الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار- عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT LMD (3EME CYCLE)

Spécialité: BIOLOGIE ANIMALE
Option :TOXICOLOGIE

Intitulé

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

Presentée par: Mlle Boulassel Amina

Directeur de thèse : DJEBAR Mohammed Réda **Professeur, Université d'Annaba**

Membres du Jury:

Dr. BERREBBAH Houria	Prof.	Université de Annaba	Président
Dr. GRARA Noudjoud	M.C.A.	Université de Guelma	Examinateur
Dr. TADJINE Aicha	Prof.	Université de d'El-Tarf	Examinateur
Dr. KHEBBAB Mohammed El Hadi	Prof.	Université d'Annaba	Examinateur
Dr. Hamdi Pacha Youcef	Prof	I .N.V Alger	Examinateur

Année universitaire: 2013 /2014

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'université d'Annaba.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à monsieur Mohamed Réda DJEBAR , professeur à l'université de Annaba, qui m'a fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail, et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de ces années, me permettant ainsi de mener à bien cette étude.

Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements au professeur BERREBBAH-Djebar Houria, pour sa disponibilité et son souci constant afin que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possible. Avec enthousiasme, disponibilité, efficacité et sympathie, vous avez encadré ces années de recherche. Vous avez pris une part prépondérante dans ma formation de jeune chercheur et m'avez donné l'envie d'aller plus loin. L'excellence est assez rare pour que l'on puisse la souligner. Vous resterez à jamais un exemple pour moi. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance et l'expression de mon profond respect

Je tiens à remercier vivement monsieur HamdiPacha Youcef Professeur et directeur de l'INV d'Alger. Qui, malgré ses nombreuses obligations a bien voulu faire partie de ce jury. Qu'il reçoive toute ma gratitude et mon respect.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Monsieur KHEBAB Mohamed El Hadi, professeur à l'université d'Annaba, pour l'intérêt et l'attention qu'il a accordé à ce travail de thèse, et pour avoir accepté d'en être l'examinateur.

J'exprime également toute ma gratitude à Madame TADJINE Aicha professeur à l'université d'El-Tarf, et la remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Ma plus grande gratitude va à Melle GARARA Noudjoud Maitre de Conférance à l'université de Guelma, pour ces encouragements et ces nombreux conseils, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

A mes collègues et amis du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba, je les remercie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale et pour l'aide qu'ils m'ont apportés dans le cadre de cette thèse.

Dédicaes

A mes parents à qui je dois tout

A mes deux sœurs Imen et Sabrina

A tous ceux qui croient en moi

Résumé

Dans cette étude nous nous somme intéressés à l'évaluation de la toxicité de deux médicaments, un antipyrétique le Paracétamol et un anti-inflammatoire non stéroïdien l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire *Paramecium sp.*

Les résultats montrent une cytotoxicité des deux xénobiotiques , à travers l'inhibition de la croissance, un pourcentage de réponse positif, et un taux de mortalité élevé. Nous avons également mis en évidence des changements morphologiques qui se ce sont manifestés par des bourgeonnements, une invagination au niveau de la membrane plasmique des paramécies en plus de la diminution du nombre de vacuoles digestives.

L'étude biochimique et polarographique ont mis en évidence une perturbation des principales macromolécules à savoir : protéines, glucides, lipides et ce parallèlement à une inhibition du métabolisme respiratoire.

Sur un autre plan le suivi des biomarqueurs a révélé d'importantes fluctuations doses dépendantes pour les deux molécules, qui se sont manifestées par une induction des activités CAT, GST, APX, une diminution des taux de GSH.

Nous avons également mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif confirmé par une augmentation du taux de MDA.

L'isolement des mitochondries de paramécies nous a permis de mettre en évidence une perturbation de la phosphorylation oxydative (Vox3 et4, CR et ADP/O), un gonflement mitochondrial et une inhibition des activités Catalase, GPX mitochondriales.

Sur un autre plan, nous avons évalué les effets de certains facteurs environnementaux sur le potentiel toxique des deux substances pharmaceutiques via le calcul des CI50. Nos résultats ont montré que le pH, la Température et les UV, augmentent la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les paramécies.

Mots clés : Toxicité, Paracétamol, Ibuprofène, *parameciumsp,* Stress Oxydant, Mitochondries.

ABSTRACT

In this study we are interested in the total evaluation of the toxicity of two drugs, antipyretic Paracetamol and non-steroidal anti -inflammatory drug ibuprofen, on a cell model Paramecium sp.

The results show cytotoxicity of the xenobiotics, through the inhibition of growth, a percentage of positive response, and a high mortality rate. We have also demonstrated morphological changes are manifested by budding, at an invagination of the plasma membrane of paramecium and decreasing the number of vacuoles.

The polarographic and biochemical study showed a major disturbance in macromolecules including: proteins, carbohydrates, lipids and parallel to an inhibition of the respiratory metabolism.

On another level monitoring biomarkers showed significant dose-dependent fluctuations in the two molecules, which are expressed by induction of CAT activity, GST, APX, a decrease in GSH.

We have also demonstrated the induction of oxidative stress confirmed by an increase in the rate of MDA.

The isolation of mitochondria paramecium has allowed us to highlight a disturbance of oxidative phosphorylation (VOX3 and4, RC and ADP / O), mitochondrial swelling and inhibition of catalase activity, mitochondrial GPX.

On another level, we evaluated the effects of some environmental factors on the toxic potential of two pharmaceutical substances and the calculation of IC50. Our results showed that the pH, temperature and UV, increase the toxicity of Paracetamol and Ibuprofen on paramecium.

Keywords: Toxicity, Acetaminophen, Ibuprofen, parameciumsp, Oxidative Stress, Mitochondria.

ملخص

تحتوي الأدوية على مواد فعالة مصممة للتفاعل مع الكائن الحي، عند تواجدها في البيئة يمكن أن تأثر في الكائنات غير المستهدفة.

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة يتمثل في تقييم اثر العقارين. **خافض للحرارة و مسكن الألم،** الباراسيتامول و مضاد الالتهابات الايبوبروفان على كائن من فصيلة الهد بيات.

تظهر النتائج أن كلا الادويتين تأثير على النمو الخلوي للبراميسيوم، و كذا بحساب النسبة المؤوية للاستجابة ، ومعدل الوفيات، و كذلك التغيرات المورفولوجية من خلال ملاحظة تغيرات شكله وانخفاض **عدد الفجوات**.

أظهرت النتائج أيضا تعطل الايضات الرئيسية مثل الغلو سيدات ، البروتينات و الدهنيات . **كما** أن رصد الايض التنفسي اظهر تثبيط في استهلاك الأكسجين على مستوى أخر. **أكدت دراسة المؤشرات** الحيوية وجود تغيرات هامة في النشاط الإنزيمي متمثلة في زيادة كميات ال MDA الناتجة عن زيادة عملية تأكسد الدهون وكذلك **نقصان في معدل** GSH وزيادة مستويات APX, CAT,GST على صعيد آخر و تم عزل عضيات الميتوكندريا مما يدل على التأثير الضار للباراسيتامول و الايبوبروفين على هذا **المستوى** .فان تقييم أثار العوامل البيئية على نسبة التسمم بالمواد الصيدلانية عن طريق حساب Cl_{50}، **و النتائج** تظهر زيادة قدرة تسمم الباراسيتامول والابيبروفين تحت تأثير ال PH **والحرارة والأشعة فوق** البنفسجية.

الكلمات الرئيسية: التسمم ، الباراسيتامول ، الابيبروفين ، للبراميسيوم ، الميتوكندريا.

SOMMAIRE

Liste des tableaux ……..….**VIII**

Liste des Figures ……**IX**

Liste des abréviations…….. **XII**

Introduction Générale…….….**1**

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement…….….**4**

1. Définition de substance pharmaceutique……....……..**4**

2. Médicaments dans l'environnement…….……..... ..**5**

3. Différentes sources de substances pharmaceutiques dans l'environnement.**7**

4. Devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques …...**9**

4.1 Les phénomènes de dégradation en milieux naturels……...……..**10**

4.1.1 La photodégradation….....**10**

4.1.2 La biodégradation……...…….....**10**

4.1.3 Distribution des substances pharmaceutiques dans la phase aqueuse.....**11**

4.1.4 Phénomènes de sorption….....**11**

5. Transferts aux organismes aquatiques…….…..…….……..**11**

5.1 La toxicité aigüe des substances pharmaceutiques…….....…….…….....**13**

5.2 La toxicité chronique…….…….…....**14**

5.3 Effets cocktail des substances pharmaceutiques…….…….……...**17**

5.4 Toxicité des métabolites……..……...……**17**

II. Stress oxydant : quand l'oxydation phosphorylante mitochondriale devient une source radicalaire…….……..……..….....**18**

1. Les différentes espèces radicalaires de l'oxygène……..……...**19**

2. Systèmes de défenses antioxydants……..…….....**20**

3. La mitochondrie……..……..……..…**22**

3.1 Fonctions ….……...…….……**22**

3.2 La mitochondrie et la production de ROS……...…….……...**23**

III. Généralités sur la Paramécie.....**24**

VI. Généralités sur les xénobiotiques utilisées…….**25**

1. **Le Paracétamol**……..……**26**
2. **L'Ibuprofène**……...……**26**

Chapitre II : Physiologie et Morphologie

Introduction……..…..**28**

1. Matériel et méthode……..……....**28**

1.1 Matériel biologique…….……..…….……**28**

1.2 Matériel chimique ……...……..**29**

1.2.1 Paracétamol……..……**29**

1.2.2 L'ibuprofène….…….…….…..……**31**

2. Méthode……...……...…...**32**

2.1 Culture de *Paramecium tetraurelia*……...……..…...……..…....**32**

2.2 Conduite a l'essai ……**32**

2.3 Cinétique de croissance cellulaire……**32**

2.4 Calcule du pourcentage de réponse……..**33**

2.5 Taux de mortalité…….**33**

2.6 Taux de malformation……..**34**

2.7 Nombre de vacuoles digestives…….……...**34**

3. Résultats……...…….……**35**

3.1 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur la croissance…….…….....……**35**

3.2 Effet du paracétamol et de l'Ibuprofène sur le pourcentage de réponse (PR). **37**

3.3 Evaluation du taux de mortalité …….…..……...**39**

3.4 Modifications morphologique ……..…….……**41**

3.4.1 Taux de malformations …….……..…….....**41**

3.4.2 Evaluation du nombre de vacuoles digestives après exposition
au Paracétamol et à l'Ibuprofène …….……..……...…..…… **44**

Discussion …….……...……...…..……**48**

Chapitre III : Biochimie et Polarographie

Introduction ……..…..**51**

1. Méthodes ……...……...……..……..**51**

1.1 Dosage des métabolites……...……...…….……....**51**

1.1.1 Dosage des protéines……..……...…….……**51**

1.1.2 Dosage des glucide……..…….…….……..…….**52**

1.1.3 Dosage des lipides……..…….…..…..…….....**52**

1.2 Etude Polarographique ……...……...…..…….....**52**

1.2.1 Principe du dosage …….…….....……**52**

2. Résultats……**53**

2.1 Effets du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution du taux des protéines **53**

2.2 Effets du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution du taux des lipides……..…….……...**54**

2.3 Effets du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution du taux de glucides.……..……....**56**

3. Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur le métabolisme respiratoire des paramécies…….…….....**57**

Discussion ……..……..**59**

Chapitre IV : Etude du stress oxydant

Introduction ……...**61**

1. Matériel et méthodes. ……..…….....**63**

1.1 Mesure de l'activité Catalase (CAT)…….**63**

1.2 Dosage du taux de glutathion (GSH) ……...……...…….**64**

1.3 Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)……..…...**65**

1.4 Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)… ……....**66**

1.5 Mesure du malondialdéhyde (MDA) ……..…...…….**66**

2. Résultats……...……..……...**67**

2.1 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur les variations du taux de CAT ……..**67**

2.2 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur le taux de GSH ……...……**68**

2.3 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur les variations du taux de GST…….……..……**70**

2.4 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution d'APX…….….**72**

2.5 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution du taux de MDA……...…..**74**

Discussion …….…..….**77**

Chapitre V : Etude subcellulaire

Introduction ……..…….…....**80**

1. Matériel et méthodes……...…….…….....**80**

1.1 Isolement des mitochondries ……..…...…..**80**

1.2 Mesure de la respiration mitochondriale …….……**83**

1.3 Traitements des mitochondries …….……..……..**84**

1.4 Mesure de gonflement des mitochondries……...…….…….....**84**

1.5 Mesure des activités enzymatiques mitochondriales……...…...…..**84**

1.5.1 Dosage de l'activité catalase ……..…….……..**84**

1.5.2 Activité Glutathion peroxydase (GPX)……...…….……...**85**

2. Résultats ……...……..……....**86**

2.1 mesure de la consommation d'oxygène chez les mitochondries isolées

témoins….……...….…...**86**

2.2 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur les activités oxydatives des

mitochondries de paramécies incubées en présence d'ATP ……..…….....…..**86**

2.3 Le gonflement mitochondriale …….…….……...**89**

2.4 Suivi des activités enzymatiques mitochondriales ……...…...**90**

2.4.1 Activité catalase ……..….……**90**

2.4.2 Activité GPX……...……...……**92**

Discussion ……..…….…..**95**

Chapitre VI : Impact des facteurs environnementaux

Introduction ……...**99**

1. Matériel et méthode ...…….....**99**

1.1 Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50)…….……**99**

1.2 Effet du pH de la température et de la lumière UV ……..….**100**

2. Résultats …….……...……..**101**

2.1 Effet du pH sur la toxicité du paracétamol et de l'Ibuprofène……..….**101**

2.2 Effet de la température sur la toxicité du Paracétamol et d l'Ibuprofène …..**102**

2.3 L'influence des UV sur la toxicité du paracétamol et de l'Ibuprofène …….**104**

Discussion ……..…….....……..**106**

Conclusion général… ……..……....**109**

Perspectives ……..**111**

Références Bibliographiques……...……**112**

Liste des Tableaux

		Pages
Tableau 01 :	Composés pharmaceutiques les plus fréquents dans l'environnement.	**6**
Tableau 02 :	Caractéristiques Physicochimique du paracétamol.	**30**
Tableau 03 :	caractéristiques physicochimique de l'ibuprofène.	**31**
Tableau 04 :	Evolution du taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps	**40**
Tableau 05 :	Evolution du Taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène en fonction du temps	**41**
Tableau 06 :	Variations des vitesses d'oxydation chez les mitochondries isolées des paramécies en présence de plusieurs substrats.	**86**
Tableau 07 :	Effet du Paracétamol sur les activités oxydatives des mitochondries isolées des paramécies	**87**
Tableau 08 :	Effet de l'Ibuprofène sur les activités oxydatives des mitochondries isolées des paramécies	**88**

Liste des Figures

		Page
Figure 1 :	Schéma montrant les sources possibles et les voies de la présence de résidus pharmaceutiques dans l'environnement aquatique.	**8**
Figure 2 :	Toxicité aiguë de 24 médicaments sur quelques taxons aquatiques. EC50 et LC50 pour différents organismes, différents paramètres et différents temps d'exposition.	**14**
Figure 3 :	Toxicité chronique de 10 médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques. LOEC3 = concentrations les plus faibles montrant un effet et NOEC4 = concentrations les plus fortes ne montrant pas d'effets pour différents organismes aquatiques, différents paramètres et temps d'exposition.	**16**
Figure 4 :	Schéma des différentes formes de ROS.	**19**
Figure 5 :	Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.	**24**
Figure 6 :	présentation de la paramécie	**25**
Figure 7 :	Structure d'une paramécie au microscope.	**29**
Figure 8 :	Structure moléculaire du paracétamol.	**30**
Figure 9 :	Structure moléculaire de l'ibuprofène	**31**
Figure 10 :	Cinétique de la croissance des paramécies traitées au paracétamol.	**36**
Figure 11 :	Cinétique de la croissance des paramécies traitées à l'ibuprofène.	**37**
Figure 12 :	Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de paracétamol.	**38**
Figure 13 :	Pourcentage de Réponse des Paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène.	**39**
Figure 14 :	Observation microscopique d'une paramécie témoin.	**42**
Figure 15 :	Malformation et formation de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique d'une paramécie traitées.	**42**
Figure 16 :	perforation et dissolution de la membrane plasmique aux plus fortes concentrations.	**43**
Figure 17 :	Taux de malformations induites chez les paramécies par les concentrations croissantes de Paracétamol.	**44**
Figure 18 :	Evolution du taux de malformations chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes d'Ibuprofène	**45**
Figure 19 :	Coloration des vacuoles digestives au rouge neutre.	**45**
Figure 20 :	Evolution du nombre de vacuoles digestives chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol.	**46**
Figure 21 :	Evolution du nombre de vacuoles digestives chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène	**47**
Figure 22 :	Effet du paracétamol sur le taux de protéines totales en fonction du temps.	**53**
Figure 23 :	Effet de l'Ibuprofène sur les taux de protéines en fonction du temps.	**54**
Figure 24 :	Effet du Paracétamol sur le taux de lipides en fonction du temps.	**55**
Figure 25 :	Effet de l'Ibuprofène sur le taux de lipides en fonction du temps.	**55**
Figure 26 :	Effet du Paracétamol sur le taux de glucides en fonction du temps.	**56**

Liste des Figures

Figure 27 : Effet de l'Ibuprofène sur les variations du taux de glucides en fonction du temps. **57**

Figure 28 : Effet du paracétamol sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction de concentrations croissantes de Paracetamol. **58**

Figure 29 : Effet de l'Ibuprofène sur le métabolisme respiratoire en fonction du temps. **58**

Figure 30 : Représentation théorique de la relation entre la sensibilité aux contaminants et la pertinence écologique pour différentes réponses de biomarqueurs. **62**

Figure 31 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité Catalase chez les paramécies en fonction du temps. **67**

Figure 32 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'activité Catalase en fonction du temps. **68**

Figure 33 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux de GSH chez les paramécies en fonction du temps. **69**

Figure 34 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'évolution du taux de GSH en fonction du temps. **70**

Figure 35 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité GST chez les paramécies en fonction du temps. **71**

Figure 36 : Effet de concentrations croissantes d'lbuprofène sur l'activité GST des paramécies en fonction du temps. **72**

Figure 37 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité APX des paramécies en fonction du temps. **73**

Figure 38 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'évolution de l'activité APX chez les paramécies. **74**

Figure 39 : Effet des concentrations croissantes de Paracétamol sur taux de MDA en fonction du temps. **75**

Figure 40 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur taux de MDA en fonction du temps **76**

Figure 41 : Schéma descriptif des principales étapes d'isolement des mitochondries des paramécies. **82**

Figure 42 : Chambre d'oxygraphie ajustable. **83**

Figure 43 : Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps. **89**

Figure 44 : Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène en fonction du temps. **90**

Figure 45 : Effets du Paracétamol sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des paramécies. **91**

Figure 46 : Effets de l'ibuprofène sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des paramécies. **92**

Liste des Figures

Figure 47 : Effets de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité GPX chez les mitochondries isolées des paramécies. **93**

Figure 48 : Effets de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'activité GPX chez les mitochondries isolées des paramécies. **94**

Figure 49 : Influence du pH sur la toxicité du Paracétamol. **101**

Figure 50 : Influence du pH sur la toxicité de l'Ibuprofène. **102**

Figure 51 : Influence de la température sur la toxicité du Paracétamol. **103**

Figure 52 : Influence de la température sur la toxicité de l'Ibuprofène. **103**

Figure 53 : Influence des UV sur la toxicité du Paracétamol. **104**

Figure 54: Influence des UV sur la toxicité de l'Ibuprofène. **105**

Liste des abréviations

APX Ascorbate -peroxydases

ATP Adénosine triphosphate

BSA Serum Albumin Bovin

CAT Catalase

CDNB 1-Choro,24-Dinitrobenzéne

CL50 Concentration inhibitrice de 50% de la population

CR control respiratoire

DO Densité optique

DTNB Acides 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoique

EDTA Ethyléne diamine tetra-acétique

GPX Glutathion peroxydase

GSH Glutathion

GSSG Glutathion disulfure

GST Glutathion-S- transferase

H_2O_2 Peroxyde d'hydrogene

Kow Coefficient de partage octanol/eau, mesure l'hydrophobie d'une molécule.

