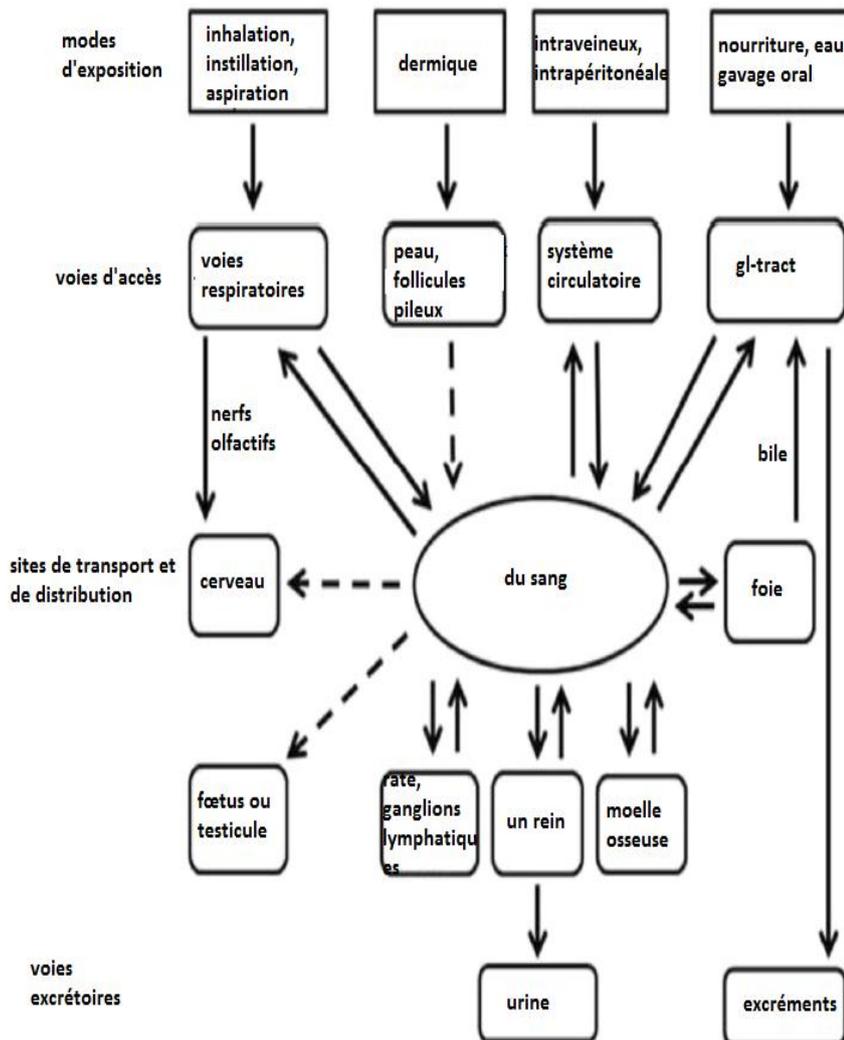


Figure 8 : Toxicocinétique et sites d'accumulation des NPs de TiO₂. Les flèches en pointillé représentent les points d'incertitude. (Shi H et al., 2013)

7. Cytotoxicité des nanoparticules de TiO₂ :

7.1. Etude de survie /prolifération cellulaires :

Les effets cytotoxiques aigus se traduisent par une altération de la survie des cellules quiescentes. Les effets toxiques sont fréquemment perceptibles sous forme d'une inhibition de la prolifération cellulaire. Diverses études ont été menées sur différentes lignées cellulaires comme les cellules respiratoires; nerveuses, de peau, ou encore sanguines et intestinales.

En fonction des études, il apparaît ou non une inhibition de laprolifération cellulaire en fonction des propriétés des nanoparticules de TiO₂. Les études de viabilité cellulaire sont généralement complétées par d'autres tests de cytotoxicité (Manon, 2014).

7.2. Stress oxydant :

Le stress oxydatif est considéré comme le mécanisme sous-jacent des réponses prolifératives au TiO₂. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont libérées par les cellules inflammatoires et/ou par les surfaces réactives des particules et peuvent ensuite endommager le tissu épithélial pulmonaire et induire également des dommages génétiques [3].

Le stress oxydant est un type d'agression des constituants de la cellule, dû aux espèces réactives oxygénées (ou encore ROS pour ReactiveOxygenSpecies). Les ROS sont des espèces chimiques extrêmement réactives regroupant les radicaux libres possédant un électron célibataire non apparié (les radicaux hydroxyl HO• ou alkoxy RO• par exemple) et également des dérivés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène par exemple. En effet, l'introduction d'espèces hautement réactives dans la cellule ou dans un organe, comme les nanoparticules, peut générer un stress oxydant. Si ces espèces sont nombreuses, les cellules n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme en provoquant une réaction inflammatoire exacerbée. L'étude de Jiang et al. 2008 a évalué la relation entre certaines propriétés physico-chimiques des nanoparticules de TiO₂ (taille, surface d'activité, forme cristalline) et le potentiel de génération d'un stress oxydant. La forte activité de génération d'espèces réactives, observée pour les particules de 30 nm semblerait être corrélée aux propriétés photocatalytiques du TiO₂. Sous irradiation UV, les nanoparticules de TiO₂ produisent différentes quantités de radicaux hydroxyles en fonction de leur structure cristalline et leur taille. Il semble en effet que plus la particule est petite, et plus elle va créer des dommages oxydatifs (Manon, 2014).

7.3. Internalisation cellulaire :

Afin de comprendre leurs mécanismes d'action, la localisation de nanoparticules en interaction avec des cellules a été étudiée. La membrane cellulaire forme une barrière exerçant un contrôle du transfert transmembranaire des composés hydrophiles, naturellement imperméabilisants dans les bicouches lipidiques. Les molécules de petite taille peuvent emprunter des transporteurs enzymatiques ou des pores passifs pour

pénétrer dans les cellules. Les macromolécules ou particules polaires peuvent être internalisées par endocytose.

Dans une étude, le TiO_2 a été trouvé à l'intérieur des cellules, sous plusieurs formes : en tant que gros agrégats liés à la membrane, ou sous forme d'agrégats plus petits et libres ou encore sous forme de particules individuelles dans le cytoplasme. En particulier, il a été localisé par fluorescence (Manon, 2014).

8. Les effets de TiO_2 :

8.1. Sur l'homme :

Les tests *in vitro* et *in vivo* précédents confirment les effets toxiques des NPs TiO_2 sur le corps humain tels que l'altération du cycle cellulaire, la constriction des membranes nucléaires et l'apoptose.

Des études ont également montré que les NPs de TiO_2 peuvent endommager l'ADN et interagir avec l'épithélium de l'intestin grêle responsable de l'absorption des nutriments. Après exposition aux NPs de TiO_2 de diverses manières, principalement par inhalation, injection, contact avec la peau et absorption dans le tractus alimentaire, les NPs de TiO_2 peuvent être trouvés dans différents organes internes. Des tests *in vivo* ont révélé qu'après une inhalation ou une exposition par voie orale, les NPs de TiO_2 s'accumulent, entre autres, dans les poumons, les voies digestives, le foie, le cœur, la rate, les reins et le muscle cardiaque (Baranowska-Wójcik et al., 2019).

8.2. Sur les animaux (le rongeur *in vivo*) :

Il a été largement démontré que les nanoparticules de TiO_2 peuvent induire l'inflammation des voies respiratoires dans des expositions aiguës, sub-chroniques et chroniques chez le rat et la souris (Shi et al., 2013).

Dans les expositions chroniques qui sont les plus pertinentes (ex: 90 jours d'inhalation NPs TiO_2 5-6 nm), des effets systémiques ont été reportés, avec modification de paramètres sanguins et élévation de marqueurs de l'inflammation, lésions de la rate (Sang et al., 2012).

8.3. Effet toxique de TiO_2 sur les microorganismes :

La toxicité des NPs TiO_2 varie en fonction de la taille des particules. La plupart des études ont montré que la toxicité augmentait à mesure que la taille des particules diminuait.

Les NPsTiO₂ sont insolubles, de sorte que l'ion Ti⁴⁺ ne semble pas avoir de contribution à leur toxicité. Il est peu probable que les NPs pénètrent dans le cytoplasme à travers les pores qui ne s'ouvrent que lorsque les protéines sont transportées. Plusieurs études ont montré que les ROS sont liés à l'inactivation bactérienne. Ils peuvent détruire les constituants de la membrane cellulaire endommager directement l'intégrité de la membrane et même traverser la membrane bactérienne et jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la croissance bactérienne (**Jing et al., 2018**).

En conséquence des processus d'oxydation, il a été démontré que les nanoparticules de TiO₂ présentent une activité antimicrobienne contre les virus, les bactéries et les excréments (**Mattia et al., 2014**).

Chapitre II

Matériel et méthodes



C'est à partir des éléments bibliographiques présentés dans le chapitre précédent que c'est construite notre problématique, celle-ci consiste à développer et à analyser de nombreux aspects liés à la toxicité d'un oxyde métallique, « le dioxyde de titane » sur des protistes ciliés (*Paramecium sp.*).

1. **Matériel :**

1.1. **Matériel biologique :**

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

1.2. **Matériel chimique :**

1.2.1. **Propriétés physiques :**

Le dioxyde de titane (TiO_2) est une substance inorganique solide blanche thermiquement stable, ininflammable et peu soluble dans les solutions usuelles. Les principales propriétés physiques du Dioxyde de titane sont les suivantes :

- masse molaire : $79,8658 \text{ g.mol}^{-1}$;
- température de fusion : $1\ 855 \text{ °C}$;
- température d'ébullition : $2\ 500\text{-}3\ 000 \text{ °C}$;
- dureté (Mohs) : anatase 5,5-6 ; rutile 6-7 ;
- permittivité diélectrique relative moyenne : anatase 45 ; rutile 127 ;
- indice de réfraction dans l'air : anatase 2,55 ; rutile 2,75.

Le Dioxyde de titane a des surfaces hydrophiles. L'absorption d'humidité augmente avec la surface spécifique, mais est aussi fonction du type de traitement de surface des poudres à l'issue du procédé de synthèse (**Blanchart, 2019**).

Structure du TiO₂ :

Nom : Dioxyde de titane (Olivier, 2014).

Formule chimique : TiO₂ (Olivier, 2014).

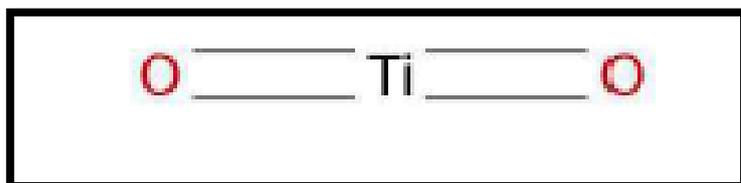


Figure 9: Formule développée du Dioxyde de titane. [4]

1.2.2. Propriétés chimiques :

Le Dioxyde de titane est non toxique et chimiquement stable, il ne réagit pratiquement pas avec d'autres matériaux à des températures modérées. Il ne réagit pas avec l'oxygène, le sulfure d'hydrogène, le dioxyde de soufre, le dioxyde de carbone et l'ammoniaque. Il n'est pas soluble dans l'eau, les acides organiques et les acides inorganiques faibles (Blanchart, 2019).

Le TiO₂ est un oxyde métallique de transition se présentant sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau (Dorier, 2018).



Figure 10: Poudre de dioxyde de titane. (Brahmi et al., 2017)

2. Méthodes :

2.1. Préparation de la culture de paramécies :

2.1.1. Culture mixte :

Du foin coupé en petit morceaux est infusé dans un récipient contenant de l'eau distillée. On laisse l'infusion dans un lieu tiède, sombre et bien aéré.

Après quelques jours, on observe au microscope optique les paramécies et sans coloration, dont ces derniers se nourrissent au dépend du voile bactérien.

La culture des paramécies a été effectuée selon la méthode de **Beaumont et Cassier (1998)**.

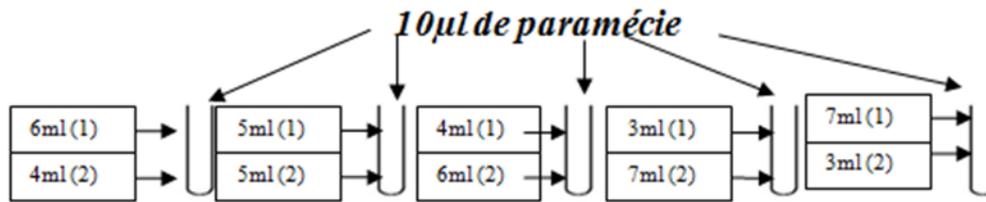
2.1.2. Préparation du milieu de culture :

Selon la méthode d'**Azzouz et al. (2011)** le milieu de culture est constitué de :

- 7,5g de foin coupé en morceaux.
- 7,5g de blé.
- 10g de laitue (propres séchées au four jusqu'à ce qu'elles soient brunes et fripées mais non noires et carbonisées. Nous les réduisant en poudre dans un mortier).
- 5g de peau de pomme de terre.
- 5g de peau de concombre.
- 2g d'amandes ou de cacahuètes.
- Une pincé de levure.
- On ajoute 1,5 litre d'eau distillée et on laisse bouillir à 100 C° pendant une heure.
- Le bouillon doit être filtré, son pH 6.5 et stérilisé par ébullition à 100 ° C pendant 30 min dans une thermorésistante.

2.1.3. Incidence du milieu de culture sur la croissance des paramécies :

Afin d'avoir une bonne croissance d'une culture de paramécie nous avons effectué différentes dilutions du milieu de culture. (**Azzouz et al., 2011**).