MDA Malondialdehyde

pKa Constante de dissociation d'une molécule.

ROS Reactive oxygene species

SOD Superoxyde dismutase

TBA Acide Thiobarbiturique

TCA Acide Trichloroacétique

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

Parmi les nombreuses substances chimiques pouvant contaminer les milieux aquatiques et terrestres : les médicaments. Ces derniers font depuis tout récemment l'objet d'une préoccupation majeure (Halling-Sorensen *et al.*,1998; Daughton et Ternes,1999; Heberer, 2002).

Parce que les médicaments sont fabriqués et administrés dans le but de provoquer un effet biologique (Zuccato *et al*., 2000), leur présence dans les eaux n'est pas seulement d'un intérêt scientifique mais aussi d'un intérêt public (Scheytt *et al.,* 2005). Depuis les années 80 et grâce, notamment, aux progrès de l'analyse physico-chimique, de nombreuses molécules pharmaceutiques sont détectées dans l'environnement et leur présence dans les effluents et les boues de stations d'épuration urbaines, le milieu aquatique et les sols, est établie à l'échelle mondiale. (Joss *et al.,* 2005 ; Bernhard *et al*.,2006 ; De Wever *et al.,* 2007)

La première mise en évidence de la présence de médicaments dans les eaux remonte à 1976 (Hignite et Aznaroff 1977). De nombreux travaux ont depuis lors confirmé l'ubiquité des substances médicamenteuses dans les eaux de surface et les eaux souterraines (Ternes 1998 ; Stumpf et *al.,* 1999 ; Ternes *et al.,* 2001). La raison pour laquelle les substances médicamenteuses constituent un problème environnemental, est liée à leurs effets biologiques spécifiques non seulement sur l'homme, mais aussi sur les organismes aquatiques (Doll et Frimmel, 2003). Des études menées dans plusieurs pays ont permis de montrer la présence de plus de 80 produits pharmaceutiques dans des eaux usées urbaines à des concentrations variant du ng/l au µg /l (Kümmerer, 2001; Heberer. 2002 ; Miège *et al.,* 2006).

La persistance des médicaments dans l'environnement varie en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Metcalfe *et al*., 2003; Paxeus *et al.,* 2004). L'utilisation croissante et la disposition inadéquate de ces derniers engendrent des apports continus conduisant à leur présence et «persistance» dans les milieux écologiques. (Golet *et al.,* 2003)

Pour atteindre le sang et les organes et traverser les membranes cellulaires des organismes, les médicaments doivent nécessairement être absorbables, hydrosolubles et liposolubles (Buser *et al.,* 1999). De plus, ils doivent être assez persistants dans l'organisme afin de produire leurs effets avant d'être éliminés (Jones *et al.,* 2001). Ces caractéristiques sont comparables à celles de nombreuses substances toxiques et xénobiotiques connus (Van

Coillie, 2005). En raison de cet usage inadapté et inconsidéré de ces produits, couplé à la capacité d'adaptation des microorganismes et aux possibilités de transferts génétiques (Saye et *al.*, 1990; Ashelford *et al.*,1997) ces substances constituent un vrai danger écotoxicologique. (Jones *et al*., 2005)

L'évaluation de la présence de produits toxiques dans l'eau est d'une grande importance et la plupart des méthodes consistent à faire une analyse de l'eau avec des techniques relevant de la chimie analytique. Ces techniques d'une grande précision, sont lentes et onéreuses. (Kolpin *et al*,. 2002), d'où la nécessité de l'utilisation des bio dosages qui permettent d'évaluer simplement et à peu de frais la présence de produits toxiques. (Boyd ,2003)

Certains bio dosages utilisent des organismes pluricellulaires, comme les mollusques, pour mettre en évidence la présence de produits toxiques dans l'eau, dans ces tests, toutes les cellules ne sont pas exposées uniformément aux produits toxiques. En effet il existe des organes et /ou organites cibles responsables de la détoxication de l'organisme qui seront beaucoup plus exposés que d'autres. Ceci implique aussi que l'organisme soit maintenu dans le milieu assez longtemps pour que les produits toxiques se concentrent dans ces organes d'où l'utilisation des protozoaires, qui semble être un choix judicieux puisque ce sont des eucaryotes unicellulaires, ils possèdent donc des systèmes comparables à ceux des organismes pluricellulaires plus évolués tout en conservant certaines structures qui restent parfois identiques à celles des mammifères comme par exemple les cils et flagelles (Berrebbah, 1990) et ceci en plus de leur disponibilité en abondance en raison de la simplicité de leur culture et manipulation. L'ensemble de ces données nous a donc amené à choisir la paramécie comme modèle d'étude.

Dans ce contexte, le présent travail vise à évaluer les impacts de deux médicaments sur l'environnement. Les substances évaluées appartiennent à des catégories de produits très largement utilisés, à savoir, un antipyrétique le Paracétamol et un anti-inflammatoire non stéroïdien l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire *Paramecium sp* et ce à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

Notre travail a été effectué au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) du Département de Biologie de l'Université de Annaba il s'articule autour de six chapitres. Ainsi, après une étude bibliographique assez exhaustive dans laquelle nous avons situé notre

travail, particulièrement la problématique actuelle, concernant la contamination de l'environnement par les résidus de médicaments, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation de modèles biologiques alternatifs tels que la paramécie pour l'étude de la toxicité des deux xénobiotiques à travers le suivi de certains paramètres morpho-physiologiques. Pour mieux étayer les effets éventuels sur ces paramètres, il nous a semblé judicieux de comprendre leur mécanisme cellulaires (biochimiques) mis en jeux notamment le métabolisme des macromolécules telles lipides, protéines et glucides. Notre intérêt s'est porté ensuite sur un métabolisme de base chez tous les êtres vivants à savoir la respiration cellulaire et ce par le biais de l'utilisation d'une technique originale développée au LTC et qui permet de quantifier et de suivre le métabolisme énergétique de la paramécie et les modifications éventuelles pouvant survenir à la suite d'un traitement par les deux xénobiotiques et ce à travers la perturbation et /ou l'inhibition de la consommation d'O2 qui est un signe avant-coureur d'un stress oxydatif ; d'où notre intérêt pour le dosage des bio marqueurs de ce stress. Or l'on sait que l'organite clé de ce phénomène n'est rien d'autre que la mitochondrie, ce qui nous a conduit naturellement à des essais en vue de l'isolement des mitochondries de paramécies dans un premier temps, puis à tester les deux xénobiotiques choisis directement sur ces organites . Il est maintenant indéniable qu'il existe une interaction étroite entre les êtres vivants et leur environnement. En effet toute modification -aussi minime soit-elle – du milieu pourrait avoir un effet sur le comportement ou le métabolisme de l'être qui y vit. Ceci nous a conduits à étudier la conséquence des fluctuations de certains paramètres physicochimiques du milieu sur le comportement de la paramécie. Enfin les résultats obtenus à partir de ces essais nous permettrons d'émettre une hypothèse sur la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur un modèle alternatif et d'ouvrir par conséquent sur des perspectives.

.

I. Problématique liée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement.

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

1. Définition de substance pharmaceutique :

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

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

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

En outre, les produits pharmaceutiques peuvent être stables dans l'environnement ou soumis à des transformations biotiques et/ou abiotique, et parmi les transformations

abiotiques, la photo-dégradation qui est le processus d'élimination le plus important, ce qui conduit parfois à la formation de produits beaucoup plus toxiques que les composés parentaux (Isidori *et al.,* 2009).

2. Médicaments dans l'environnement :

Les premiers rapports sur les produits pharmaceutiques dans les eaux résiduaires et dans les eaux de surface ont été publiés aux États-Unis dans les années 70. Dans un premier temps les produits pharmaceutiques vus comme des contaminants de l'environnement n'ont pas reçu beaucoup d'attention jusqu'à ce que le lien a été fait entre l'ethynylestradiol et ses effets sur les poissons (Carlsson *et al.,* 2006 ; Kim *et al.,* 2009).

Depuis, une attention scientifique a été particulièrement dédiée à la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement (Calamari *et al.,* 2003). Ceci a abouti à un nombre croissant de détection de produits pharmaceutiques dans une variété d'échantillons de l'environnement, les eaux de surface, les eaux souterraines (Jones *et al.,* 2001 ; Tixier *et al.,* 2003) , de l'eau potable et de l'eau de mer (Reddersen *et al.,* 2002) .

Plus de 150 produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques ont été détectés avec des concentrations atteignant le µg/l dans diverses matrices environnementales (Heberer. 2002), incluant une grande variété de composés tels les hormones, les régulateurs de lipides, les antibiotiques, anticancéreux et d'autres cytotoxiques, antiépileptiques, etc (Gros *et al.*, 2008).

Le Tableau (01) regroupe quelques composés parmi ceux le plus souvent retrouvés dans l'environnement.

Tableau 01 : Composés pharmaceutiques les plus fréquents dans l'environnement. (Hirsch *et al.*, 1999 ; Hernando *et al*.2006).

Groupe	Produit Pharmaceutiques
Antibiotiques	Oflaxacin, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Streptomycin, Flumequine, Ciprofloxacin, Trometoprim, Lincomycin, Azithromycin, Clarithromycin, exythromycin, N4-Acety-Sulfamerthoxazole, Sulfamerthoxazole, Roxithromycin, Sulfamethazin
Antidépressifs	Mianserin
Tranquillisants	Diazpam
Antiépileptiques	Carbamazepine
Anti-inflammatoires/ Analgésiques	Acide asetylsalicylique(Aspirine), Diclofenac, Ibuproféne, Acetaminophene, Metamizol, Codéine, Indométacine, Naproxen, Phenazone, Fenoprofen, Paracetamol
Agent de contraste	Diatrizoate, Iohexol, Iomeprol, Iopamidol, Iopronide, Acide Iothalamine, Acide Ioxithalamine
Estrogénes et Hormones	17-β-estradiol, 17-α-ethinylestradiol, Diethylstibestrol, Estrone, Diethylstilbestrol acetate
Beta- Bloquants	Metoprolol, Propanolol, Nadolol, Atenolol, Sotalol, Betaxolol
Anticancéreux	Cyclophosphamide, Ifosfamide
Diurétiques	Furosemide
Régulateurs lipidiques	Bézafibrate, acide Clofibrique, Fénofibrate, Gemfibrozil

3. Différentes sources des substances pharmaceutiques dans l'environnement

Une fois administrés, après leur action pharmacologique, les produits pharmaceutiques sont excrétés avec les urines ou matières fécales dans l'eau sous une forme native inchangée (composé parent) et/ou sous forme de métabolites actifs qui entrent dans le système aquatique par différentes manières et à des degrés variables (Andreozzi *et al.,* 2003; Fent *et al.*, 2006). Ils peuvent remonter la chaîne trophique aquatique dans les eaux de surface, souterraines et sont même présents dans l'eau du robinet (Isidori *et al*., 2007).

Les concentrations atteignant les eaux de surface dépendent de plusieurs facteurs, dont certains théoriquement prévisibles, tels que le métabolisme et la dégradabilité, ainsi que d'autres imprévisibles, tels que l'élimination inadéquate (Zuccato *et al.,* 2005). Ces produits se retrouvent alors dans le réseau d'eaux usées et sont traités à des degrés différents dans les stations d'épuration. Une autre voie de contamination du milieu naturel n'est pas à négliger, elle concerne les médicaments rejetés avec les déchets ménagers pouvant ainsi polluer les sols et les eaux souterraines en cas d'enfouissement en décharge. (Fent *et al.,* 2006). La figure (01) illustre les différentes sources de contamination de l'environnement par les médicaments.

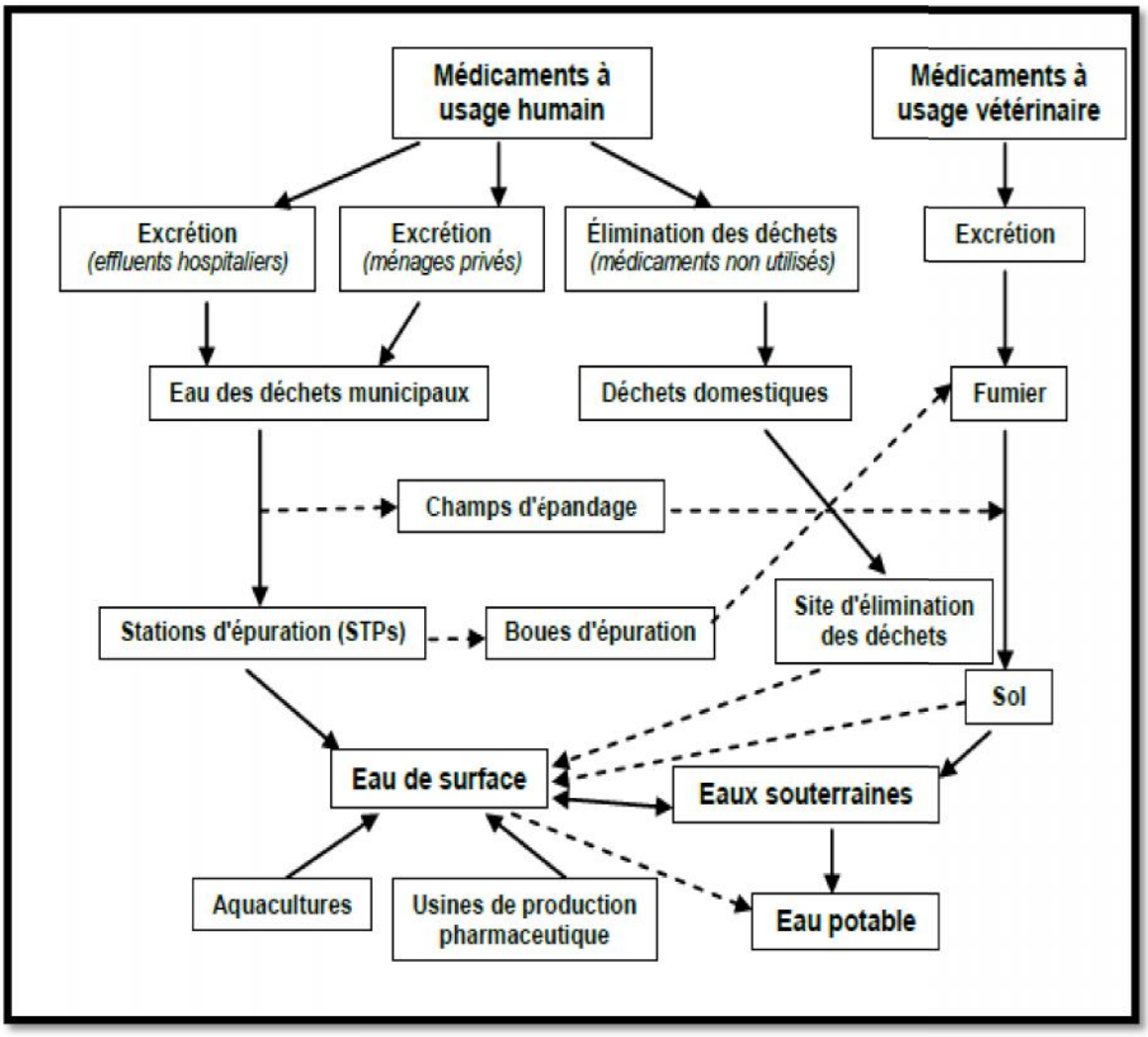

Figure 01 : Schéma montrant les sources possibles et les voies de la présence de résidus pharmaceutiques dans l'environnement aquatique. (Heberer ,2002).

Les animaux également peuvent constituer une source de pollution de l'environnement par le biais de produits vétérinaires (notamment les antiparasitaires et antibiotiques), soit par le biais de leurs excréments (épandage du purin, contamination des sols de prairies), soit par les produits qui leur ont été administrés en usage externe (Clara *et al.*, 2004) . Ces produits et leurs métabolites se retrouvent alors sur les sols, puis dans les eaux superficielles par ruissellement et les eaux souterraines par lixiviation (Barnes *et al.*, 2008). Dans le cas où les boues d'épuration sont répandues dans les champs agricoles, la contamination des sols peut se produire par le ruissellement dans les eaux de surface mais aussi par le drainage (Schulte-Oehlmann *et al.*, 2007). En outre, les produits pharmaceutiques vétérinaires peuvent entrer dans le système aquatique via l'épandage du fumier dans les champs mais aussi via

l'application directe dans l'aquaculture (élevage de poissons) où les produits administrés se retrouvent directement dans les eaux superficielles et peuvent être adsorbés dans les sédiments (Fent *et al.,* 2006).

Les substances pharmaceutiques de par leurs sources, leurs propriétés physicochimiques sont largement distribuées dans les systèmes aquatiques, de telle sorte que l'on peut les qualifier d'ubiquistes. De nombreuses études ont mis l'accent sur leur présence dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines (Scheytt *et al.,*1998; Rabiet *et al.,* 2006). La présence des substances pharmaceutiques a également été mise en évidence dans les eaux de boisson (Kuehn, 2008).

La présence des anti-inflammatoires non stéroïdiens, oestrogènes de synthèse, stimulants, antibiotiques est très largement étudiée. Actuellement, la recherche s'oriente vers de nouvelles molécules telles les drogues illicites qui ont, à titre d'exemple, été mesurées à des concentrations de l'ordre de 1 ng/ l dans les eaux de la Tamise et du Pô (Zuccato *et al.,* 2008), plus de 100 ng/ l pour la benzoylecgonine en Ecosse (Kasprzyk-Hordern *et al.,* 2008) les anticancéreux et les antinéoplasiques (Roberts et Bersuder, 2006) à titre d'exemple l'ifosfamide a été détecté et quantifié à une concentration maximale de 20 ng/l dans les eaux de surface (Ternes, 1998), le cyclophosphamide a été détecté et quantifié à une concentration maximale de 65 ng/l dans les eaux de surface (Moldovan, 2006).

Les eaux usées des hôpitaux, les eaux usées des usines de production peuvent contenir des concentrations importantes de produits pharmaceutiques qui ne sont pas facilement dégradés/éliminés par les usine de traitement des eaux usées, et sont déversés dans les effluents traités, conduisant à la contamination des rivières, lacs, estuaires et, eaux souterraines et même l'eau potable dans certains cas (Fent *et al.,* 2006).