(1) : Eau distillée.

(2) : milieu de culture.

On suit la croissance dans les différentes dilutions pendant une semaine et on choisit pour notre étude la dilution qui donne la meilleure croissance.

On a trouvé que le tube qui donne la meilleure croissance est le tube 1 (contenant 6ml eau distillée et 4ml milieu de culture).

2.1.4. Protocol de 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 (Benosmane, 2015).

Selon la CL50 des tests de toxicité sublétales du dioxyde de titane chez les microorganismes suivants : *E. coli*. la CL50= 583 mg/l /30min (Dasari et al., 2013), pour les *Daphnia magna*. la CL50< 100mg/l (selon la fiche de donnée de sécurité conformément au règlement(CE) n°1907/2006), et chez les poissons la CL50= 165mg/l (Gatoo et al., 2014), nous avons déterminé une batterie de concentrations dans un intervalle de 50 > C > 150 mg/l.

À partir de la poudre du Dioxyde de titane, nous avons préparé une solution mère de 120 mg de TiO₂ dans un litre d'Acétone à 2%, puis nous avons choisi 04 concentrations de TiO₂ (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.

Les tests sont réalisés dans des tubes à essais de 10 ml de culture de paramécies selon le protocole suivant :



Témoin Témoin acétone $C_1= 90 \text{ mg/l}$ $C_2= 100\text{mg/l}$ $C_3= 110\text{mg/l}$ $C_4= 120 \text{ mg/l}$

Les tests sont répétés 3 fois et les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne \pm l'écart type.

2.2. Paramètre mesurés :

2.2.1. Cinétique de croissance cellulaire :

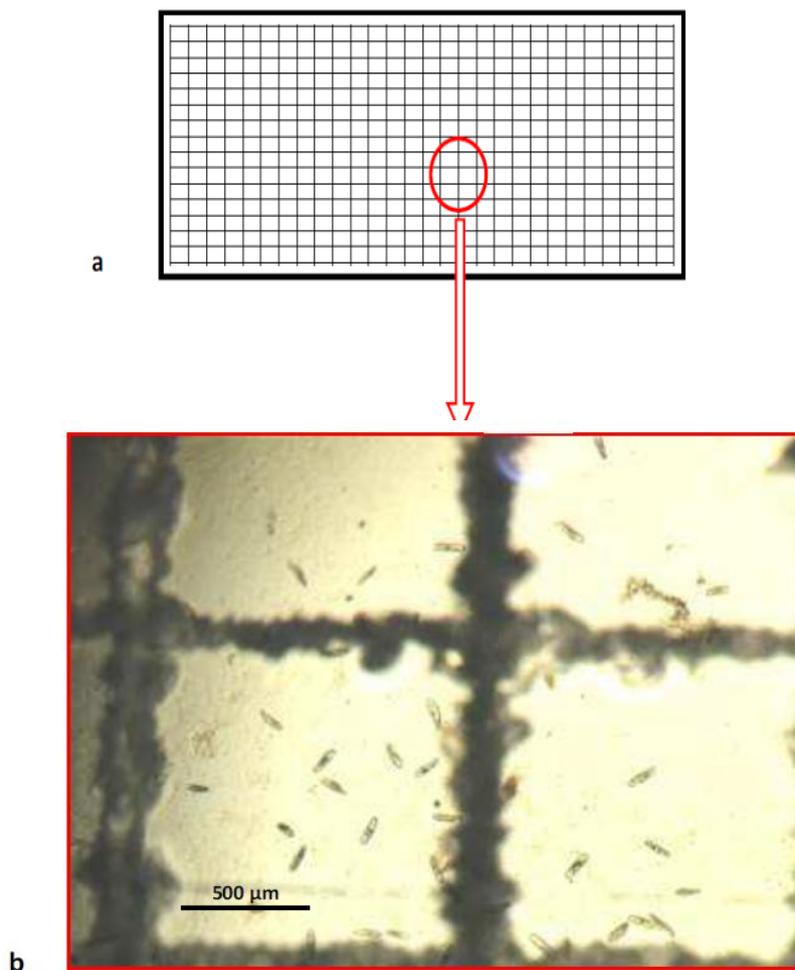
La cinétique de croissance des paramécies est réalisée par comptage des cellules sous microscope photonique, en utilisant une goutte de Lugol pour immobiliser les protistes ciliés et un compteur manuel pour effectuer le comptage des cellules (**Sauvant et al., 1999**).

La cinétique de croissance est suivie en fonction des temps courts et des temps longs aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

L'observation microscopique est effectuée sous microscope photonique(OPTICA Axiom 2000) au grossissement $\times 40$ pendant une semaine.

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

- On prélève des gouttes de 10 μl trois fois de chaque échantillon et on la dispose sur une lame.
- On réalise le comptage des cellules sous microscope optique.
- Le nombre des cellules vivantes correspond à la moyenne obtenue des trois répétitions.



(a) représentation schématique. (b) : photo sous microscope optique.

Figure 11: Lame de comptage pour les cellules de paramécies. (Azzouz, 2012)

2.2.2. Calcul du pourcentage de réponse :

Le comptage des cellules nous permet de calculer le pourcentage de réponse (Abid et al., 2016).

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis du Dioxyde de titane, qui est basé sur l'équation suivante :

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

Où : NC : Nombre des cellules témoins

NE : Nombre final des cellules traitées

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

2.2.3. Dosages des protéines totales :

La méthode de **Bradford (1976)** est un dosage colorimétrique qui permet d'estimer la quantité de protéines contenue dans un extrait (**Boumaza, 2015**).

❖ Principe de la méthode :

Cette méthode a pour principe la formation de complexe entre le Bleu Brillant de Coomassie et les résidus basique et aromatique des protéines (**Lebas, 2012**).

Elle est basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par la modification de la couleur du Bleu de Coomassie qui se fixe sur les liaisons peptidiques et se stabilise sous forme anionique (**Boumaza, 2015**).

❖ Technique du dosage des protéines :

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de (**Bradford, 1976**) qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible (JENWAY 6300) (**Bouaricha, 2013**). La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml) et le BBC (conservation environ 21 jours à 4°C) qui se prépare comme suit (**Bouzidi et al., 2017**) :

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

2.2.4. Dosages des biomarqueurs enzymatiques :

2.2.4.1. Dosage de l'activité Catalase (CAT) :

❖ **Principe de la méthode :**

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 (H₂O₂) à une longueur d'onde de 240 nm.

❖ **Protocol de traitement :**

Pour une homogénéisation, ajouter 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7) à notre échantillon de paramécies. L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 10 minutes et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Pour un volume final de 1 ml, le mélange réactionnel contient: 20 µl de surnageant (l'homogénat), 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:

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

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.