4. Devenir des substances pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques

Le devenir des substances pharmaceutiques et de leurs métabolites dans l'environnement demeure encore non élucidé. La faible volatilité des substances pharmaceutiques ainsi que leur polarité indiquent que la distribution dans l'environnement va se faire essentiellement par transport au sein de la voie aqueuse et également au travers des chaînes alimentaires.

4.1. Les phénomènes de dégradation en milieux naturels :

4.1.1 La photodégradation :

Les études concernant la photodégradation des substances pharmaceutiques se sont largement généralisées (Boreen *et al.,* 2003) La dégradation se fait essentiellement par réaction photochimique directe ou indirecte. Les réactions de photodégradation par photolyse interviennent dans les phénomènes de biodégradation de manière significative pour des composés comme le naproxène et le diclofénac (Lin et Reinhard, 2005) produisant des composés parfois plus toxiques que la molécule mère (Isidori *et al*., 2005). Lam et Mabury (2005) ont mis en évidence des photoproduits issus de défluorination de la fluoxétine par photodégradation.

4.1.2 La biodégradation :

Les phénomènes de biodégradation qui ont été initiés au sein des stations d'épuration vont se poursuivre dans le milieu naturel mais dans une moindre mesure. Ces mécanismes ne semblent pas prévalents (ou demeurent encore non élucidés) pour les substances pharmaceutiques à l'exception des oestrogènes. (Carrara *et al.*, 2008), à travers une étude sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens (l'ibuprofène, le naproxène), outre la mise en évidence d'une contamination des eaux souterraines à des concentrations aussi élevées que pour les eaux usées, établissent une corrélation entre la persistance des molécules et les conditions REDOX du milieu et concluent que les conditions toxiques sont favorables à la dégradation des molécules.

Les phénomènes de biodégradation peuvent également se dérouler dans les sédiments. Ainsi Bradley (2007) a étudié les capacités de biodégradation des populations bactériennes naturelles présentes dans les sédiments de différentes rivières envers la caféine, la nicotine et la cotinine. Les résultats montrent qu'au sein des sédiments les populations bactériennes sont capables d'activité de biotransformation. De même, il est apparu que la capacité à convertir le diclofénac était largement répandue dans les sédiments, et ne nécessitait aucune acclimatation des organismes du milieu. De plus, aucune corrélation avec l'activité microbienne totale n'a été mise en évidence. Poiger *et al.* (2001)

4.1.3 Distribution des substances pharmaceutiques dans la phase aqueuse

La question de la distribution des substances pharmaceutiques entre les phases dissoutes et colloïdales a récemment été étudiée (Maskaoui *et al.,* 2007). Les résultats mettent en évidence qu'une période courte de 5 min est suffisante pour que les interactions entre les substances pharmaceutiques et les colloïdes atteignent un plateau. Les interactions entre les substances pharmaceutiques et les colloïdes, sous contrôle du caractère hydrophobe des molécules, apparaissent comme prépondérantes pour la compréhension du devenir de ces molécules dans les systèmes aquatiques. Lin et Reinhard (2005)

4.1.4 Phénomènes de sorption

De par leurs propriétés physico-chimiques (valeurs de Kow faibles, solubilité élevée), les études sur les substances pharmaceutiques se sont essentiellement cantonnées à des études en phase dissoute de telle sorte que très peu de données de présence dans les phases solides sont recensées. Ra *et al*. (2008) ont mis en évidence la faible affinité de l'ibuprofène et du gemfibrozil pour les matières en suspension, seul le diclofénac présente 11 % de sorption (expérience simulée). La présence de substances pharmaceutiques a été rapportée dans les sédiments, principalement celle des anti inflammatoires non stéroïdiens et du gemfibrozil (Hernando *et al.,* 2006 ; Bradley *et al.,* 2007). Un effort de recherche doit être porté sur ces compartiments de l'environnement qui peuvent participer à la dissipation des molécules dans l'environnement (vecteurs ou réservoirs). Un certain nombre de travaux se sont également attachés à l'étude des substances pharmaceutiques à usages vétérinaires notamment les antibiotiques, dans les sols : ils mettent en évidence des concentrations qui peuvent atteindre la dizaine de µg/g de sols (Kemper, 2008).

5. Transferts aux organismes aquatiques

Pour l'heure le devenir des substances pharmaceutiques (bioconcentration, bioaccumulation et biotransformation) dans les organismes aquatiques est peu étudié, exception faite du contexte réglementaire lié à l'usage des antibiotiques en aquaculture. Ainsi un certain nombre d'études ont été réalisées dans ce contexte et ont pu mettre en évidence la persistance de certains antibiotiques après administration : plus de 76 jours pour

l'azithromycine chez le juvénile d'*Oncorhynchus Tshawytscha* moins de 21 jours pour le composé parent : l'érythromycine (Fairgrieve *et al.*, 2006).

Certaines études rapportent des taux de fluoxétine, norfluoxétine, paroxétine supérieures au µg/g dans les muscles de poissons exposés dans l'environnement (Chu et Metcalfe, 2007). Hoeger *et al.* (2007) ont étudié le devenir du diclofénac chez la truite. Ils ont observé que celui-ci n'était pas complètement excrété et qu'une part significative entrait dans le cycle enterohépatique prolongeant ainsi la biodisponibilité du composé dans l'organisme et favorisant ainsi son accumulation.

Les recherches en écotoxicologie se tournent actuellement vers l'étude des effets sur les écosystèmes de composés actifs à de très faibles concentrations (de l'ordre de la dizaine de ng/l). Du fait de leur activité biologique, ces molécules ont souvent les mêmes cibles moléculaires chez l'homme et sur les espèces sauvages avec les mêmes effets indésirables. Introduits dans l'environnement, ces substances vont affecter par les mêmes voies les animaux ayant des tissus et organes cibles similaires. Des expérimentations toxicologiques ont été réalisées pour déterminer les cibles spécifiques des substances pharmaceutiques chez les vertébrés inférieurs et les invertébrés, basées sur l'hypothèse de similitude des modes d'action. Dans cet objectif, des analyses *in vitro* sur modèles cellulaires de poisson et sur modèles d'invertébrés sont développés bien que la plupart des tests écotoxicologiques ne prennent en compte que les effets aigus *in vivo* après une courte exposition et plus rarement après une exposition chronique. (Fraysse et Garric, 2005)

Bien que ces composés fassent l'objet de tests de toxicité pour leurs usages vétérinaires et humains, ils s'avèrent que ces données ne soient pas suffisantes pour juger de leur toxicité quant aux organismes des systèmes aquatiques (Huschek *et al.*, 2004; Bound *et al.*, 2006). Les interactions de ces composés et de leurs métabolites avec les organismes du milieu sont encore mal connues. (Sumpter et Johnson, 2005).

5.1 La toxicité aigüe des substances pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques à usage humain ne semblent pas présenter, en général, de toxicité aigüe. En effet, la très grande majorité de ces composés présente des valeurs de toxicité aigüe supérieures à 1 mg/1. Si ces valeurs sont comparées à des concentrations maximales mesurées dans l'environnement (dans les effluents de stations d'épuration aussi bien que des eaux naturelles), les valeurs de toxicité sont très largement supérieures.

L'existence de toxicité aiguë aux concentrations environnementales mesurées est peu probable sur les organismes aquatiques (Figure 02). Dans la plupart des études de toxicité les concentrations provoquant des effets aigus sont de 100 à 1000 fois plus fortes que celles résiduelles trouvées dans l'environnement aquatique. Par exemple, la concentration la plus basse d'acide salicylique donnant des effets aigus est de 37 mg/l, alors que la concentration environnementale la plus haute retrouvée est 60 µg/l. L'impact de la toxicité aiguë ne semblerait pertinent qu'en cas de pollution exceptionnelle d'un site.(Zwiener, 2007) .

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

Assez peu de molécules appartenant à d'autres classes thérapeutiques ont fait l'objet de tests aigus sur les algues. Dans l'ensemble, les études rapportent des concentrations effectives très élevées, de l'ordre du mg/l. Les cyanophytes semblent être un peu plus sensibles que les algues vertes, mais les valeurs de toxicité restent toutefois du même ordre de grandeur. Les ISRS (inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine), et notamment la fluoxétine et la sertraline sont toutefois très toxiques sur les algues vertes, avec des valeurs de CE50 respectives de 24 µg/l et 12 µg/l (FDA-CDER 1996 ; Brooks *et al.*, 2003 ; Johnson *et al.*, 2007)

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

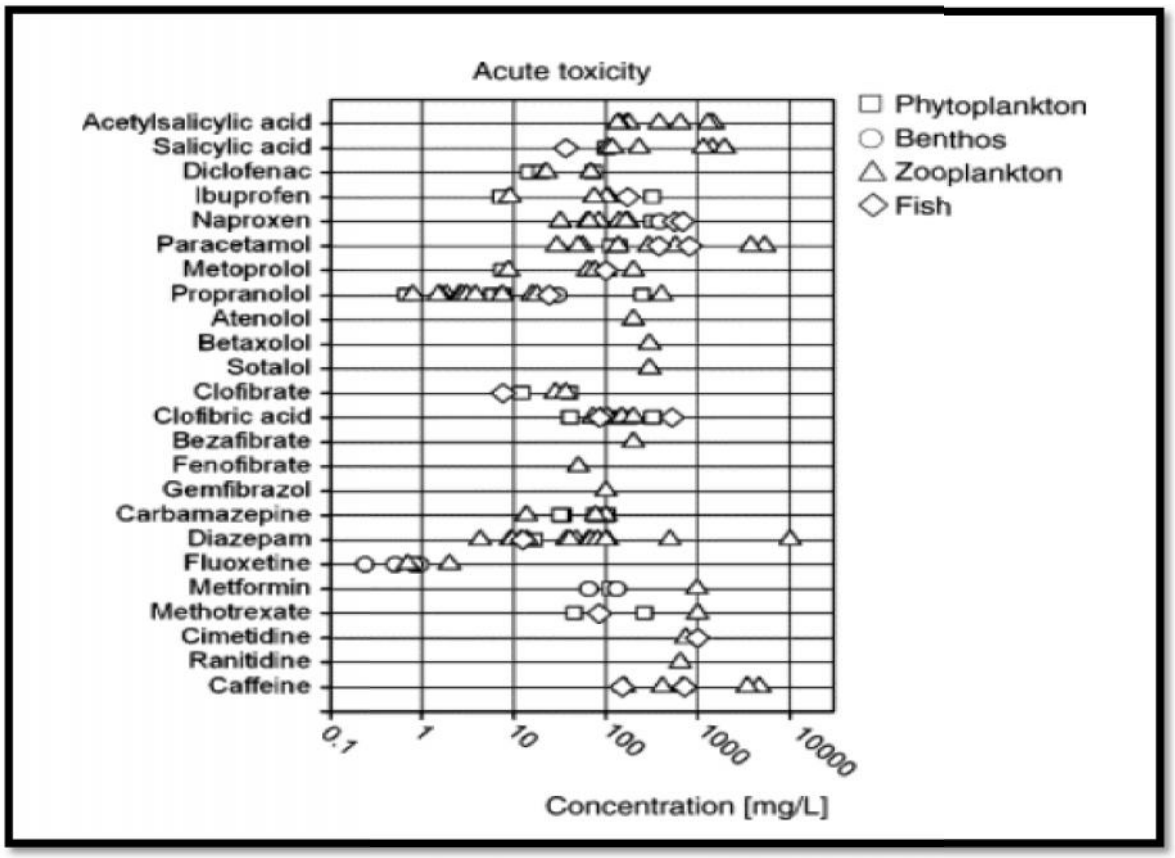

Figure 02 : Toxicité aiguë de 24 médicaments sur quelques taxons aquatiques. EC50 et LC50 pour différents organismes, différents paramètres et différents temps d'exposition (Fent *et al.*, 2006).

5.2 La toxicité chronique

Assez peu d'études portant sur la toxicité chronique des produits pharmaceutiques chez les organismes aquatiques autres que les algues ont été réalisées ; et seul un petit nombre de composés est concerné par ces études .La toxicité chronique des substances pharmaceutiques est évaluée par des tests sur des organismes de laboratoires tels les algues, le zooplancton et autres invertébrés et les poissons. (Garric *et al.*, 2006)

Webb (2001) suggère, en comparant différents niveaux trophiques que, de manière générale, les algues seraient plus sensibles aux médicaments sélectionnés que *Daphnia magna* et que les poissons sont les moins sensibles. Il note également que les classes les plus toxiques sont les antidépresseurs, les antibiotiques et les antipsychotiques avec des différences très importantes au sein d'une même classe. La toxicité chronique de l'ibuprofène sur *D. magna* et sur les mollusques semble limitée, avec des valeurs de NOEC de l'ordre du mg/l (Hekmann *et al.*, 2007 ; Pounds *et al*., 2008).

Les études de toxicité chronique confirment que les antidépresseurs de type inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sont à surveiller plus particulièrement au regard de la toxicité exprimée sur les invertébrés et de l'implication du système sérotoninergique dans la locomotion. Ainsi, un intérêt tout particulier devrait être porté sur la fluoxétine, molécule qui présente une très forte toxicité chez les algues vertes (Besse et Garric, 2008). Les comparaisons des valeurs de toxicité chronique mettent également en évidence que les antibiotiques sont des molécules très toxiques. Les études menées par Isidori *et al*. (2005, 2006) montrent que leur toxicité est fonction de la molécule et de l'organisme considérés.

Canesi *et al.* (2007) ont mis en évidence qu'exposées (*in vivo* et *in vitro*) à des concentrations environnementales de bézafibrate, des moules *Mytilus Spp* présentaient des affections du système immunitaire et de la glycolyse, entre autres. Richards *et al.* (2008) rapportent qu'à des concentrations aussi faibles que 0,1 µg.l/1, la fluoxétine est susceptible d'affecter l'activité chitobiase (enzyme en charge de la dégradation de la chitine) chez la daphnie exposée pendant 24 à 72 heures.

Quinn *et al.* (2008) ont mis en évidence, chez l'hydre, qu'à des concentrations susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement: le gemfibrozil, l'ibuprofène, le naproxène et le bézafibrate, apparaissaient comme de potentiels tératogènes de même que la carbamazépine (dans une moins grande propension).

Le propranolol est le composé le plus toxique des β-bloquants testés avec des valeurs de toxicité différentes rapportées pour un même organisme : les concentrations les plus fortes ne montrant pas d'effets sur la reproduction de 7 jours sur *C. dubia* et de de 9 µg/l (Ferrari *et*

al., 2004) et 125 µg/l (Huggett *et al.*, 2002). Le métoprolol et l'aténolol sont moins toxiques (Dzialowski *et al.*, 2006).

Kostich et Lazorchak (2008) rapportent une réflexion quant aux risques liés à la présence de substances pharmaceutiques à usage humain pour les organismes aquatiques. Ils concluent qu'aux Etats-Unis certaines molécules sont mesurées à des concentrations suffisantes pour affecter les organismes qui présentent des capacités d'épuration insuffisantes. Certains phénomènes d'antibiorésistance ainsi que des effets toxiques sur certains vertébrés, procaryotes et eucaryotes seraient également susceptibles de se dérouler. A l'heure actuelle les données de toxicité chronique sont peu nombreuses (Pomati *et al.*, 2007 ;Winter *et al.*,. 2008), la figure (03) montre une synthèse des principales données .

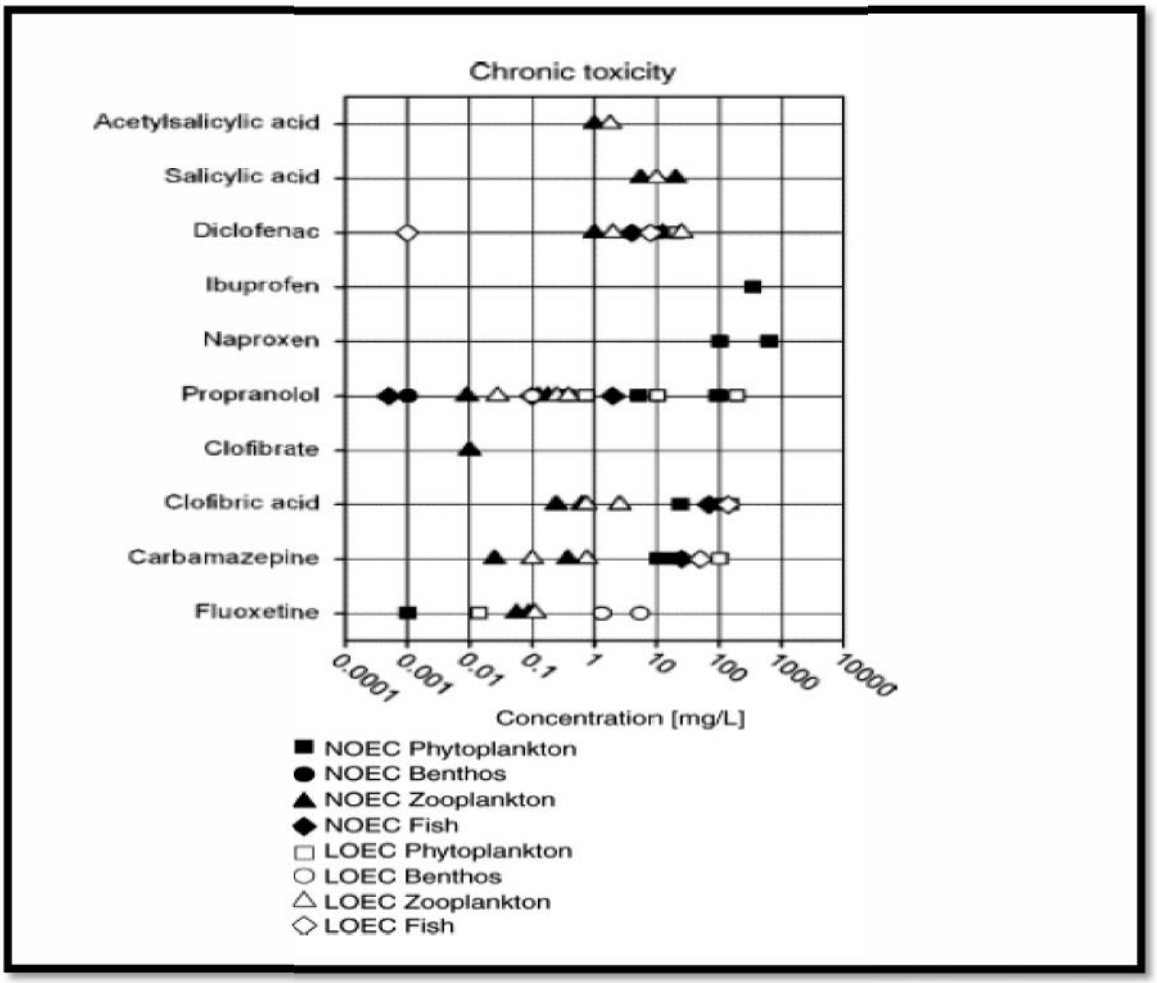

Figure 03 : Toxicité chronique de 10 médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques. LOEC3 = concentrations les plus faibles montrant un effet et NOEC4 = concentrations les plus fortes ne montrant pas d'effets pour différents organismes aquatiques, différents paramètres et temps d'exposition (Fent *et al.*, 2006)

5. 3 Effets cocktail des substances pharmaceutiques

Les effets d'exposition à des mélanges de substances pharmaceutiques sur les organismes aquatiques sont encore mal connus et évalués (Cleuvers, 2004 ; Pomati *et al.,* 2006) de même que ceux portant sur des interactions possibles entre les molécules pharmaceutiques et les autres polluants environnementaux. (Brain *et al.,* 2004)

Thibaut *et al.* (2006) ont étudié, *in vitro*, les interactions des fibrates, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des antidépresseurs avec les voies du cytochrome et les activités de phase II impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et des molécules endogènes chez les poissons. Les résultats montrent une inhibition de l'activité de glucuronidation du naphtol et de la testostérone par les anti-inflammatoires non stéroïdiens et à un moindre degré par les fibrates, une inhibition (mineure) de l'activité de sulfatation de l'estradiol exercée par le clofibrate, le gemfibrozil et la fluoxétine. De façon générale, le g emfibrozil, le diclofénac et les antidépresseurs semblent être les molécules présentant les capacités à interférer avec les voies métaboliques les plus significatives de certains poissons. (Fraysse et Garric 2005)

Pomati *et al.* (2007) suggèrent que des études complètes sur les effets des mélanges pourraient faire émerger une liste de molécules pharmaceutiques préoccupantes à des concentrations environnementales. Ils rapportent également que les scénarii environnementaux mis en œuvre lors des expositions (réactions antagonistes et/ou synergiques, concentrations dépendances des effets) pourraient considérablement affecter la prédiction des effets toxiques des mélanges et ainsi sous-estimer les risques liés à la présence des substances pharmaceutiques dans les milieux naturels.

5.4 Toxicité des métabolites

Contrairement aux composés parents dont le potentiel toxique est pour une part bien connu, la toxicité des produits de dégradation, notamment des sous-produits formés au cours de certains traitements du cycle de l'eau et dans l'environnement est mal connue (Borgmann *et al.,* 2007)

Isidori *et al.* (2007) ont étudié le potentiel toxique, notamment génotoxique, de certains fibrates et de leurs produits de photodégradation. Ils mettent en évidence que les produits issus de la photodégradation du gemfibrozil présentent un caractère génotoxique et mutagène. Le caractère mutagène des photoproduits du furosémide a également été révélé au cours d'une étude similaire (Isidori *et al.,* 2006). Li *et al.* (2008) ont étudié la toxicité des produits issus du traitement par ozonation de l'oxytétracycline chez *Vibrio fischeri* (bactérie). Les résultats mettent en évidence que le premier intermédiaire d'ozonation présente un potentiel toxique plus important que la molécule parente.

II. Stress oxydant : « quand l'oxydation phosphorylante mitochondriale devient une source radicalaire »

D'un point de vue physiologique, un stress est à l'origine d'une perturbation de l'équilibre cellulaire, une perturbation de l'homéostasie, du grec homoios (semblable) et stasis (position). Au 19ème siècle, le physiologiste français Claude Bernard avançait que «c'est la fixité du milieu intérieur qui est la condition d'une vie libre et indépendante ». Cette remarque marquera le début de nombreux travaux sur la capacité de l'organisme à s'adapter aux variations et agressions environnementales. Le désordre induit par un stress peut se manifester au niveau de la cellule, d'un tissu, d'un organe, d'un système ou de l'organisme. Lorsque le déséquilibre cellulaire est amorcé, que l'homéostasie est rompue, que la capacité d'adaptation physiologique est dépassée, le stress apparaît. L'ampleur de cette perturbation est dépendante de l'intensité et de la durée du stress (Halliwell, 1999). **Le stress oxydant : une histoire d'équilibre redox ?**

Le stress oxydant est défini par Haliwell (1999) comme l'incapacité pour l'organisme de se défendre contre les agressions des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) . Ces espèces dérivées de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires ou radicaux libres générés par l'organisme en parallèle des espèces nitrées (RNS : Reactive Nitrogen Species) (Miller *et al.,* 1990). Lors d'un déséquilibre entre la production des substances prooxydantes (radicaux libres) et la capacité de défense des antioxydants, la balance redox ou homéostasie redox se voit déséquilibrée en faveur des oxydants. On parle alors de stress oxydant.

1. Les différentes espèces radicalaires de l'oxygène

Les radicaux libres (sont des espèces chimiques, atomes ou molécules qui possèdent un électron célibataire non apparié (Halliwell, 1999). Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres dérivés de l'oxygène ont une propriété caractéristique commune, qui est celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O2•-), radical hydroxyle (OH•) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).Figure (04)

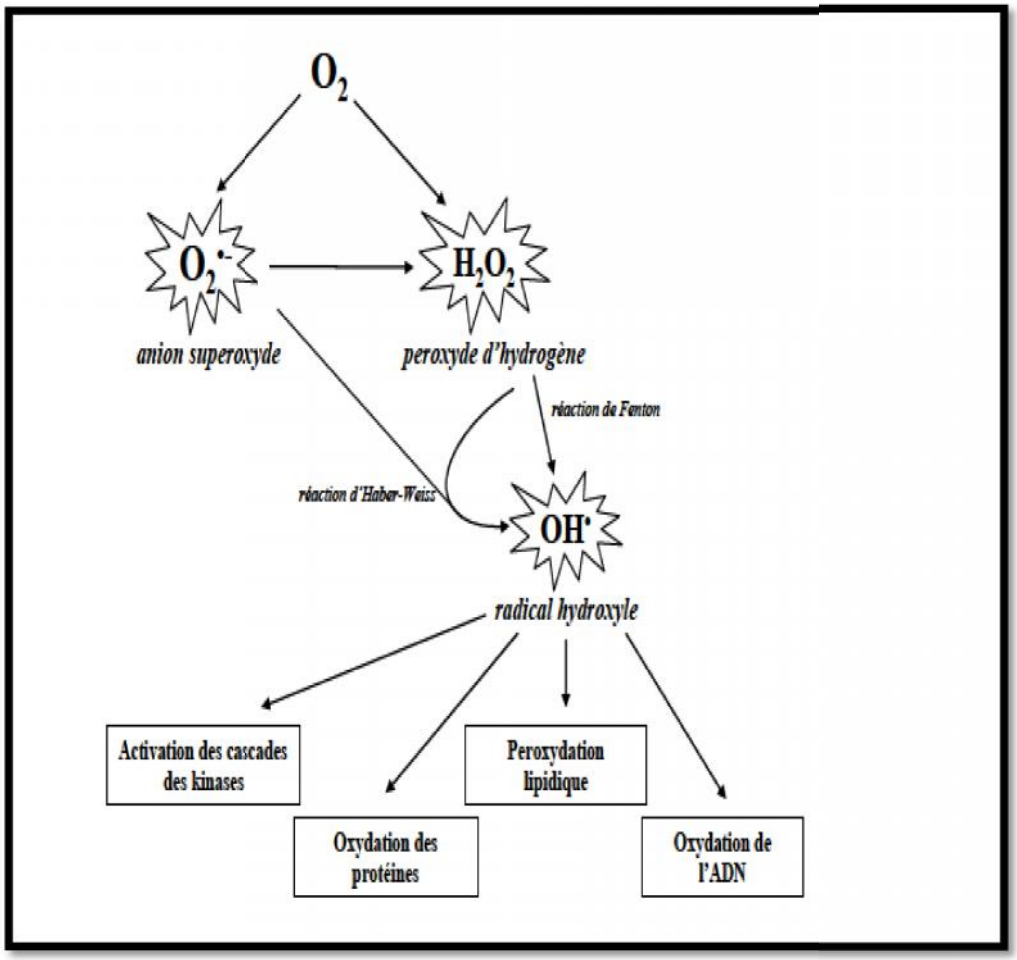

Figure 04 : Schéma des différentes formes de ROS

2. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR (espèce réactive à l'oxygène) est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène.

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997) :

- **Les Systèmes enzymatiques :** Il s'agit principalement de trois enzymes; la Super Oxyde Dismutase (SOD), la Catalase (CAT) et la Glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du O_2●- et du H_2O_2, conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.,* 2001).

- **La superoxyde dismutase :**

Comme l'indique son nom, la Super Oxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.,* 2002).

- **La catalase :**

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau. (Sorg, 2004)

- **Les glutathions peroxydases et réductases :**

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995).

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

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+} /Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (koechlin–ramonatxo, 2006). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail *et al.*,2002). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (Bruneton, 1999). Flavonoïdes (Pietta, 2000; Cotelle, 2001) apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piégeurs de radicaux libres (Koechlin–Ramonatxo, 2006).

3. La mitochondrie : « Source de production des ROS »

Les mitochondries sont des organites intracellulaires pourvus d'une double membrane, elles sont probablement issues d'un phénomène de symbiose entre une bactérie pourpre (α protéobactérie) et une cellule protoeucaryotique (une bactérie anaérobie sûrement proche des archaebactéries) (Gray et Doolittle, 1982). Cette symbiose permet à la cellule hôte de vivre en conditions aérobies grâce à l'acquisition de la respiration.

La mitochondrie est en effet le principal fournisseur d'ATP dans les cellules eucaryotes. Les réactions de phosphorylations oxydatives réalisées dans la membrane interne mitochondriale permettent la transformation de l'énergie contenue dans les nutriments en énergie utilisable par la cellule: l'ATP. Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire mitochondriale (quatre complexes protéiques, eux-mêmes composés de différentes sous unités codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial) et de l'ATP synthase.

3.1 Fonctionnement

La dégradation des nutriments permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de NADH + H+ et de $FADH_2$. Ces molécules sont réoxydées par transfert de leurs électrons sur un accepteur final : l'oxygène. Cette étape est réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne de transport sur laquelle les électrons vont transiter en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Ainsi, le NAD+ ayant une faible affinité pour les électrons, sa forme réduite, le NADH, peut facilement perdre deux électrons.

L'oxygène moléculaire possède une très forte affinité pour les électrons et capture facilement ceux des autres molécules. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydoréduction et les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel (tels que le NAD+ qui a un potentiel de – 320 mV) vers des molécules à fort potentiel (tels que l'oxygène qui a un potentiel de + 816 mV).

Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une force protonmotrice qui est la somme du gradient de pH et du potentiel membranaire d'environ

–150 mV (négatif du côté matriciel). Ce gradient électrochimique est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP ainsi formé est alors exporté dans le cytosol grâce à la translocase des nucléotides adényliques (ANT). (Mitchell, 1977)

3.2 La mitochondrie et la production de ROS

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes. L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (Freeman et Crapo, 1982). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'O2. Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban *et al.,* 2005). C'est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est incomplètement réduit et produit des ROS *(*Boveris *et al.,* 1972). Ces estimations sont réalisées à partir de mesures *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats(Boveris et Chance, 1973). Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford *et al.,* 1997). Il existe deux sites de production de ROS dans la mitochondrie : les complexes I et III .Figure (05)

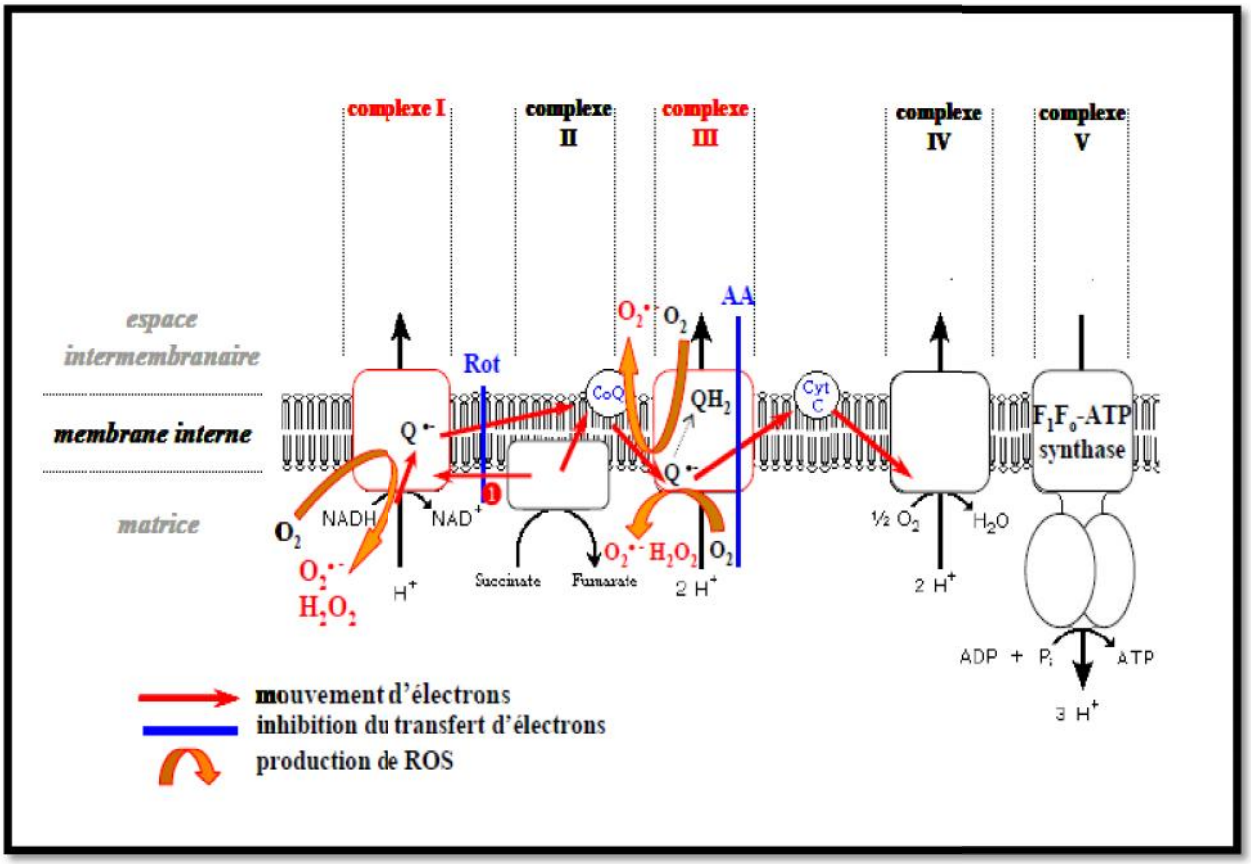

Figure 05 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Buchanan *et al.*, 2000).

III. Généralités 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.

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.

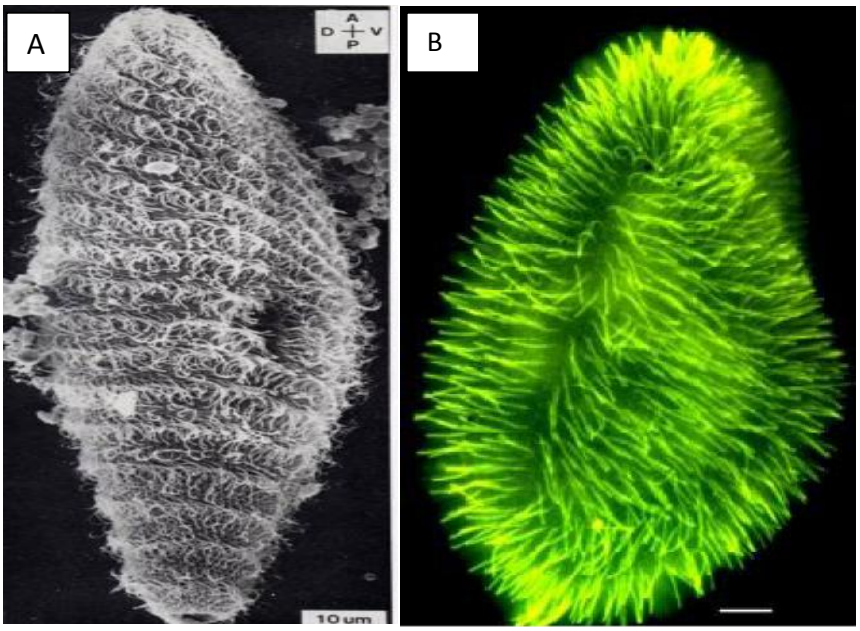

Figure 06 : présentation de la paramécie. A- Vue d'une paramécie en microscopie électronique à balayage. B- la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence (anticorps anti-tubuline). (Gogendeau, 2005).

- **Dimorphisme nucléaire et cycle de vie**

Comme la plupart des ciliés, la paramécie est caractérisée par un dimorphisme nucléaire : elle possède un macronoyau hautement polyploïde (800 n) transcriptionellement actif pendant la vie végétative et deux micronoyaux germinaux nécessaires à la transmission de l'information génétique. En phase végétative et à une température de 27°C, les cellules se divisent environ toutes les 5heures. Mais en condition de carence alimentaire, les cellules entament une reproduction sexuée qui peut être de deux types: la conjugaison (fécondation réciproque entre deux partenaires) et l'autogamie (autofécondation) (Sonneborn, 1975). A chaque événement sexuel, l'ancien macronoyau est dégradé et un nouveau est alors formé à partir d'un micronoyau par amplification de chromosomes et élimination de séquences. Suite à l'autogamie, on a :

- Conservation du patrimoine génétique, et perte de l'histoire évolutive des macronoyaux.
- Perte du transgène injecté dans le macronoyau de la paramécie.

VI. Généralités sur les xénobiotiques utilisées

1. Le Paracétamol

Le paracétamol (ou acétaminophene), découvert il y a plus d'un siècle, est l'antalgique le plus utilisé au monde (Bannwarth et Pehourcq ,2003) sans doute du fait de sa parfaite tolérance aux doses thérapeutiques. Il appartient à la famille des Antalgiques non opiacés, de palier I de la classification de l'OMS. La totalité de son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, mais il s'agirait d'une action principalement centrale (Remy *et al.,* 2006). Il semble inhiber la cyclo-oxygénase (Cox) au niveau du système nerveux central sans action périphérique, raison pour laquelle il est dénué d'effets anti-inflammatoires. (Zou *et al.,* 1999)

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

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

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

2. L'Ibuprofène

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique non stéroïdien largement utilisé. Il appartient au groupe des dérivés de l'acide propionique .Les anti-inflammatoires non stéroïdiens acide Acétylsalicylique (aspirine), Diclofénac, Ibuprofène, sont des inhibiteurs des deux isoformes de la cyclo-oxygénase (Cox-1 et Cox-2), enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines. (Dorosz, 2007).

- ✓ **Effet des deux xénobiotiques sur l'environnement :**

Chez les poissons, un homologue de la Cox-2 a été mis en évidence dans les macrophages de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), où l'on retrouve 83% d'homologie avec la Cox-2 humaine et 77% avec la cox-1. Cette homologie suggérerait une sensibilité des poissons à ces molécules (Zou *et al.,* 1999). De plus 0,05 M (7,5 mg/l) de paracétamol inhibe 50 % de la production de vitellogénine chez des cellules isolées de foie de truite (Harnagea-Theophilus *et al.,* 1999).

Cet effet ubiquitaire justifie les recherches sur le devenir des résidus de ce xénobiotique dans l'environnement. En effet, en Asie, la disparition de vautours qui se nourrissaient de bétail traités au Diclofénac serait attribuée à la toxicité de cet anti-inflammatoire (Oaks *et al*., 2004). Ainsi, bien que les deux xénobiotiques soient métabolisés, le risque pour l'environnement n'en est pas moins diminué en raison de la présence de leurs métabolites générés au cours de la dégradation biologique.