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

❖ Principe de la méthode :

La mesure de l'activité GST, selon la méthode de **Habig et al. (1974)**, consiste à fournir à l'enzyme un substrat (engénéral du chloro-dinitro-benzène (CDNB)), qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion.

La réaction catalysée par la conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule, qui absorbe la lumière à unelongueur d'onde de 340 nm.

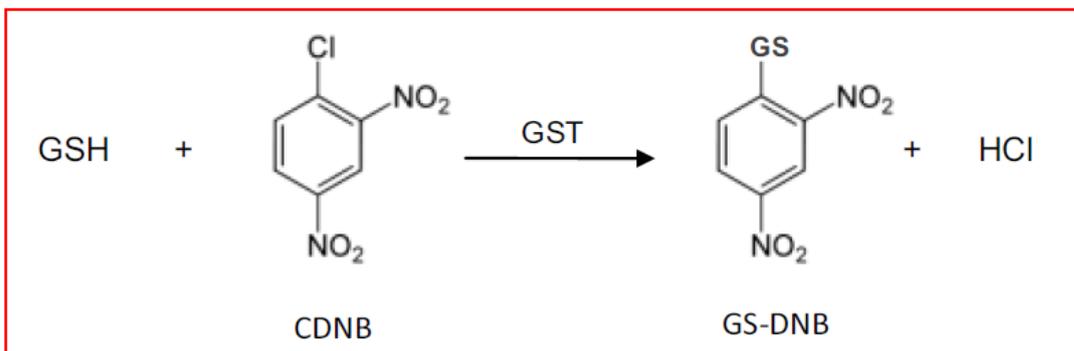


Figure 12: Conjugaison du glutathion (GSH) avec le 1-chloro,2,4-dinitrobenzène (CDNB).
(Azzouz, 2012)

Il est possible de quantifier cette absorption au moyend'un spectrophotomètre toutes les minutes, pendant 5 minutes. La valeur de la Domesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formée, elle-mêmeliée à l'intensité de l'activité GST (**Habig et al., 1974**).

❖ Protocole expérimental :

- Mettre 1ml de milieux de culture (témoins et traités) en présence de 1 ml de tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 6).
- Broyer les échantillons aux ultrasons (Sonifer B-30) pendant 35 secondes dansun bac contenant des glaçons.
- Centrifuger l'homogénat à 14000tours/min pendant 30 minutes.
- Prélever 0.2ml du surnageant qui servira de source d'enzymeauquel on ajoute 1,2ml du mélange : CDNB(1mM), GSH (5mM), Tampon phosphate de sodium (0,1M, pH = 7).
- Mesurer les DO à 340 nm toutes les 15 secondes pendant une minute (Spectrophotomètre JENWAY 6105, U.V. et Visible).

L'activité est déterminée d'après la formule suivante :

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

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 (mM-1 cm-1).

V_s : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

2.2.5. Dosages des biomarqueurs non enzymatiques :

2.2.5.1. Dosage du Glutathion(GSH) :

❖ Principe de la méthode :

Pour le dosage du glutathion, la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) est la méthode la plus employée (Ellman, 1959).

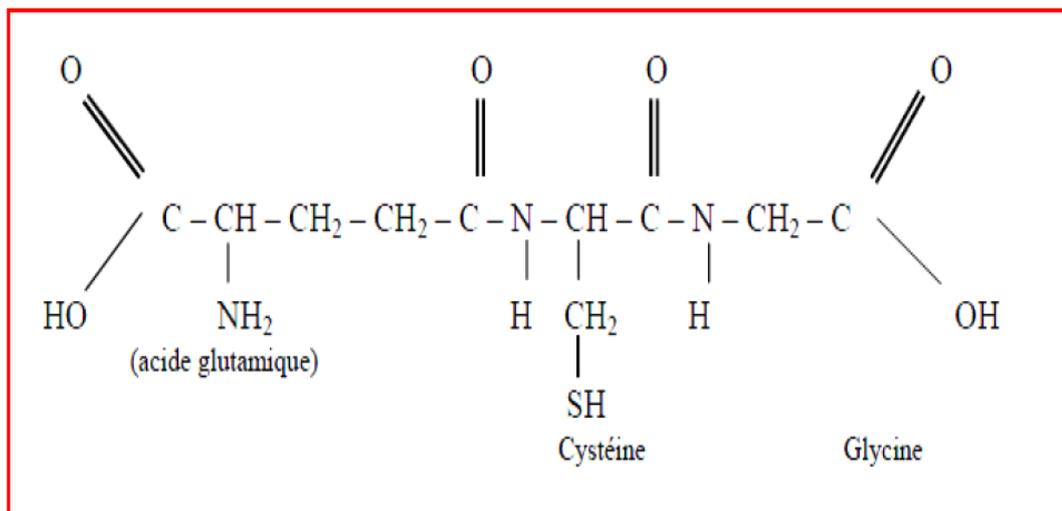


Figure 13: Formule chimique du Glutathion. (Azzouz, 2012)

Le taux du Glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckberker et Cory (1988)**, dont le principe de ce dosage repose sur la mesure de la densité optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique (Abid A et al., 2016).

La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH (**Fig.14**), ce qui libère l'acide thio-nitro-benzoïque (TNB) lequel à pH alcalin (8-9) présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante : (**Azzouz,2012**).

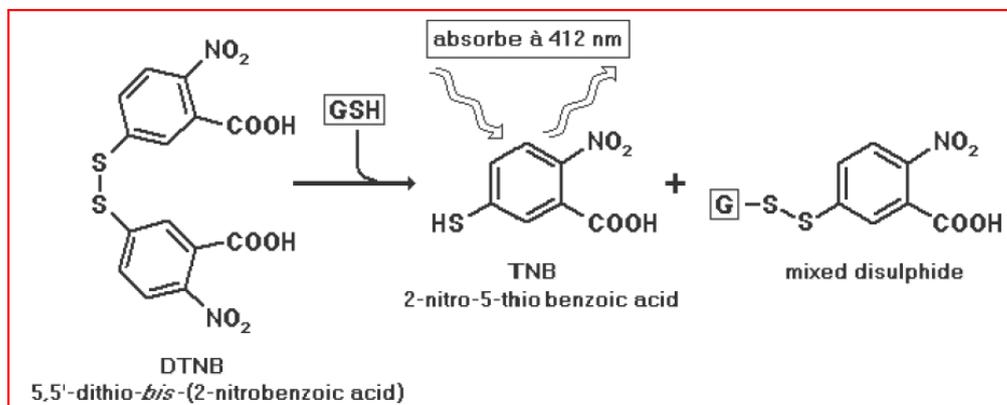


Figure 14: Réaction d'Ellman entre le Glutathion et le DTNB. (**Azzouz, 2012**)

❖ Protocole expérimental :

- Mettre 3ml de milieu de culture individuellement (témoins et traités) en présence de 1ml d'EDTA à 0,02M.
- Broyer les échantillons aux ultrasons (Sonifer B-30) pendant 35 secondes dans un bac contenant des glaçons.
- Prélever 0,8ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Passer au vortex et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000 tours/min pendant 5 minutes.
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6105, UV et Visible).