Introduction

La recherche de relations entre données pharmacologiques et écotoxicologiques a été proposée par plusieurs auteurs, et les mécanismes d'action ainsi que les concentrations plasmatiques thérapeutiques ont été utilisés pour estimer le risque et les effets médicaments sur des espèces aquatiques (Huggett *et al.*, 2002 ; Seiler 2002 ; Länge et Dietrich 2002).

- **Objectif du travail**

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets cytotoxiques du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur un modèle cellulaire alternatif *Paramecium tetraurelia*. Ce choix est justifié pour deux raisons principales ; d'abord en raison de la forte similitude entre le métabolisme des paramécies et les cellules de mammifères (Kosmala *et al.*, 1999) ensuite du fait que ces cellules peuvent rendre compte d'éventuelles altérations du milieu aussi minimes soient-elle (Chapman, 2001) et ce à travers le suivi de certains paramètres morpho-physiologiques comme la cinétique de croissance, le pourcentage de réponse, le taux de mortalité ainsi que le taux de malformations, et nombre de vacuoles digestives.

1. Matériel et méthodes

1.1 Materiel biologique

Nous avons utilisé une culture pure de *Paramecium tetraurelia* dont la Position taxonomique est la suivante : *P. tetraurelia* répond à la classification de Corliss(1961).

Super règne : Eukaryotae
Phylum : Protista
Classe : Ciliophora
S/classe : Olygohymenophorea
Ordre : Peniculia
S/ordre : Urocentrida
Famille : Paramecina
Genre : Paramecium

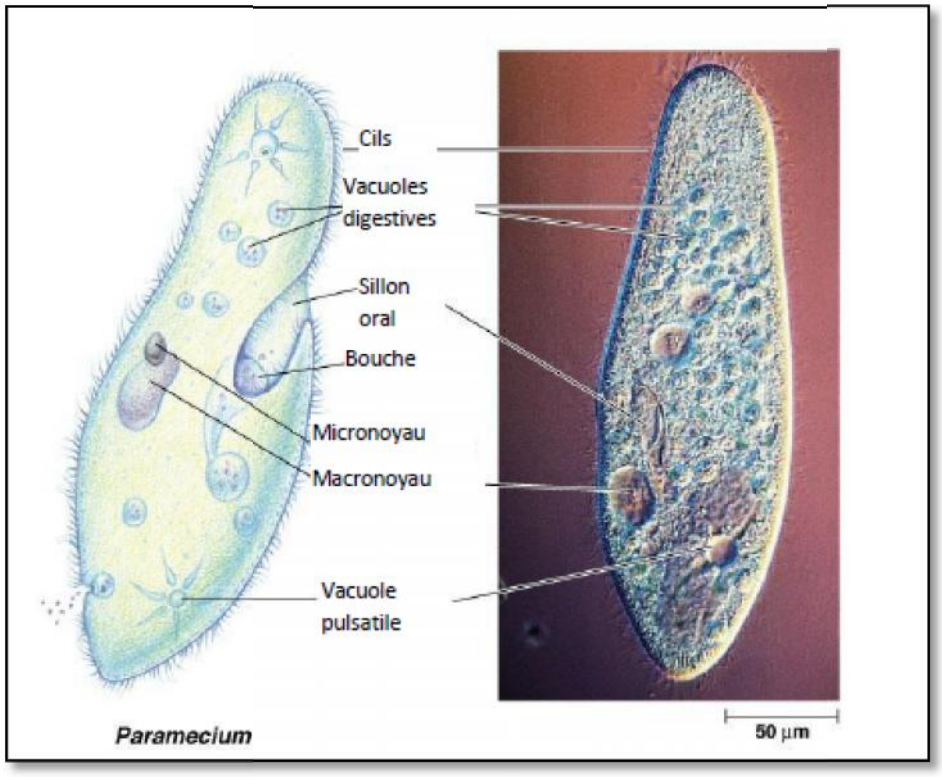

Figure 07 : Structure d'une paramécie au microscope. (Génoscope, 2007)

1.2 Matériel chimique

1.2.1 Le Paracétamol

Le paracétamol (ou acétaminophene) que nous avons utilisé est constitué du principe actif pur à 99% sous forme de poudre. Il se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche, inodore, de saveur amère, soluble dans l'eau dont la structure moléculaire est la suivante (Figure 08). Il nous a été fourni par une unité de fabrication de médicaments située dans la zone industrielle Ouled Salah (Jijel).

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

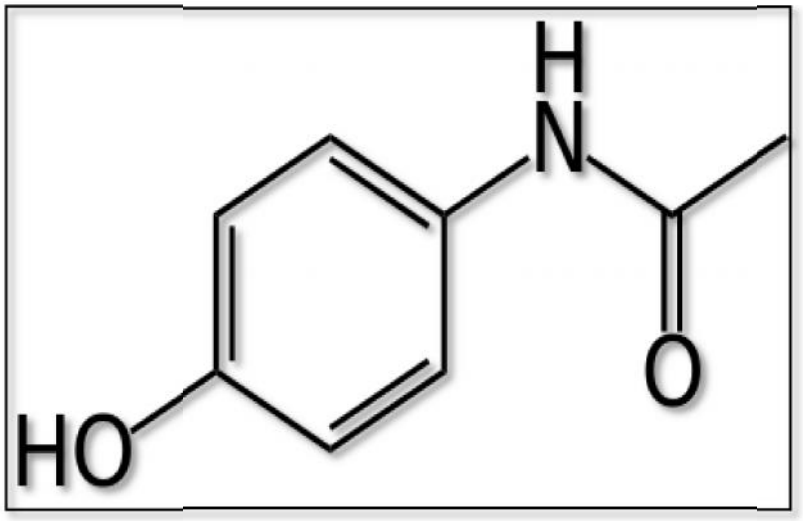

Figure 08 : Structure moléculaire du paracétamol. (Lechat, 1978)

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

Formule brute	Masse molaire	PKa	Solubilité	DL50
$C_8H_9NO_2$	151,1626 ± 0,0078 g/mol	9.5	Soluble dans l'acétone, l'éthanol, le méthanol. Beaucoup plus soluble dans l'eau chaude	2 400 mg/kg Rat oral. 800 mg/kg Souris 825 mg/kg Chien

1.2.2 L'ibuprofène

L'ibuprofène est un A.I.N.S appartenant à la famille des acides aryl-alcanoïques, plus exactement à la sous-famille des acides aryl-propioniques. Il s'agit du 2-(4-isobutylphenyl) d'acide propionique. Il se présente sous la forme d'une poudre cristalline incolore, nous avons utilisé un principe actif pur à 98 %. Il nous a été fournit par une unité de fabrication de médicaments située dans la zone industrielle Ouled Salah (Jijel). L'ibuprofène est relativement insoluble dans l'eau mais il est soluble dans la plupart des solvants organiques. C'est un acide faible, utilisable sous forme de sel.

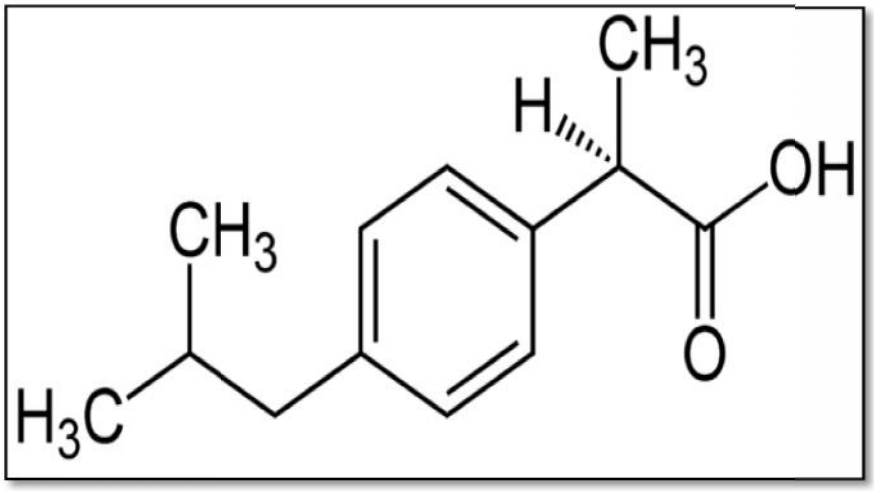

Figure 09 : Structure moléculaire de l'ibuprofène. (Adams, 1969)

Tableau 03 : caractéristiques physicochimique de l'ibuprofène

Formule brute	Masse molaire	PKa	Solubilité	DL50
$C_{13}H_{18}O_2$	206,2808 ± 0,0123 g/mol	4,54	Dans l'eau et la plupart des solvants organiques.	≈1 600 mg/kg Rats oral, ≈320 mg/kg souris i.p. ≈1 300 mg/k rats subcutané

2. Méthodes

2.1 Culture de *Paramecium tetraurelia*

Paramecium aurelia ont été cultivées au Laboratoire Toxicologie Cellulaire de l'Université d'Annaba (Algérie). Selon la méthode de Benbouzid *et al.*, (2012), l'isolement d'une seule cellule a d'abord été effectué, ce qui nous a permis d'obtenir des populations à partir de cellules uniques autogames. Les cellules ont été cultivées ensuite dans un milieu de culture ajusté avec 50 µm de Calcium, et 0,4mM de Na+. Une colonie de *Klebsiella pneumoniae* est ensuite additionnée au milieu de culture à pH 6.5 et une température de 25± 1 ºC. Avec une photopériode de 14h de lumière et 10h d'obscurité (Boulassel *et al.*, 2013). Les cellules sont repiquées tous les trois jours pour maintenir une bonne culture et pouvoir utiliser donc la phase exponentielle de croissance.

2.2 Conduite à l'essai

Nous avons utilisé (2, 4,6, et 8) µM de paracétamol et d'ibuprofène que nous avons ajouté à 10 ml de milieu de culture, avant l'ensemencement des paramécies. Le Paracétamol et l'Ibuprofène sont testés sur des aliquotes de 10 ml de la culture.

2.3 Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des paramécies a été effectuée par comptage cellulaire manuel (compteur manuel) sous microscope optique (Leïca DL 1000) en fonction du temps selon la méthode de (Bouaricha ,2013). La cinétique de croissance commence dés la mise en contact des paramécies avec les xénobiotiques L'observation microscopique est réalisée sous microscope photonique au grossissement 10, selon le protocole suivant :

T_{0h} → Observation microscopique + comptage de cellules

T_{1h} → Observation microscopique + comptage de cellules

↓

T_{72h} → Observation microscopique +comptage de cellules

2.4 Calcul du Pourcentage de Réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis des xénobiotiques, les valeurs positives du pourcentage de réponses indiquent une inhibition de la croissance tandis que celle négatives une stimulation de la croissance (wong et *al.*, 1999).

Le Pourcentage de Réponse est basé sur l'équation suivante :

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

Ou :

N_C : Nombre de cellules témoins

N_E : Nombre de cellules traitées

2.5 Taux de mortalité

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

$$\frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\bar{X}} \times 100$$

X = Nombres de cellules vivantes témoins

Y = Nombre de cellules vivantes traitées

2.6 Taux de malformations

L'évaluation des malformations est effectuée par observation microscopique des paramécies témoins et traitées au grossissement x 100 selon la méthode de Azzouz (2012). Les paramètres pris en compte sont les changements de forme et L'apparition de bourgeonnements au niveau de la membrane.

2.7 Nombre de vacuoles digestives

La détermination du nombre de vacuoles digestives est effectuée après une coloration au rouge neutre selon la méthode de Rouabhi *et al* (2006). Elle consiste à compter le nombre de vacuoles digestives chez des paramécies placées entre lames et lamelles sous microscope (Leïca DL 1000) au grossissement x10.

3. Résultats

3.1 Effet du paracétamol et de l'ibuprofène sur la croissance

Les courbes de croissances nous permettent d'avoir des données quantitatives et une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée. Toutes les mesures sont effectuées pendant la phase exponentielle de croissance.

- **Effet du paracétamol**

La figure (10) représente l'évolution du nombre de cellules, en fonction du temps, traduisant ainsi les variations de la croissance cellulaire. On observe que dès la mise en contact du xénobiotique avec les cellules et jusqu' 'à 1h de traitement le nombre de cellules témoins et traitées évoluent de manière similaire.

Au delà d'1h de traitement au paracétamol, nous constatons une différence dans l'évolution de la courbe de croissance ; cette différence s'intensifie en fonction du temps et à partir de 6h de traitement (durant la phase exponentielle de croissance, nous constatons une inhibition très hautement significative et dose dépendante de la croissance ($p \leq 0{,}001$) des paramécies traitées aux plus fortes concentrations (6 et 8 µM) par rapport aux témoins.

Après 48h de traitement, la croissance des paramécies traitées avec les concentrations (4, 6 et 8) µM de Paracétamol est totalement inhibée.

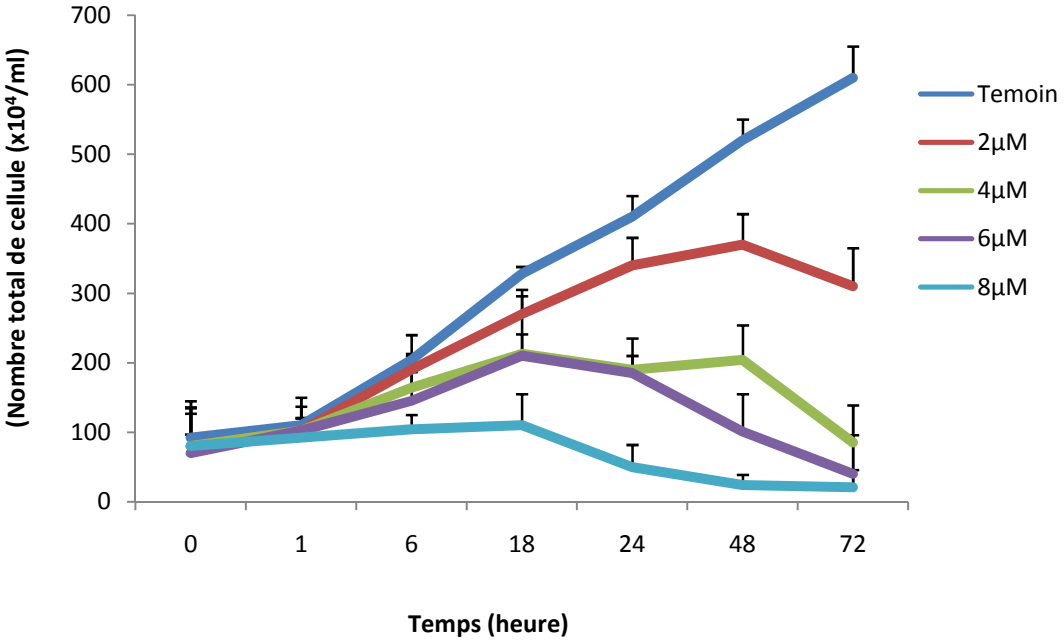

Figure 10 : Cinétique de la croissance des paramécies traitées au paracétamol.

- **Effet de l'Ibuprofène :**

La figure (11) représente l'effet de l'Ibuprofène sur l'évolution de la croissance des paramécies en fonction du temps. Nous constatons que dès la mise avec l'Ibuprofène, le nombre de paramécie diminue de manière très hautement significative et dose dépendante ($p \leq 0,001$) par rapport aux témoins. Cette diminue se poursuit en fonction du temps, elle est plus marquée pour les plus fortes concentrations

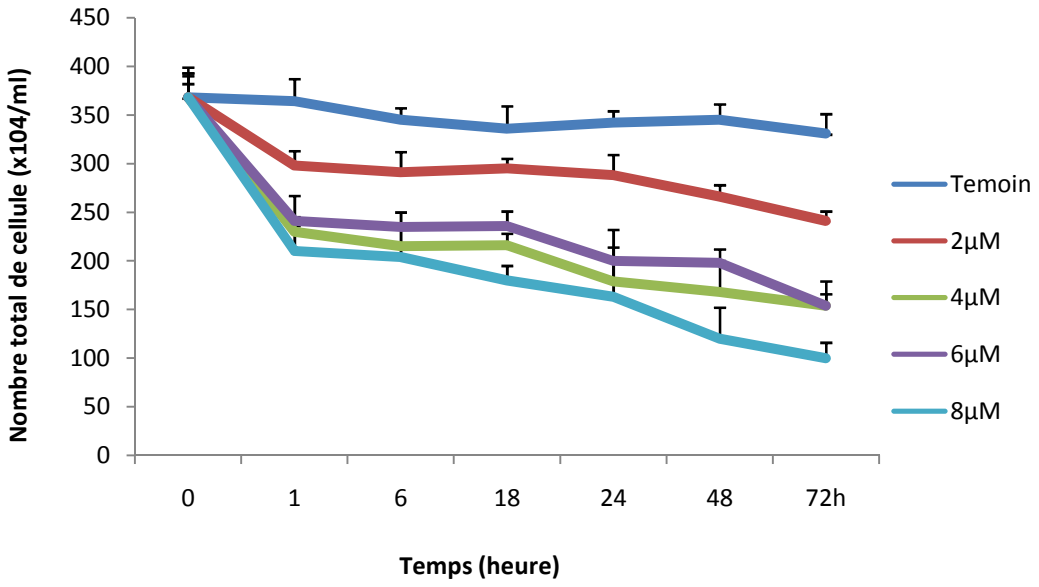

Figure 11 : Cinétique de la croissance des paramécies traitées à l'ibuprofène.

3.2 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur le pourcentage de réponse (PR)

Le pourcentage de réponses (Wong *et al.* ,1999) est un paramètre permettant d'évaluer l'effet des xénobiotiques sur la viabilité des paramécies et confirmer ainsi l'évolution de la cinétique de croissance.

- **Effet du Paracétamol**

La figure (12) illustre le pourcentage de réponse des paramécies traitées par les concentrations croissantes de paracétamol.

On remarque que le pourcentage de réponse est positif pour toutes les concentrations de Paracétamol testées, cette inhibition est dose dépendante. Ainsi, Il est de 38.26% pour la concentration 2 µM et atteint 88.26 % à la concentration 8µM.

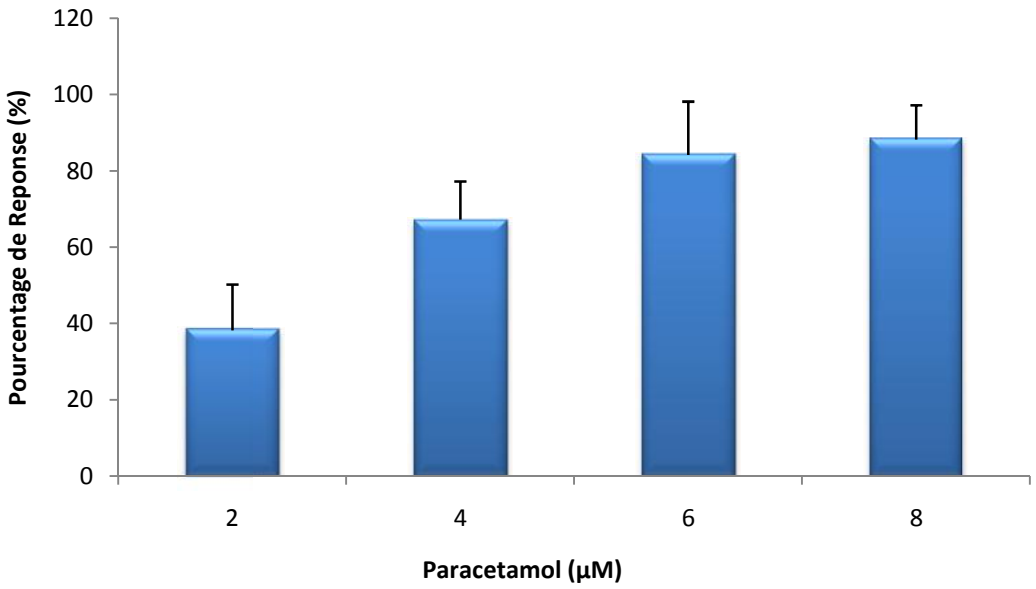

Figure 12: Pourcentage de Réponse des paramécies traitées avec des concentrations croissantes de paracétamol

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (13) illustre le Pourcentage de réponse des cellules soumises aux concentrations de 2,4, 6, et 8µM d'ibuprofène.

Nous constatons que le pourcentage de réponse est positif pour toutes les concentrations de l'Ibuprofène testées, cette évolution est dose-dépendante puisqu'il est de 11% à la concentration de 2µM pour atteindre 90.3% pour la plus forte concentration de 8µM.

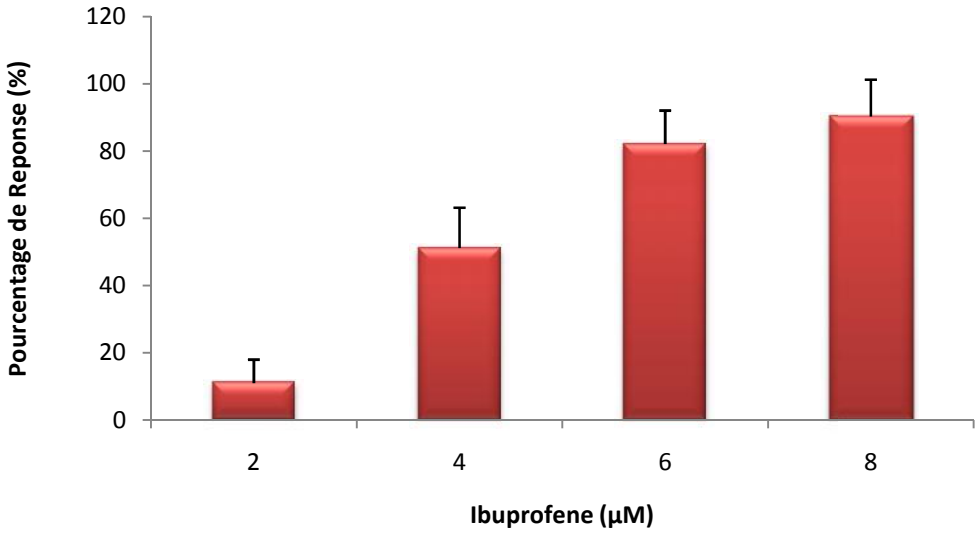

Figure 13 : Pourcentage de Réponse des Paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène.

3.3 Evaluation du taux de mortalité :

- **Effet du Paracétamol**

Le tableau (04) illustre l'évolution du taux de mortalité des paramécies en présence de concentrations croissantes de Paracétamol.

Nous remarquons qu'après 1h de traitement, le taux de mortalité des paramécies augmente pour atteindre 4.2% pour les traitées avec la concentration de 6µM. Cette augmentation est dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$)

Après 72h de traitement le taux de mortalité avoisine les 16.35 % pour les paramécies traitées avec la plus forte concentration (8µM).

Tableau (04) : Evolution du taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps

Paracétamol (µM) / Temps (heures)	2	4	6	8
1	0	2±2	4.2 ±3	10±1.1
6	0.3 ±0.70	3.80±2.20	4.76±2.38	12.64±9.22
18	1.31±1.33	4.36±0.66	5.25±6.25	19.25±6.50
24	3.21±0.10	5.36±1.33	8.95±5.35	20.25±1.25
72	4.25±1.25	6.21±4.21	9.25±2.25	26.35±6.35

- **Effet de l'ibuprofène**

Le tableau (05) met en évidence l'évolution du taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Ainsi nous remarquons que le taux de mortalité chez les cellules traitées est de 4.15 % après 72h d'exposition au médicament à la concentration de 2µM. Ce taux augmente de manière dose dépendante pour atteindre la valeur de 25.45 ± 4.25% chez les cellules traitées avec 8µM après 72h.

Tableau (05) : Evolution du Taux de mortalité chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène en fonction du temps :

Ibuprofène (µM) / Temps (heures)	2	4	6	8
1	1±0.25	1 ±2.73	2.25 ± 2.26	15.54 ± 4.6
6	1.50 ± 4.30	1.80 ± 6.20	2.9. ± 3.78	16.64 ± 2.12
18	3.11 ± 3.43	4.66 ± 2.45	5.25 ± 4.25	18.45 ± 5.35
24	4.08 ± 5.40	6.25 ± 3.73	7.15 ± 3.25	20.22 ± 3.75
72	4.15 ± 5.30	6.11 ± 1.51	7.64 ± 4.64	25.45 ± 4.25

3.4 Modifications morphologiques

3.4.1 Taux de malformations

Après exposition des paramécies aux concentrations croissantes de Paracétamol et d'ibuprofène. Observées au MO, les paramécies témoins ont des formes normales allongées avec un déplacement selon une trajectoire bien définie. En revanche les paramécies traitées présentent des invaginations au niveau de leur membrane ces anomalies de formes (figure 15) , dont le nombre augmente de façon hautement significative ($p \leq 0.01$) sont dose-dépendantes et ceci pour les deux xénobiotiques testés. La figure (16) indique une perforation et une dissolution de la membrane plasmique d'une paramécie traitée.

Figure 14: Observation microscopique d'une paramécie témoin

Figure 15 : Malformation et formation de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique d'une paramécie traitéesavec 8µM de Paracétamol.

Figure 16 : perforation et dissolution de la membrane plasmique d'une paramécie traitée avec 8µM d'Ibuprofène.

- **Taux de malformations induites par le Paracétamol :**

La figure (17) met en évidence le taux de malformations en présence de concentrations croissantes de Paracétamol. Nous remarquons que le traitement par le Paracétamol induit l'apparition de malformations au niveau membranaire. L'intensité de ces malformations est hautement significative ($P \leq 0.01$) et tend à augmenter de façon dose dépendante. Ainsi environ 40% des paramécies traitées avec 8µM de Paracétamol présentent des malformations.

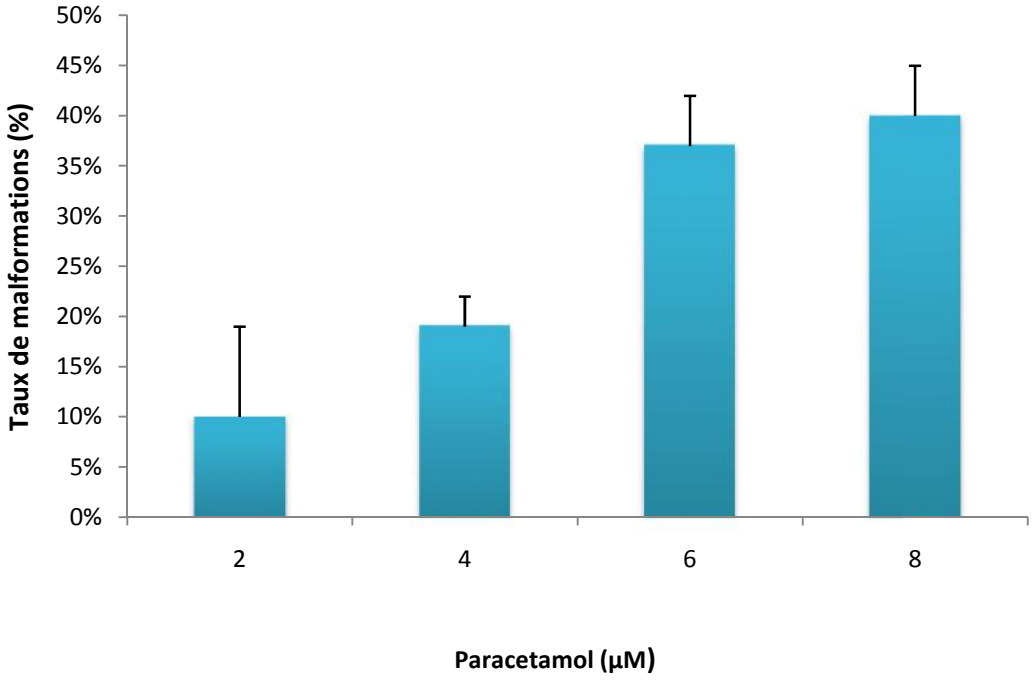

Figure 17: Taux de malformations induites chez les paramécies par les concentrations croissantes de Paracétamol

- **Taux de malformations induites par l'Ibuprofène**

La figure (18) met en évidence l'évolution du nombre de malformations chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nous remarquons le nombre de paramécies présentant des malformations augmente de manière hautement significative ($p \leq 0.01$) et dose-dépendante.

Ainsi nous constatons un taux de malformations de plus de 50% pour les paramécies traitées avec la concentration de 8µM d'Ibuprofène.

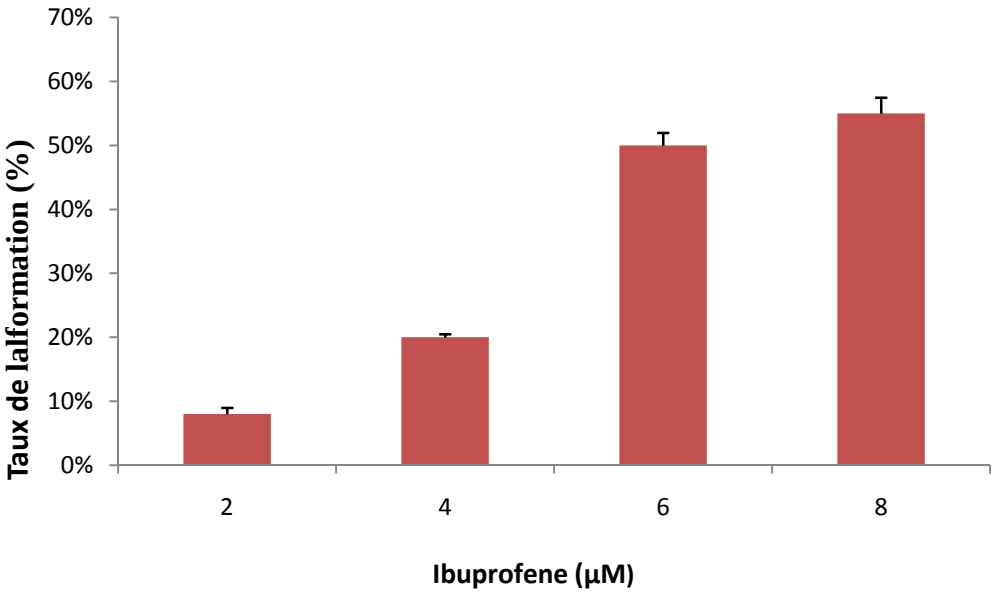

Figure 18 : Evolution du taux de malformations chez les paramécies traitées par des concentrations croissantes d'Ibuprofène.

3.4.2 Evolution du nombre de vacuoles digestives après exposition au Paracétamol et à l'Ibuprofène

La figure (19) représente la coloration des vacuoles digestives par le rouge neutre

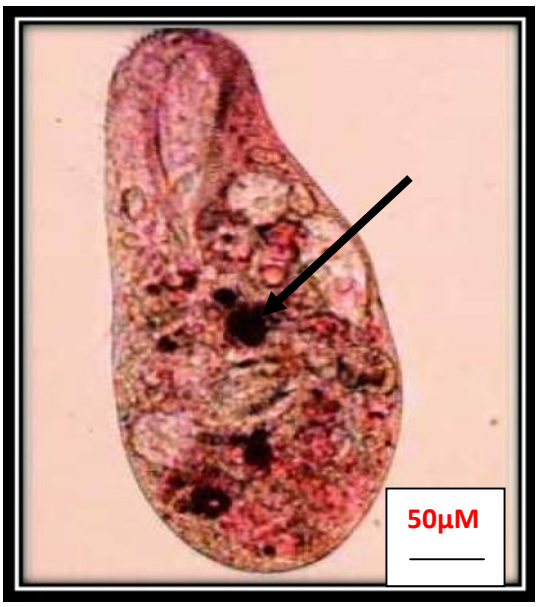

Figure 19: Coloration des vacuoles digestives au rouge neutre

- **Effet du Paracétamol**

La figure (20) met en évidence l'évolution du nombre de vacuoles chez les cellules traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol.

Nous remarquons une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) et dose-dépendante du nombre de vacuoles chez les cellules traitées par rapport aux témoins. Ainsi, nous avons mis en évidence environ 7à 10 vacuoles chez les témoins alors qu'elles ne sont que de 4 chez les traités par la concentration de 4uM et ne dépassent pas 2 chez les traitées à la plus forte concentration 8uM du xénobiotique.

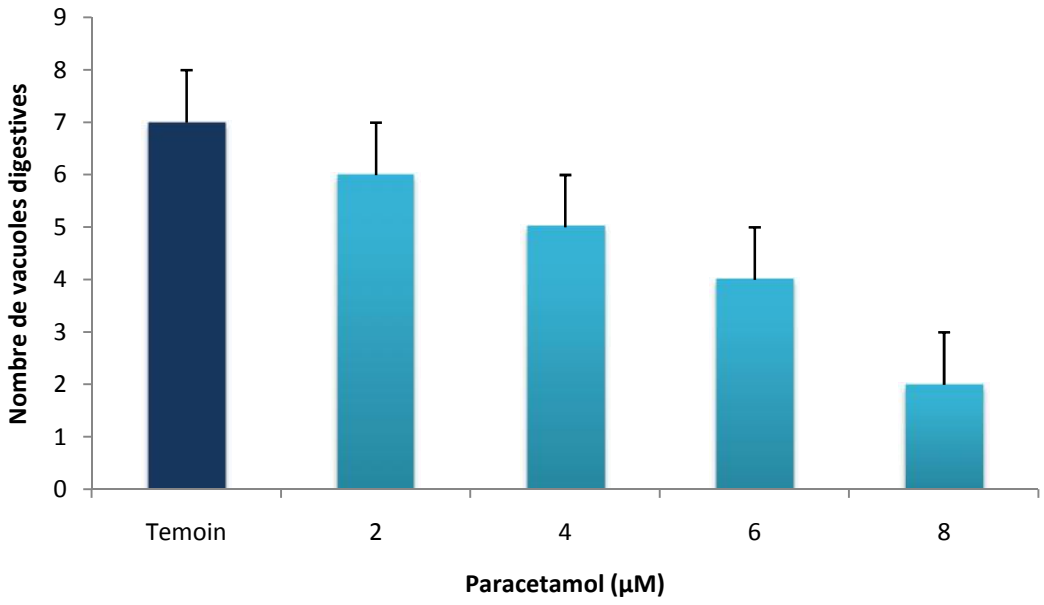

Figure 20 : Evolution du nombre de vacuoles digestives chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol

- **Effet du l'Ibuprofène**

La figure (21) représente le nombre de vacuoles digestives présentes chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène.

Nous constatons une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) et dose-dépendante du nombre des vacuoles par rapport aux témoins. Ainsi le traitement à la concentration 8uM induit une diminution de l'ordre de 80% par rapport aux paramécies témoins.

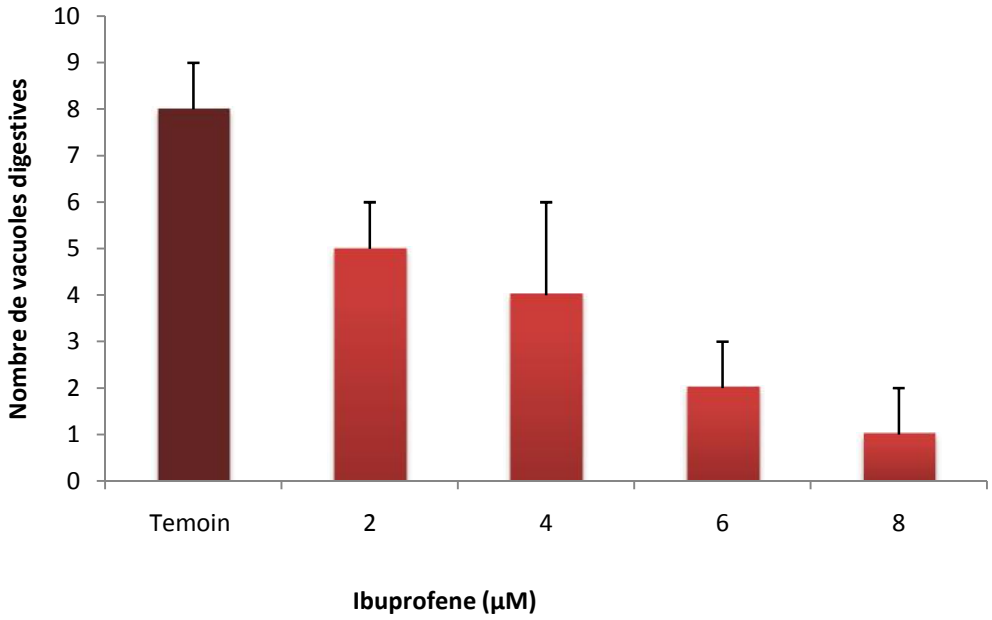

Figure 21 : Evolution du nombre de vacuoles digestives chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène

Discussion

L'avantage majeur d'utiliser des protozoaires est bien sûr le fait que ce sont des eucaryotes unicellulaires. Ils possèdent donc des systèmes biologiques comparables à ceux des animaux supérieurs, tel un noyau, une mitochondrie, un cytosquelette… etc et leurs réponses vis à vis des produits toxiques peuvent être similaires à celles des organismes pluricellulaires. Pour cibler la toxicité aiguë *in vivo* des produits pharmaceutiques, l'utilisation de cellules en culture s'avère être un choix incontournable (Fent *et al.,* 2006)

D'un autre côté, la présence de résidus de médicaments dans l'environnement et dans les eaux de surface particulièrement suscite plus d'intérêt. Ainsi, la régénération des polypes du cnidaire *H. vulgaris* a été observée en présence de Diazepam, Digoxine ou encore l'Amlodipine après 17 jours d'exposition à une concentration de 10 µg/l (Pascoe *et al*. 2003).

Fong (1998) a montré que la fluvoxamine (un antidépresseur) induisait la parturition chez la moule : la sérotonine étant impliquée dans les phénomènes de reproduction chez certains invertébrés. Les ISRS (inhibiteurs spécifiques de recapture de la sérotonine) pourraient donc agir comme des perturbateurs endocriniens sur certains invertébrés, notamment les mollusques.

Une étude menée sur les poissons portant sur les effets de l'Ibuprofène sur la reproduction d'*Oryzias latipes* rapporte qu'une exposition de 6 semaines à des concentrations supérieures ou égales à 1 µg/l d'Ibuprofène provoque une diminution du nombre de jours de ponte parallèlement à l'augmentation du nombre d'oeufs pondus par jour de ponte ; le nombre d'œufs pondus au final restant équivalent (Flippin *et al.*, 2007) . Enfin, Henry et Black (2008) rapportent que la Fluoxétine peut altérer le développement sexuel de la Gambusie.