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

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

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).

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

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

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

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Chapitre III

Discussion et conclusion



Discussion:

La production et l'utilisation croissante des nanoparticules conduit inévitablement à leurs rejets dans l'environnement et plus particulièrement dans le compartiment aquatique (**Gottschalk et al., 2013**).

Les nanoparticules ont des caractéristiques chimiques et physiques très spécifiques de taille et de forme qui facilite ses applications médicales et biologiques. Après injection par circulation elles atteignent tous les organes et tissus (**Berry et al., 2004**). Cematériau est distribué dans tout le corps rapidement.

Avant son application comme équipement demédicaments, les effets des nanoparticules sur l'environnement, la biocompatibilité et ses effets toxiques sur les humains et les animaux devraient être évalués. Ces particules à cause de leur taille réduite ont une superficie élevée et elles sont hautement réactives, c'est une raison importante pour leurs effets toxiques (**Carlson et al., 2008**).

Les nanoparticules TiO_2 ont des applications très importantes dans diverses industries, y compris les pigments industriels et les blocs solaires (**Fartkhoni et al., 2013**).

Ces contaminations peuvent donner naissance à de nouvelles forces sélectives qui peuvent avoir une incidence globale sur la diversité biologique. En effet, plusieurs travaux ont été effectués, **en 1978, Cairns** suggère l'utilisation des protozoaires comme bio-indicateur de la pollution de l'eau. Le fait que ces micro-organismes soient des eucaryotes dotés de toutes les structures d'une cellule de métazoaire permet l'extrapolation des moindres variations (**Bougoussa et al., 2018**).

Les espèces bio-indicatrices de pollution environnementale, font l'objet de nombreux travaux (**Regoli et al., 2005**).

Notre choix s'est porté sur des protistes ciliés d'eau douce: *Paramecium sp*, qui sont des cellules eucaryotes, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et terrestre, caractérisées par un court cycle de vie, une multiplication rapide et un comportement normal susceptible d'être affecté par la présence de polluants (**Beal et Aderson, 1993**).

1. Evaluation de la toxicité du Dioxyde de titane sur la croissance des paramécies :

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule.

Bouzidi et Bouheraoua (2017) ont rapporté que dès la mise en contact du TiO₂ avec les paramécies, la vitesse et la croissance diminuent ceci constitue le premier indice d'une toxicité de ces nanoparticules. L'observation microscopique des paramécies lors de l'étude du paramètre de la croissance cellulaire met en évidence une diminution de la mobilité.

Les résultats **Fukushima et al. (1976)** qui ont montré que la paramécie est un microorganisme très proche des organismes supérieurs, sa croissance est sensible aux divers xénobiotiques dont les métaux lourds ce qui en fait un excellent bioindicateur de la pollution, sont en accord avec ceux de **Jomini (2018)** qui ont mis en évidence des quantités de bactéries présentes dans une colonne d'eau et qui tendent à augmenter (183% pour la plus forte concentration) alors que les bactéries sessiles diminuent fortement (88%) pour la concentration la plus importante en nanoparticules TiO₂ (100 mg/L).

Les études in vitro ont démontré que les NPs de TiO₂ pouvaient induire une mort cellulaire: c'est le cas d'une étude de **Hamilton et al. (2009)**, dans laquelle les auteurs ont exposé des macrophages alvéolaires de souris en culture primaire à plusieurs types de particules de TiO₂ : des nanosphères de TiO₂ (60 -200 nm), des nanotubes courts de TiO₂ (60-300 nm* 0.8-4 µm) et des nanotubes longs de TiO₂ (60-300 nm*15-30 µm). La dose utilisée était de 50 µg/ml et les temps d'exposition variaient entre 1 et 24 heures (**Armand, 2013**), le taux de mortalité était dépendant de la dose et de la taille des particules.

2. Evaluation de la toxicité du TiO₂ sur la synthèse des macromolécules (protéines) des Paramécies:

Les microorganismes en présence de xénobiotiques, toxines ou composés peroxydés par exemple, ont la capacité de développer un processus de détoxification et ce processus est d'ordre biochimique (**Benosmane, 2011**).

Dans une étude de la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'oxyde d'indium et de titane, l'administration orale (50mg/Kg) du TiO₂ NPs à des rats albinos montre que le mécanisme de toxicité induit par ces nanoparticules inclut une altération des substances biochimiques, des antioxydants et pourrait résulter un stress oxydatif causé par NPs (**Bheeman et al., 2014**).

De nombreuses études confirment le rôle des protéines totales chez les microorganismes, en effet (**Peccini et al., 1994**) ; (**Massaya et al., 2002**) et (**Redouane-Salah, 2004**) mettent en évidence une augmentation significatives du taux de protéines sous l'effet d'un stress chimique chez les micro-organismes. Les résultats de **Benamara 2013** vont dans le sens de ces travaux, puisque le dosage des protéines totales chez les paramécies a confirmé une augmentation croissante dose-dépendante (2.7, 3.7, 4.6 et 9 µM/l) de ces dernières après 24, 48, 72, 96, 120 et 144h d'exposition au xénobiotique par rapport aux cellules témoins.

3. Effet des NPs TiO₂ sur les bio-indicateurs de stress oxydatif :

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont soumis à un stress intense, entraînant la mort des organismes sans que ces derniers ne puissent réagir particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxifications sont déplétées, ce stress peut être moins intense, permettant alors à l'organisme de déployer une batterie de réponses, à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (**Abid et al., 2016**).

L'organisme dispose de systèmes de défense contre les ROS, et ce à différents niveaux. Tout d'abord, il existe des systèmes visant à limiter la formation de ROS, ainsi qu'il existe des systèmes permettant de transformer les ROS en métabolites non toxiques. Il existe deux types de ces systèmes dits antioxydants: des enzymes anti oxydantes et des composés antioxydants non enzymatiques.

Les enzymes anti oxydantes sont : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GPx).

La SOD catalyse la dismutation de l'anion O_2 en H_2O_2 , moins réactif, la CAT catalyse la conversion du H_2O_2 en eau, et la GPx réduit le H_2O_2 ou les peroxydes ROO en H_2O ou en ROH, tout en oxydant le glutathion (GSH sous sa forme oxydée, GSSH sous sa forme réduite). Il existe également d'autres enzymes dont on ne considère pas directement antioxydants (**Armand, 2013**).

La production de ROS par des cellules exposées aux NPs a été observée pour un certain nombre de NPs. C'est le cas du TiO_2 , à la fois in vivo et dans différents types cellulaires : fibroblastes, cellules épithéliales, microglie (**Armand, 2013**).