De plus selon Ferrari *et al*. (2004), les cyanophytes sont très sensibles à la présence de l'acide Clofibrique et du Diclofénac dans leur milieu, alors que les diatomées le sont vis-à-vis des Carbamazépines et du Propranolol. Johnson *et al.* (2005) a montré la sensibilité des algues

telles que *Chlorella vulgaris* ou encore*P. subcapitata, S. acutus et S. quadricauda*), vis àvis des antidépresseurs.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la toxicité de deux molécules utilisées largement comme antipyrétiques et analgésiques : le Paracétamol et l'Ibuprofène sur un modèle biologique alternatif à savoir la paramécie. Pour cela nous sommes intéressés en premier lieu à l'effet de ces deux xénobiotiques sur la croissance cellulaire qui est un paramètre qui rend réellement compte de la toxicité d'un xénobiotique (Sauvant *et al.,* 1999; Perez-Rama,2001),et par conséquent le taux de mortalité ainsi que sur les éventuelles modifications morphologiques que pourraient induire les deux xénobiotiques testés .

Le traitement par le Paracétamol et l'Ibuprofène, a inhibé la croissance cellulaire ce qui a provoqué en premier lieu par une déplétion importante du nombre de cellules et ce dès les premières heures de traitement. Nos résultats sont en accord avec ceux de Cleuvers,(2003) qui a montré que l'Ibuprofène inhibe la croissance de *Desmodesmus subspicatus* à la concentration de 315 mg/L et immobilise les *Daphnia magna* à 108 mg/L. cet effet des deux xénobiotiques sur la croissance cellulaire, est renforcé par le pourcentage de réponse (Wong *et al.,* 1999). Nos résultats sont en accord avec ceux de Bouricha *et al* .,(2013) qui ont étudié la toxicité du Proclaim (biopesticide) sur les paramécies et ceux de Sbartai *et al* (2009) qui ont testé l'effet du Bifenazate et de l'indoxacarbe (pesticides) et qui ont mis en évidence l'importance du facteur -croissance des paramécies- en toxicologie cellulaire ainsi que le pourcentage de réponse qui apporte en amont une indication sur la toxicité des xénobiotiques en général.

Ayant mis en évidence une inhibition de la croissance cellulaire, il nous a semblé judicieux de nous intéresser au taux de mortalité des paramécies exposées aux deux xénobiotiques. Nos résultats ont mis en évidence que ces derniers sont à l'origine d'une forte mortalité en accord avec ceux de Quinn *et al* (2008) et Kim *et al (*2009) qui ont montré que l'Ibuprofène tue 50 % des *Thamnocephalus platyurus*, des *Hydra attenuata* et des *Oryzias latipes* respectivement aux concentrations 19 mg/L, 22 mg/L et plus de 100 mg/L.

Richards *et al.*,(2008) ont évalué en mésocosme les effets de l'Ibuprofène, la Fluoxétine et la Ciprofloxacine sur le phytoplancton, le zooplancton, les algues, une communauté benthique et des juvéniles de poissons après une exposition de 35 jours. Le phytoplancton et le zooplancton ont été affectés à partir des concentrations moyennes

(60-110 µg/l) par une diminution de leur diversité, une réduction de la croissance des algues ainsi qu'une importante létalité chez les poissons aux plus fortes et moyennes concentrations (600-100 µg/l). En revanche, selon Kolpin *et al.*,(2002) et Richard *et al.*,(2008), Les concentrations maximales d'Ibuprofène, de Fluoxétine et de Ciprofloxacine détectées aux Etats-Unis sont respectivement de 1; 0.012; 0.03 µg/l dans les eaux de surface, selon ces auteurs , ces concentrations n' affecteraient pas négativement les communautés aquatiques.

Dans notre travail, en plus de l'inhibition de la croissance, nous avons mis en évidence des modifications morphologiques des paramécies en présence des deux xénobiotiques, et d'un autre coté la diminution du nombre de vacuoles digestives. Le cytosquelette assure une certaine rigidité à la cellule et sert à la fixation des organites. Il gouverne les mouvements internes dans la cellule tels que le déplacement des chromosomes et des organites cellulaires comme les mitochondries ou le noyau. De même, le cytosquelette gouverne les déformations de la membrane cellulaire. **Cette interaction cytosquelette-membrane peut être altérée sous l'effet de certains agents physiques ou chimiques, générant des dommages structuraux au niveau de la membrane et le cytosquelette** (Stevens et Lowe, 1997). Ces effets se traduisent par des changements de formes et par l'apparition de bourgeonnements au niveau de la membrane plasmique conduisant à la mort cellulaire (Friedl, 2003). Dans notre travail, nous avons mis en évidence la présence de bourgeonnements ainsi qu'une irrégularité du pourtour cellulaire sous l'effet des deux xénobiotiques en accord avec les travaux de (Stevens et Low 1997) ainsi que ceux de Azzouz (2012).

Concernant la diminution du nombre de vacuoles, ceci pourrait s'expliquer par le déclenchement d'un système de défense chez les paramécies, en rapport avec le trichocyste, et le phénomène d'exocytose qui est un processus cellulaire qui permet la sortie vers le milieu extracellulaire de produits synthétisés dans la cellule. C'est la dernière étape d'un processus biologique complexe appelé voie de sécrétion (Cohen, 2005). Nos résultats sont en accord avec ceux de Venkateswara Rao *et al*., (2006) qui ont démontré que l'exposition de *Paramecium caudatum* à l'Acephate provoque des ruptures des vacuoles et par conséquent l'augmentation du volume cellulaire, conduisant à la lyse cellulaire d'où l'augmentation du taux de mortalité cité auparavant.

Introduction

Un des domaines où il y a eu très peu de recherches effectuées jusqu'à présent mais où réside beaucoup de potentiel, est l'étude des effets des produits toxiques au niveau moléculaire, plus spécifiquement sur la synthèse des protéines de stress. Tous les produits toxiques causent des dommages aux cellules. À une concentration sublétale, les toxiques ne causent pas de mortalité mais permettent ainsi aux cellules de combattre ces effets toxiques en synthétisant des protéines de stress.

- **Objectif du travail**

Afin de mieux comprendre l'effet des deux médicaments (Paracétamol et Ibuprofène) sur les paramécies, nous nous sommes intéressés à l'évolution des principaux métabolites cellulaires à savoir, (protéines, lipides et glucides), qui en plus de leur rôle comme élément constitutif de la membrane plasmique, participent dans le métabolisme globale de la cellule , nonobstant le rôle des enzymes (protéines). Aussi, toute altération aussi minime soit-elle d'un de ces éléments aura des conséquences sur le comportement des paramécies .

L'autre volet de ce chapitre concerne l'étude polarographique qui nous permettra de suivre les effets des deux médicaments sur le métabolisme respiratoire des paramécies et par conséquant la consommation d'O2 qui pourrait rendre compte de l'implcation des monoxygénases dans le processus de biotransformation/metabolisation.

1. Méthodes

1.1 Dosage des métabolites

L'extraction des métabolites dés paramécies a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al*.(1966).

1.1.1 Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976).

1.1.2 Dosage des glucides

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de Duchateau et Florkin (1959).

1.1.3 Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972).

1.2 Etude Polarographique

1.2.1 Principe du dosage

Le suivi du métabolisme respiratoire des paramécies est effectué selon la méthode de Benbouzid *et al*(2012).

2. Résultats

2.1 Effets du paracétamol et de l'ibuprofène sur l'évolution du taux de protéines

- **Effet du Paracétamol**

Les variations du taux de protéines totales chez les paramécies témoins et traitées sont représentées dans la figure (22).

Nous constatons que chez les traités, le taux de protéines totales augmente de manière dose dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$) par rapport aux témoins particulièrement la plus forte concentration. En effet ce taux passe de 0.023 µg/ml chez les cellules témoins à 0.046 µg/ml pour la concentration de 8µM après 48h de traitement.

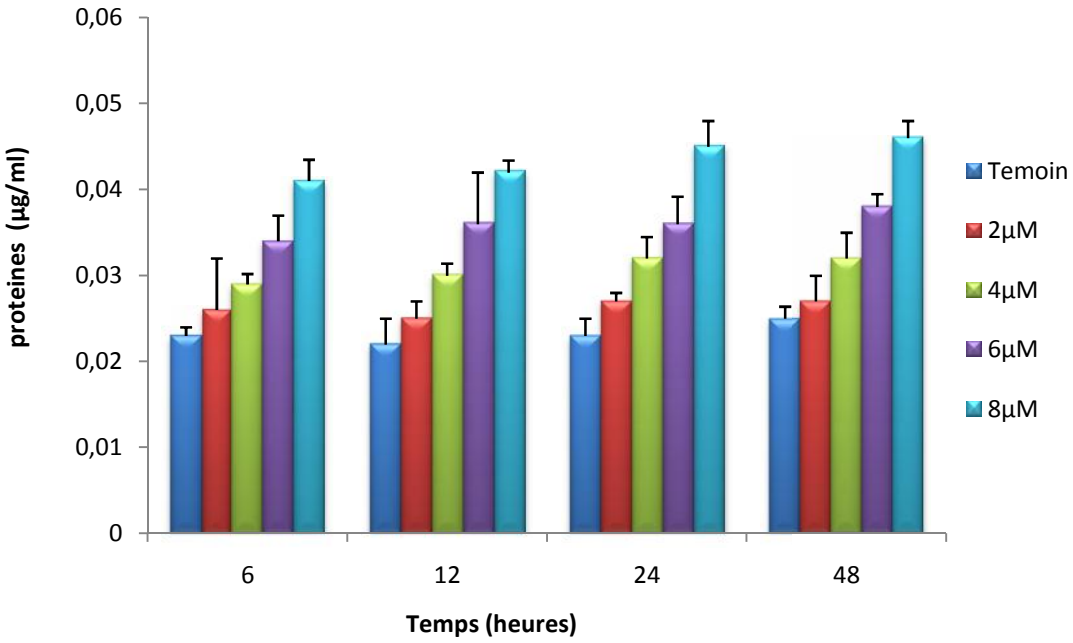

Figure 22: Effet du Paracétamol sur le taux de protéines totales en fonction du temps

- **Effet de l'Ibuprofène :**

La figure (23) représente l'évolution du taux de protéines totales en fonction de concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nous remarquons que le taux de protéines tend à augmenter de manière dose dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) par rapport aux témoins pour toute les concentrations. Au delà de 24h de traitement, une déplétion du taux de protéines est observée pour la concentration $8\mu M$ par rapport aux témoins.

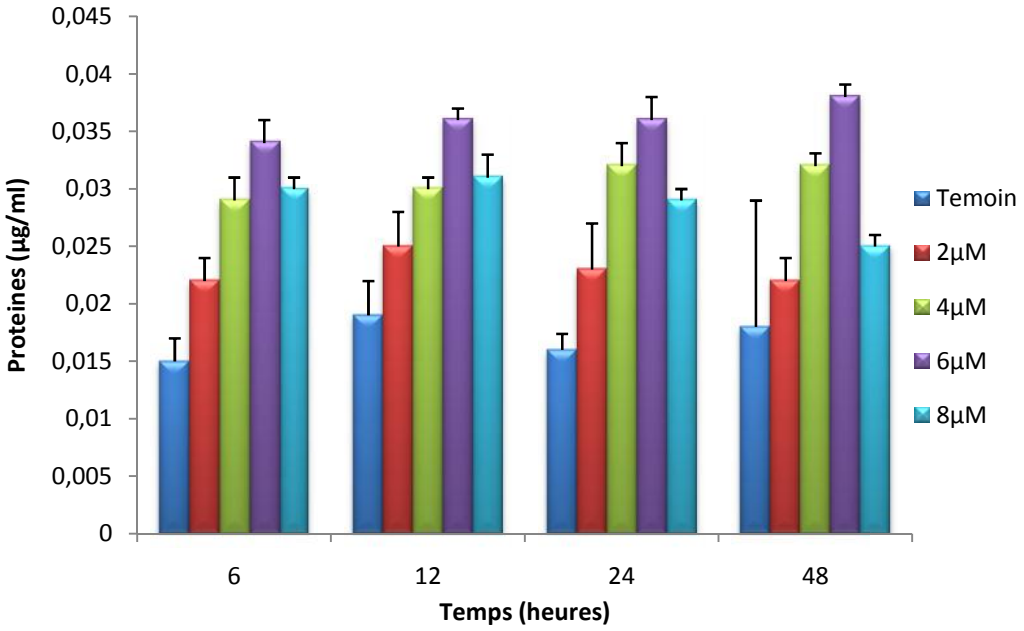

Figure 23 : Effet de l'Ibuprofène sur les taux de protéines en fonction du temps

2.2 Effets du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur l'évolution du taux de lipides

- **Effet du Paracétamol :**

La figure (24) illustre les variations de taux de lipides en fonction du temps et en présence de concentrations croissantes de Paracétamol. Nous remarquons que ce taux diminue de manière dose-dépendante et significative ($p \leq 0.05$) dès 6h de traitement pour toutes les concentrations.

Cet effet se poursuit au delà de 24h de traitement, avec une inhibition hautement significative ($p \leq 0.001$) pour les concentrations de 6 µM et 8µM. En effet le taux de lipides passe de 5.14µg/ml pour les témoins à 2.26µg/ml pour les traitées à 8µM de Paracétamol.

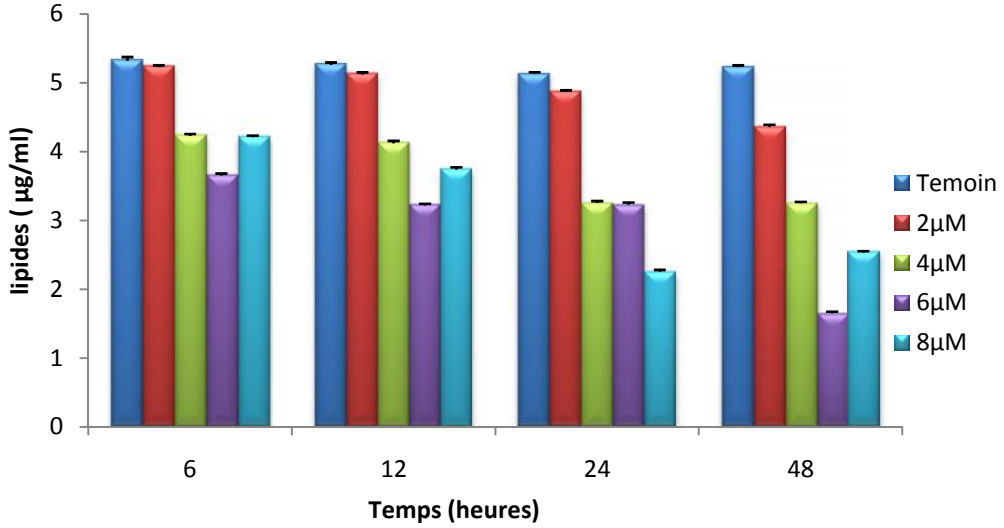

Figure 24: Effet du Paracétamol sur le taux de lipides en fonction du temps.

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (25) illustre les variations du taux de lipides chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nous constatons que le taux de lipides diminue de manière très hautement significative ($p \leq 0.001$) pour les doses les plus élevées (6 µM et 8 µM) et passe de 3.99 µg/ml pour les témoins à 1.25 µg/ml pour les paramécies traitées avec la concentration 8µM

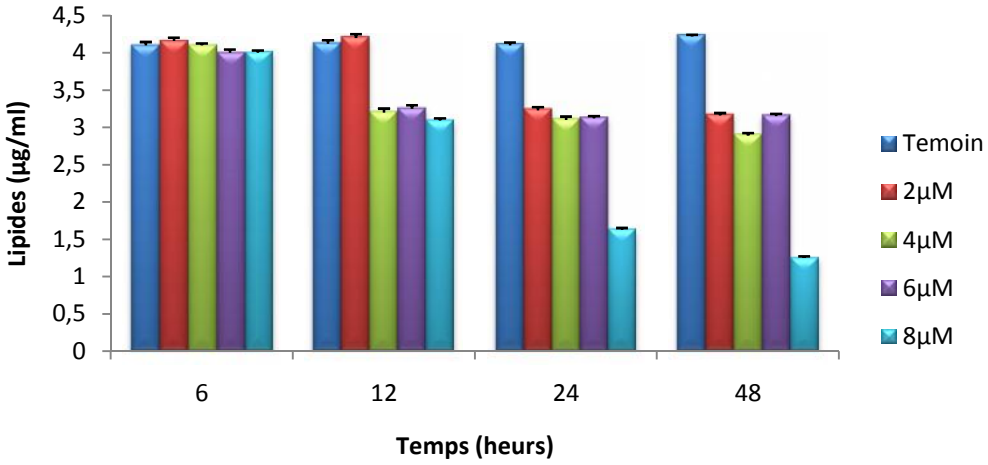

Figure 25 : Effet de l'Ibuprofène sur le taux de lipides en fonction du temps

.

2.3 Effets du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur l'évolution du taux de glucides

- **Effet du Paracétamol**

La figure (26) représente les variations du taux de glucides observées chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol. Nous constatons que ce taux diminue de manière très hautement significative pour les concentrations de 4µM et 8µM. En effet, ce taux est de 145.36 µg/ml chez les cellules témoins est diminue pour atteindre 77.23µg/ ml pour les traités avec la concentration de 8µM.

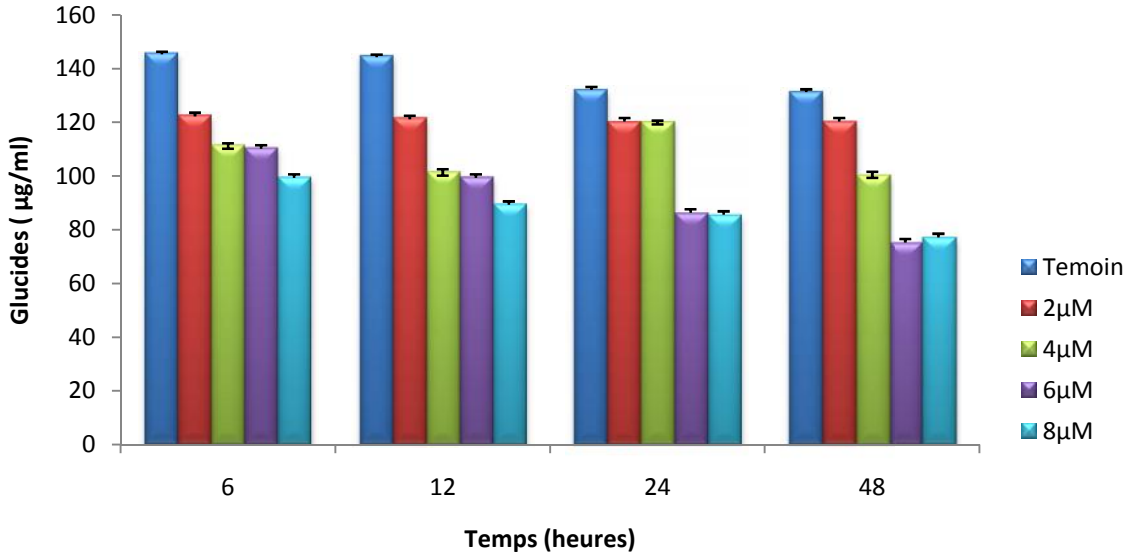

Figure 26 : Effet du Paracétamol sur lu taux de glucides en fonction du temps.