En revanche, d'autres études montrent que les NPs de TiO_2 n'induisent pas de stress oxydant (**Armand, 2013**).

En premier lieu nous nous sommes intéressés aux variations de l'activité CAT, qui est une enzyme héminique et qui constitue avec la SOD la première ligne de défense contre les attaques radicalaire (**Winston et Di Giulio, 1991**).

Cette enzyme localisée principalement au niveau des peroxysomes catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau, elle peut, par conséquent réduire l'effet toxique des ROS (**Greulich et al., 2002**).

En effet, l'activité catalase consiste en une transformation du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (O_2). Or la production de H_2O_2 est induite par la présence de composés exogènes à l'organisme comme notamment nos xénobiotique de synthèses (**Abid et al., 2016**), ce dérivé réactif de l'oxygène peut entraîner l'oxydation des macromolécules (ADN, Lipides et protéines) (**Vlahogianni et al., 2007**).

L'autre enzyme intervenant dans le processus de détoxification des ROS est la GST qui lors de la phase II de la biotransformation/métabolisation des xénobiotiques fait appel au GSH comme agent de conjugaison mais qui est aussi impliquée dans le mécanisme de détoxification comme agent non enzymatique Les glutathion S-transférases (GSTs) sont des enzymes du métabolisme capables de conjuguer une molécule de glutathion réduit (GSH) au centre électrophile d'un xénobiotique afin de rendre celui-ci plus soluble et donc plus facilement excrétable par l'organisme. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xénobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (**Hayes et McLellan, 1999 ; Benlaifa, 2017**).

Bouzidi et Bouheraoua (2017) ont mis en évidence une réduction du taux de GSH chez des paramécies traités par 0,25 ppm de TiO₂, parallèlement une induction de l'activité GST. De plus, ils ont constaté une diminution de l'activité CAT.

D'après **Bheeman et al., (2014)**, l'administration orale de TiO₂ (50mg/Kg) chez les rats albinos provoque des altérations importantes antioxydants glutathion (GSH), catalase (CAT), par rapport aux groupes témoins.

L'augmentation de l'activité GST et la diminution du taux de GSH, sont dus au fait que le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules animales, c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés Endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène et les métaux lourds. Leur expression peut être induite ou inhibée par certains xénobiotiques, ce qui leur confère un grand intérêt en tant que biomarqueurs potentiels de la pollution (**Abid et al., 2016**).

Quelques études ont évalué les effets des nanoparticules de TiO₂ sur le système antioxydant des organismes aquatiques. Les travaux réalisés sur le modèle *Daphnia magna* montrent que les systèmes antioxydants des daphnies sont induits suite à l'exposition aux NPs. En effet, une exposition de 48 heures des daphnies, *D. magna*, aux NPs TiO₂ (anatase/rutile) entraînent une augmentation de l'activité de la CAT, GPX et GST à partir de 1 mg/l. Après 21 jours, une mortalité significative est observée à 5 et 10 mg/l alors qu'aucun effet sur la reproduction n'a été observé.

Une exposition in vitro de 30 min des hémocytes, de la moule *Mytilus galloprovincialis*, aux NPs TiO₂ suffit pour induire une augmentation de l'activité des lysozymes et de la production d'ERO.

Une augmentation de la déstabilisation membranaire des lysosomes, de l'accumulation des lipofuchsines et des lipides neutres et l'augmentation de l'activité de la CAT et la GST sont observées dans la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis*, exposées 24h au NPs TiO₂ (**Bigorgne, 2018**).

Conclusion Générale:

Les protozoaires sont les premiers animaux dans la série évolutive. Ce sont des organismes unicellulaires, microscopiques et hétérotrophes. La paramécie étant constamment présente dans les milieux dulçaquicoles est un élément de base des réseaux trophiques mais aussi un modèle alternatif de choix pour les études toxicologiques et écotoxicologiques.

En effet, la paramécie est un organisme eucaryote possédant des cils dont la structure est comparable à celle de la trachée des mammifères, ceci justifie donc l'utilisation de cet organisme comme modèle alternatif.

Nous avons choisi d'évaluer la toxicité potentielle du TiO_2 sur les *Paramecium sp.* Afin de mieux comprendre le mode d'action du xénobiotique aussi bien à l'échelle d'un organisme unicellulaire que pluricellulaire.

D'après la synthèse bibliographique et des études effectuées sur l'impact toxicologique des nanoparticules TiO_2 sur certains micro-organismes comme les paramécies et autres, la sensibilité de paramécie se manifeste en premier lieu par une perturbation dans le développement des paramètres physiologiques (une inhibition de la croissance et une vitesse des paramécies traitées par dioxyde de titane par rapport aux organismes témoins).

D'un autre côté, une perturbation globale du métabolisme (une augmentation du taux des protéines totales) serait évidente. Cependant, l'augmentation croissante du taux de ces dernières dépendrait de la dose de la nanoparticule et s'expliquerait par le fait que la présence de xénobiotique à l'intérieur de la cellule stimule la synthèse protéique dont les enzymes et rend compte de la capacité de ces micro-organismes à la métabolisation / détoxification.

Concernant l'étude des biomarqueurs du stress oxydant : selon les travaux effectués précédemment, nous pouvons prévoir une perturbation importante (dépendante de la dose du TiO_2) du taux de GSH parallèlement l'activité des enzymes antioxydantes GST et de CAT chez les lots traités par le TiO_2 par rapport au témoin.

A travers tous ces données, nous pouvons conclure que le TiO_2 peut être toxique et présente des perturbations que ce soit sur le plan physiologique ou métabolique des organismes unicellulaires et que la paramécie est un excellent modèle pour les études toxicologiques.

Perspectives :

En perspectives, il serait intéressant d'effectuer d'autres recherches portant sur :

- L'étude de l'impact toxicologique du TiO₂ sur d'autres modèles cellulaires.
- La recherche de l'impact des nanoparticules de TiO₂ sur la reproduction des paramécies.
- Des tests de génotoxicité chez ces protistes.
- L'étude de la neurotoxicité de la molécule.

Références

Bibliographiques

Bibliographie

A

Abid. A et Amarouche .A.2016. Nanotoxicité de Fe₃O₄ (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium sp.* Mémoire de master, Université de Larbi Tébessi , Tébessa. pp : 32-36-63-64-65.

Akbatche.S et Tayeb.I. 2017. L'effet du taux de dioxyde de titane (TiO₂) sur une formulation de PVC. Mémoire de master, Université Mohamed Bougara, Boumerdes. pp : 18.

Alex. M et Jimenez .R. 2013. Nanoparticules à base d'oxyde de titane pour la photocatalyse. Thèse de doctorat, Université Paris-sud.pp : 11.

Aounallah .M. 2016. Étude des propriétés physiques de couches minces de TiO₂ élaborée par voie Sol Gel. Mémoire de master, Université Larbi Tébessi, Tébessa. pp : 07.

Armand.L.2013.

Effetdesnanoparticulesdedioxydedetitanesurlesmétalloprotéases,influencedesparamètres physicochimiques. Thèse de doctorat, Toxicologie Agro Paris Tech, Paris .pp : 12-13-15-16-28-29-37-38.

Azouani . R. 2009. Elaboration de nouveaux nanomatériaux photocatalytiques actifs sous rayonnement visible. Thèse de Doctorat, Université Paris.pp : 04.

Azouz.Z., Berrebeh.H and Djebbar. M. R. 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole . African journal of microbiology research: 5(20). pp: 3243-3250. doi: 10.5897/AJMR11.322.

Azzouz. Z. 2012. Etude des effets toxiques d'un fongicide (AmistarXtra) et d'un herbicide (Glyphosate) sur la biologie et le comportement de *Paramecium tetraurelia*. These de doctorat, UniversitéBadjiMokhtar, Annaba. pp: 41-48-49-51.

B

Baranowska-Wojcik. E., Szwajgier. D., Oleszczuk. P and Winiarska-Mieczan. A. 2019. Effecs of Titanium dioxide nanoparticles exposure on human health- a revewbiological trace element research. 193. Pp: 118- 129.

Références Bibliographiques

Beal .D.L., Anderson.R.V. 1993.Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, pp: 551-556. Doi: org/10.1007/s12011-019-01706-6.

Beaumont et Cassier., 1998. Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie. 3ème édition DUNOD. pp: 123- 143.

Benachour. M.C. 2011. Elaboration et caractérisation des couches minces de TiO₂ dopées à l'erbium à différentes températures et épaisseurs. Thèse de Magister, Université Mentouri, Constantine. pp: 05.

Benamara .M. 2013 .Impact d'un mimétique œstrogène: le Mancozèbe sur un protiste cilié d'eau douce «*Paramecium tetraurelia*». Mémoire de master, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp: 23.

Bengueddach. H. 2016. Etude des protéines VFL3 et OFD1 dans le mécanisme d'ancrage des corps basaux chez la paramécie. Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay, Paris-Sud. pp: 52.

Benlaifa. M .2017 . Evaluation de la toxicité à court terme générée par une pollution mixte « Pesticides/ Métaux lourds » sur un modèle unicellulaire alternatif : *Paramecium sp.* Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp : 59.

Benosmane. S.2011. Etude de l'effet d'un insecticide à base d'Emamectine Benzoate sur les protistes ciliés d'eau douce «*Paramecium sp.*». Mémoire de master, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp: 17.

Berry C. C., Wells. S., Charles. S., Aitchison. G and Curtis. A. S. G. 2004. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. *Biomaterials*, 25(23). pp: 5405-5413.

Bétermier .M. 2010. Que peut nous apprendre la paramécie sur la biologie des génomes ? Centre de génétique moléculaire, Université Paris-Sud, Paris.

Bétermier.M. 2014. Réarrangements programmés du génome. Département de Biologie des génomes. Université Paris-saclay, Paris.

Références Bibliographiques

Bheeman. D., Sugumaran. S., Mathan. R., Dakshanamoorthy. S and Bellan.C. S. 2014.

Oxidative stress induced biochemical alteration due to novel InTiO₂ nanoparticles exposure. Nanoscience and nanotechnology letters, 6(6).pp: 457-463.

Bigorgne .E.2018. Ecotoxicité des nanoparticules et des sous-produits d'altération de dioxyde de titane sur le ver de terre *Eisenia fetida*. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz. pp:20.

Blanchart.P.2019. Propriétés de l'oxyde de titane Dioxyde de titane-Propriétés et applications.

Bouaricha. H. 2013. Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar , Annaba. pp: 01-02-45.

Bougoussa . F ., Dahchar. I et Kebbaci .M ., 2018 : Contribution à l'étude de la toxicité d'un fourmicide chlorpyrifos-éthyl sur des protistes ciliés d'eau douce *paramecium sp* . Mémoire de master, Université 08 mai 1945, Guelma. Pp : 32

Boumaaza .S., et al. 2013. Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques (Ag₂O, ZnO-Al, TiO₂) vis-à-vis de quelque bactérie pathogène. Mémoire de master, Université 08 mai 1945, Guelma. pp : 12.

Boumaza.S. 2015. Evaluation rapide des protéines par turbidimétrie : Application à quelques effluents agro-alimentaires avant et après un traitement de clarification. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba. pp : 13.

Bouzidi. R et Bouheraoua. M. 2017. Impact toxicologique de dioxyde de titane sur un modèle unicellulaire d'eau douce *Paramecium sp* et l'effet adverse de la quercétine. Mémoire de master, Université de Larbi Tébessi , Tébessa. pp: 26-27-45-47.

Bradford. M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72. pp : 248-254.

Brahmi. R et Belaïde. N. 2017. Synthèse et caractérisation des couches minces de TiO₂ dopé Fe obtenues par voie sol-gel. Mémoire de master, Université Larbi Tébessi , Tébessa. pp: 06.

C

Carlson. C., Hussain. S. M., Schrand.M., Braydich-Stolle. L. K., Hess. K. L., Jones.R.L and Schlager. J. J.2008 .Unique cellular interaction of silver nanoparticles: sizedependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry*, 112.pp: 13608-13619.

Cudmore .L., David & Charles and Newton. A., 1977. *The Center of Life, A Natural History of the Cell.*

D

Damaj. R., 2012. Squelette membranaire chez *Paramecium Tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigenique des epiplasmines .HAL Id. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal. pp: 28-29.

Dasari.T. P., Pathakoti. K and Hwang.H.M.2013.Determinationof the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO,CuO,CO₃O₄and TiO₂)to *E.colibacteria*.*J Environ Sci* 25. pp:882-888.

Dorier.M.2018. Impact du colorant alimentaire E171 et de nanoparticules de dioxyde de titane sur des modèles cellulaires, in vitro, d'épithélium intestinal. Thèse de doctorat ,Université Grenoble Alpes. pp: 13.

E

Ellman .G.L. 1959.Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82. pp: 70-77.

F

Fartkhoooni .F.,Noori .A ; Momayez.M ;Sadeghi.L ;Shirani.K and Babadi .V.2013.The effects of nano titanium dioxide (TiO₂) in spermatogenesis in wistar rat.*European journal of experimentalbiology* .3(4). pp: 145-149.

Fiche de donnée de sécurité conformément au règlement(CE)n°1907/2006.

Frédéric. B. 2014. Sécurité sanitaire des aliments. Université de Lorraine. pp : 04.

Fukushima.S., Shiota. C., Ogawa .H and Sasagawa. S. 1979.Effects of heavy metals *Paramecium Tetraurelia*.Effects on cell division.*Jap.J.Hyg*: 34(5). pp: 510.

G

Gatoo. M. A., Naseem. S., Yasirarafat .M ., Dar. A. M., Qasim. K and Zubair. S.2014. Implication in associated toxic manifestations. *BioMedResearch International*. (498420).pp:1-8.

Goujil .T. 2013. Étude de l'oxyde de titane en couches minces en hétérojonction avec le silicium, application photovoltaïque. Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou. pp : 6-7-8.

Gottschalk. F., Sonderer.T., Scholz. R.W and Nowack. B. 2009 . Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environ. Sci. Technol.* 43. pp : 9216-9222.

Greulich. H., Chen .T.H., Feng. W., Ja'anne.P.A., Alvarez. J.V.and al.2005. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and resistant EGFR mutants. *PLoS Med* 2(11).pp: 313.

H

Habig. W.H., Pabst.M.J and Jakoby. W.B. 1974. Glutathion S-Transferases. The First enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of Biological Chemistry* 249. pp: 7130-7139.

Haddadi .F etRezgui.S . 2015. Effets des nanoparticules de dioxyde de titane sur l'activité enzymatique de l'asparaginase. Mémoire de master, Université Abderrahmane-Mira, Bejaia. pp: 21-22.

Hamilton. R.F ., Wu. N., Porter. D., Buford .M., Wolfarth .M and Holian. A. 2009. Particule length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *PartFibretoxicol* 2009,6. pp :513-521.

Hayes.JD and Mclellan.L .1999. Glutathion and glutathione-dependent enzymes represent a co-coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free radical research* 31(4).pp: 273-300.

J

J argot.F and Robert .S. 2013.Base de données fiches toxicologiques, sur le site web l'inrs: www.inrs.fr/fichetox. Inrs.

Jing. H., Luyao. W., Chunjie.W.,Songlin .Z., Haiqiang. L., Shiguo. L and Xiangke. W.2018.Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. Environ. Sci.JES-01565. pp: 14.doi.org/10.1016.

Jomini. S.,2018. Effets des nanoparticules de dioxyde de titane sur les bactéries: de la cellule à la communauté. Thèse de doctorat, Université de Lorraine. pp: 172.

K

Kertesz.C. 1991. Structure et propriétés amphotères de gels de dioxyde de titane. Thèse de Doctorat, Université Paris VI. pp: 33.

L

Laidi .Kh . 2019. Etude ab-initio des propriétés structurales, électroniques et optiques du dioxyde de titane TiO₂ dopé Fe. Mémoire de master, Université Abou-bakr Belkaid, Telemcen. pp: 13-14.

Lebas. G. 2012. Etude du métabolisme carboné et azoté de *Miscanthus x giganteus*. Thèse doctorat, Université Picardie Jules Verne .pp : 75

M

Manon. R. 2014. Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétiques Impact sur la santé humaine et l'environnement. Thèse de doctorat, Université du havre. pp : 78-80.

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

Mattia .C., Alessandro. A.C., Bahar .A., Valentina .C., Maurizio. F and Patrizia. P.2014. Influence of TiO₂ Nanoparticles on Growth and Phenolic Compounds Production in

Références Bibliographiques

Photosynthetic Microorganisms. The Scientific World Journal, 2014. pp: 09.doi.org/10.1155/2014/961437.

Muscat.j., Swamy.v and Harrison.N. 2002. First-Principles Calculations of the Phase Stability of TiO₂, Physical Review B, 65, pp: 1-2-15.

Q

Olivier.S.2014.Réalisation d'un dépôt photocatalytique de dioxyde de titane à basse température avec une torche plasma à la pression atmosphérique. Thèse de doctorat, Université de Lorraine. pp: 07.

P

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

R

Redouane-Salah. S., 2004. Effets des rejets métalliques des aciéries du complexe sidérurgique d'El-Hadjar de Annaba sur un modèle cellulaire marin: *Tetraselmis suecica*. Sciences et Technologies C-N°22. pp: 121-124.

Regoli. F and Principato.G. 1995. Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. Aquatic Toxicology. 31. pp: 143-164.

Romero.A.M.J, 2013. Nanoparticules à base d'oxyde de titane pour la photocatalyse. Thèse de doctorat, Université Paris-sud. pp : 17.

Rouabhi .R et Bazouzi. K. 2012. Combination between vitamin E and calcium into the neutralization of Novaluron in a cellular model of fresh water *Paramecium sp.* BioSciences. 318. pp: 317-327.

S

Sajid.M., Ilyas.M., Basheer. C., Tariq. M., Daud.M.,Baig. N andShehzad.F. 2015.Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. Environ. Sci. Pollut. Res.

Samworth.M and Morgan. M. 2000. Article on pond life: *Pramecium*. MISCape Article: *Paramecium*. Dec.95 Updated by the MISCape Editor April 2000.

Sang .X., Zheng. L.,Sun .Q ., Li .N., Cui .Y., Hu. R.,Gao .G., Cheng .Z., Cheng .J and Gui .S. 2012. The chronic spleen injury of mice following long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles.J Biomed Mater Res A 2012, 100.pp:894–902.

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

Sebastian. O. 2014. Realization d'un depot photocatalytique de dioxyde de titane à base et temperature avec une torche plasma à la pression atmosphérique.

Shi.H., Magaye.R., Castranova.V and Zhao.J.2013.Titanium dioxide nanoparticles: a review ofcurrent toxicological data.Particle and Fibre Toxicology.doi:10.1186/1743-8977-10-15.

T

Tuyet. L., Hirofumi. N., Mutsuhito. N., Takahashi. A., Toshihiro. O., Shimohata. KandYhosuke. K. 2011. Additional effects of silver nanoparticles on bactericidalefficiencydepend on calcination temperature and Dip-Coating speed. Appl Environ Microbiol ;77(16). pp : 5692-5634.

V

Vlahogianni. T., Dassenakis .M., Scoullou. M.J and Valavanidis. A .2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from theSaronikos Gulf of Greece.Marine Pollution Bulletin 54 (2007).pp:1361- 1371.
doi:10.1016/j.marpolbul.2007.05.018

W

Weeckberker.G and Cory .G. 1988.Ribonucleotidereductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemial L1210 cells in vitro.Cancerletters, 40. pp: 257- 264.

Wehner et Gehring., 1995. Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles: Orientation comparée et évolutive. DeboeckUniversité.ThiemeVerlag. pp: 286-287.

Winston. G ., Richard. T and Giulio.Z. D.1991.Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organism.Aquatic Toxicology. 19. pp: 137-161.

Wong. C ., Cheung.K and Ming-Ho. Y. 1999.Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliellatertiolecta*.Environmental pollution, 105.pp: 175-183.

Site web :

1-www.biology-resources.com › paramecium-01.

2-<https://www.studyandscore.com/studymaterial-detail/paramecium-general-characterslocomotion-and-nutrition>.

3-Société Chimique de France (SCF), 2017.

4-(<https://www.hcsp.fr/Explore.cgi.2018>).

5-www.interchimie.fr.Janvier 2017.