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (27) illustre l'évolution du taux de glucides chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nos résultats mettent en évidence une diminution significative ($p \leq 0.05$) et dose-dépendante du taux de glucides chez les paramécies traitées par les différentes concentrations d'Ibuprofène par rapport aux témoins.

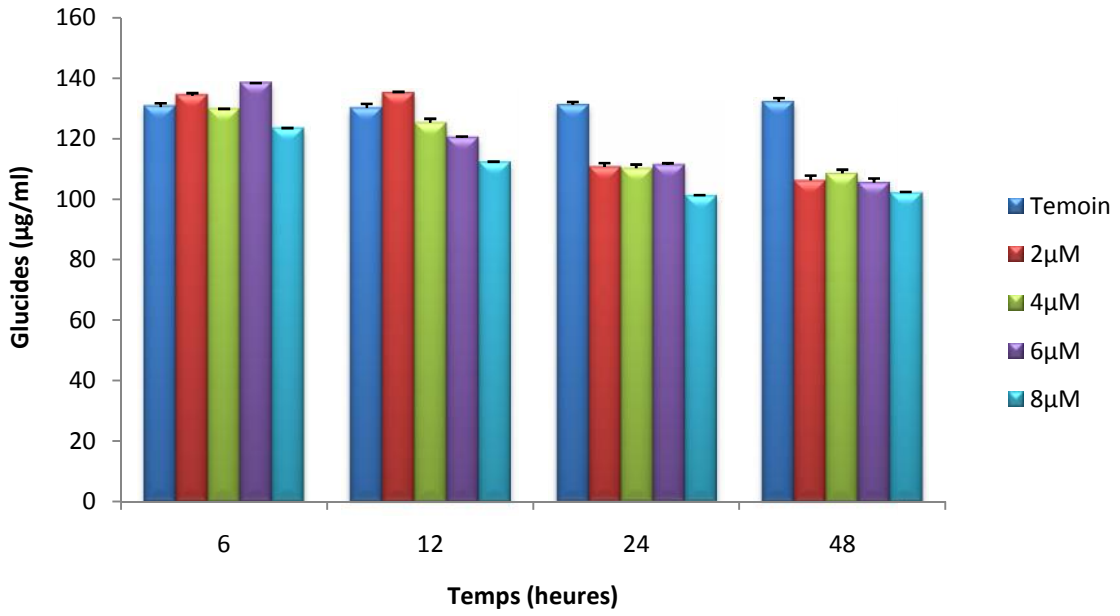

Figure 27: Effet de l'Ibuprofène sur le taux de glucides en fonction du temps.

3. Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur le métabolisme respiratoire des paramécies

- **Effet du Paracétamol**

La figure (28) illustre l'effet du Paracétamol sur le métabolisme respiratoire dès la mise en contact avec le xénobiotique (les 5 premières minutes).

Nous remarquons que contrairement aux cellules témoins qui consomment de l'oxygène d'une manière régulière et continue en fonction du temps, chez celles traitées avec les différentes concentrations de Paracétamol la consommation d'oxygène semble inhibée. Cette inhibition est dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$).

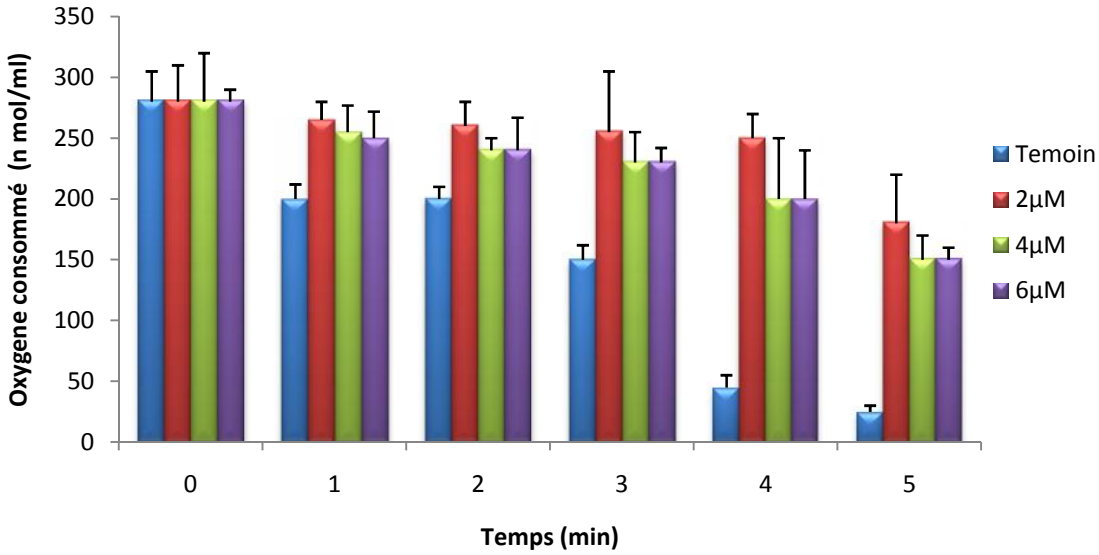

Figure 28: Effet du paracétamol sur le métabolisme respiratoire des paramécies en fonction de concentrations croissantes de Paracétamol.

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (29) illustre l'effet de l'Ibuprofène sur le métabolisme respiratoire des paramécies.

Nous remarquerons que les cellules témoins consomment l'oxygène d'une manière régulière et continue. Chez les cellules traitées par contre, la consommation d'oxygène est inhibée d'une manière hautement significative. ($p \leq 0.01$) et ce pour toutes les concentrations.

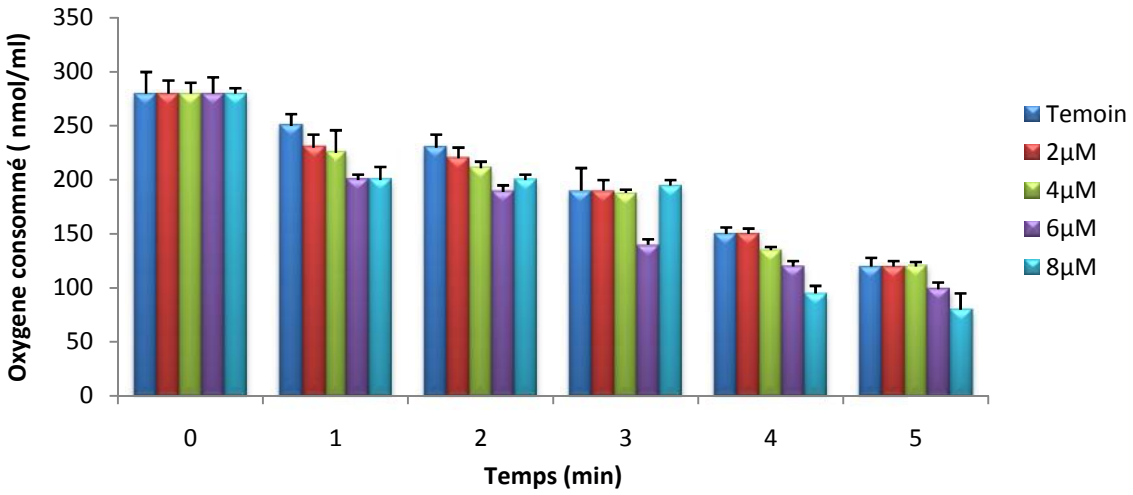

Figure 29 : Effet de l'Ibuprofène sur le métabolisme respiratoire en fonction du temps.

Discussion

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au métabolisme de base des paramécies car la cascade d'évènements ayant lieu au niveau des cellules en présence ou en absence de xénobiotiques peuvent constituer une réponse biologique en amont pouvant être considérée à juste titre comme un biomarqueur d'une cytotoxicité . Ainsi, Rouabhi *et al* (2006), Redouane-Salah (2004) ont mis en évidence une corrélation entre la perturbation du taux de protéines totales et la toxicité des pesticides chez la paramécie, il en est de même pour Grara (2011) qui a mis en évidence une forte perturbation du taux de protéines ,lipdes et glucides chez des escargots traités par des métaux lourds . Plus récemment Bebouzid(2012) a montré que chez les paramécies traitées par des pesticides le taux de protéines, lipides, et glucides étaient fortement perturbés, l'auteur explique ce phénomène par d'une part l'induction de la synthèse des protéines en rapport avec le phénomène de bioactivation/biotransformation et d'autre par part la peroxydation lipidique générée par les ROS. Nos résultats sont en parfait accord avec cités ci-dessus puisque nous avons mis en évidence une perturbation du taux de tous les métabolites (augmentation du taux de protéines totales et diminution de celui des lipides et glucides) confirmant ainsi la toxicité des deux médicaments testés particulièrement aux plus fortes concentrations.

L'autre mécanisme auquel nous nous sommes intéressés concerne le métabolisme respiratoire via le suivi de la consommation d'oxygène dans le milieu. En effet lors de la métabolisation des xénobiotiques, ces derniers passent parla phase I et la phase II de la

métabolisation et c'est durant la phase I que les xénobiotiques sont pris en charge par une batteries d'enzymes dont les Monoxygénases à CYP450 qui incorporent un atome d'oxygène au xénobiotique en vue de sa détoxication/métabolisation. En effet, Bouaricha *et al*(2013), Sbartai *et al*(2013) ou encore Bebouzid *et al*(2012) ont montré que le métabolisme respiratoire ezst un excellent bioindicateur de toxicité chez la paramécie, d'autre part, et selon Fromenty (2010), l'Ibuprofène et le Paracétamol causent des perturbations au niveau des mitochondries par l'inhibition de la β-oxydation mitochondriale des acides gras via l'inhibition d'une des enzymes impliquées dans ce processus métabolique et/ou la déplétion en L-carnitine et en coenzyme A, et par l'inhibition de la chaîne respiratoire via l'inhibition d'une des enzymes impliquées dans le transport des électrons ou la phosphorylation oxydative. Cet effet perturbateur/inhibiteur de la respiration des paramécies est ainsi confirmé par nos résultats puisque nous avons mis en évidence une inhibition- particulièrement marquée par le paracétamol- de la respiration des paramécies. Cette toxicité pourrait être due à l'effet inhibiteur de la phosphorylation oxydative ce qui laisse suggérer que chez la paramécie, ces deux xénobiotiques ont pour cible principale également la mitochondrie.

.

Introduction

Les biomarqueurs ont fait leur apparition en écotoxicologie au cours des années quatre-vingts. Initialement décrits comme la réponse d'une structure ou d'une fonction biochimique ou physiologique « normale » à la présence d'un xénobiotique, la multiplication des travaux scientifiques autour de cette thématique a engendré de nombreuses définitions de la notion de biomarqueurs (Huggett *et al.*,2002 ; Timbrell *et al.,* 1995).

Nous retiendrons ici celle énoncée par (Lagadic *et al.,* 1997) qui définissent un biomarqueur comme un changement observable et/ou meusurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance à caractère polluant. Cette définition peut être complétée de plusieurs critères regroupant les informations importantes qui permettent d'évaluer les forces et les faiblesses de différents candidats biomarqueurs (Stegeman *et al.,* 1992; Van der Oost *et al.,* 2003).

- Les méthodes de mesure des biomarqueurs doivent être sensibles, précises et simples de mise en œuvre.
- La réponse des biomarqueurs doit être rapide afin de pouvoir être considérée comme un paramètre d'alerte précoce.
- Les niveaux constitutifs et leurs variations, dues aux effets de facteurs physiologiques ou environnementaux, doivent être définis afin de distinguer la réponse induite par un contaminant de la variabilité naturelle.
- Les mécanismes qui supportent la relation entre la réponse des biomarqueurs et l'exposition aux contaminants doivent être connus. De ce fait, la notion de biomarqueurs est amenée à évaluer avec les connaissances scientifiques.
- La signification toxicologique des biomarqueurs, qui peut être décrite comme le
- le lien entre la réponse biochimique et les effets sur les organismes, doit être connue.

- **Intérêt des biomarqueurs**

Les biomarqueurs présentent donc un caractère intégrateur important qui leur confère un indéniable avantage par rapport aux méthodes chimiques ou aux méthodes biologiques basées sur la bioindication classiquement mises en œuvre pour la surveillance des écosystèmes. Ils permettent une évaluation géographique et temporelle de la contamination des milieux et des effets associés Figure (30)

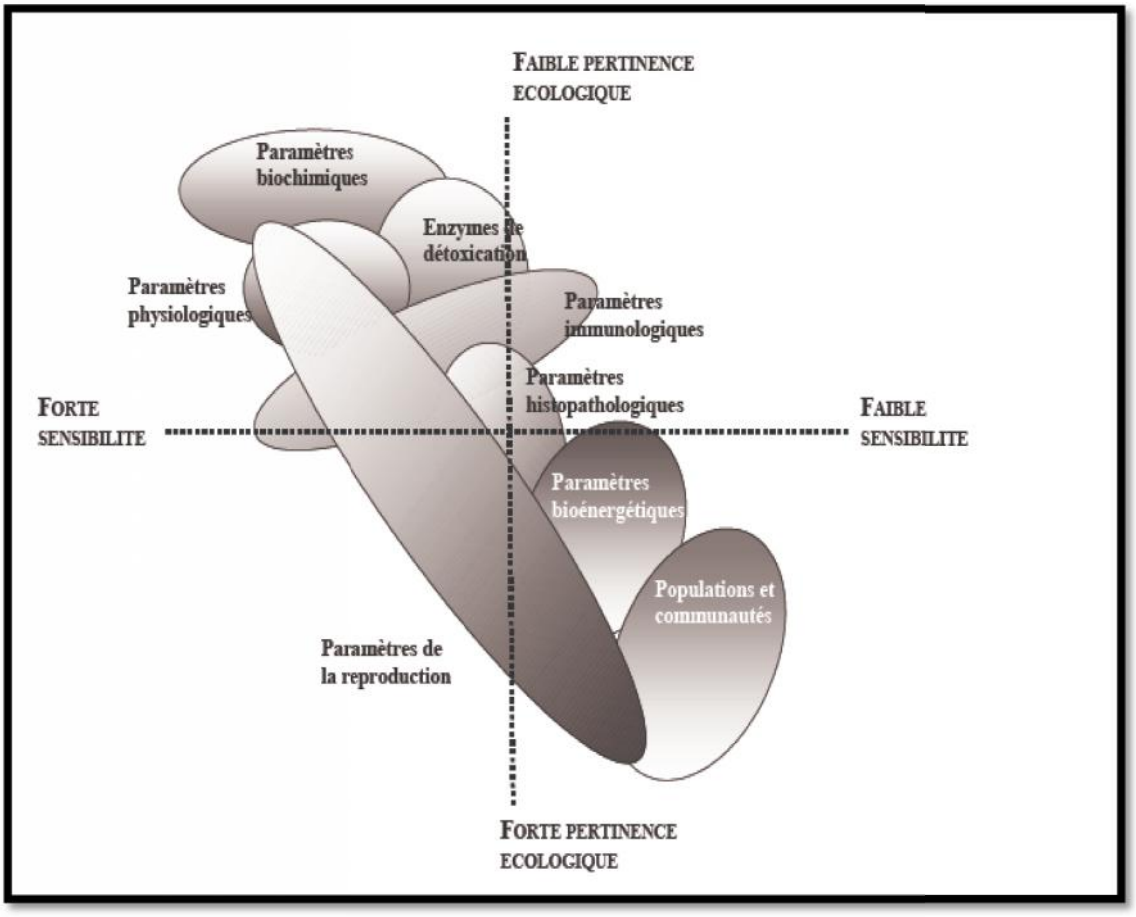

Figure 30 : Représentation théorique de la relation entre la sensibilité aux contaminants et la pertinence écologique pour différentes réponses de biomarqueurs. (Adams *et al.*,1989).

- **Objectif du travail**

L'objectif principal de ce chapitre est la mise en évidence de la toxicité des deux xénobitiques testés et du rôle joué par certains paramètres biochimiques considérés comme bio-indicateurs et ceci a travers le suivi de l'activité de certaines enzymes intervenant dans la métabolisation des xénobiotiques à l'instar de la GST et du GSH dont le rôle au cours de la Phase II de la métabolisation est indéniable ou encore taux la CAT et APX considérées à juste titre comme la première ligne de défense contre les radicaux libres oxygénés. Le taux de MDA qui est un métabolite clé de la péroxydation lipidique effet ultime de la toxicité des ROS.

1. Matériel et méthodes

Les tests sont réalisés sur des aliquotes de 50 ml d'une population dense deparamécies (environ 30000 cellules/ml) chaque mesure est répétée trois fois. Le suivi de l'évolution des biomarqueurs est effectué à différents temps de traitement.

1.1 Mesure de l'activité Catalase (CAT)

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 240nm.

L'activité Catalase (CAT) est exprimée en µmol d'H_2O_2 par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

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

X : µmoles de H_2O_2 consommées par minute et par mg de protéines

Δ Do : Différence de la Densité Optique obtenue après hydrolyse du substrat.

£: Le coefficient d'extinction est de 0,0040 m M^{-1}. Cm^{-1}

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

1.2 Dosage du taux de glutathion (GSH)

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

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} \Big/ \text{mg de protéines}$$

X : Micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM/mg de protéines).

Δ Do : 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 : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

Vh : Volume de l'homogénat utilisé dans la déproténisation : 0,8 ml

Vt : Volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB].

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

1.3 Mesure de l'activité GST (glutathion S-transférase)

L'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig *et al* .(1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH).

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 tours pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

L'activité est déterminée d'après la formule suivante

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} \Big/ \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/mn/mg de protéines).

Δ Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB.

Vt : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

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

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

1.4 Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX) :

L' activité Ascorbate-peroxydase est réalisée suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le volume réactionnel final de 3ml contient : 100µl d'extrait enzymatique, (50Mm NaK, 0.5mM ascorbate, pH= 7.2) la lecture est effectuée à 290 nm pendant 1 minute et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire, de ε = 2800M^{-1}.cm^{-1}. L'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

1.5 Dosage du taux de Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est dosé selon la méthode de Draper & Hadley (1990) basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm. Le taux du MDA est déterminé selon la formule suivante :

:

$$X = \frac{\Delta Do}{156} \times \frac{Vt}{Vs} \Big/ \text{mg de protéines}$$

X : Micromoles de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM/mg de protéines).

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

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA.

Vt : Volume total dans la cuve : 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les Complexes TBA/MDA].

Vs : Volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml.

2. Résultats

2.1 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les variations de l'activité CAT :

- **Effet du Paracétamol**

Le suivi de l'activité Catalase chez les paramécies traitées avec le Paracétamol, est représenté dans la figure (31). Nos résultats montrent que cette activité augmente chez les traitées par les concentrations croissnates du xénobiotique. Cette augmentation est t hautement significative chez les paramécies traitées avec la plus forte concentration d'Ibuprofène 6µM (P≤0, 01) et ce par rapport aux témoin après 72H de traitement.

En effet pour les paramécies traitées avec la concentration de 6 µM, ce taux .varie de 0,1µM /min/mg après 1H de traitement, à 0.18µM/min/mg de protéines, après 24H de traitement. Cependant chez les témoins, l'actvité Catalase ne subit aucune variation et ne dépasse pas 0,05 µM/min/mg de protéines.

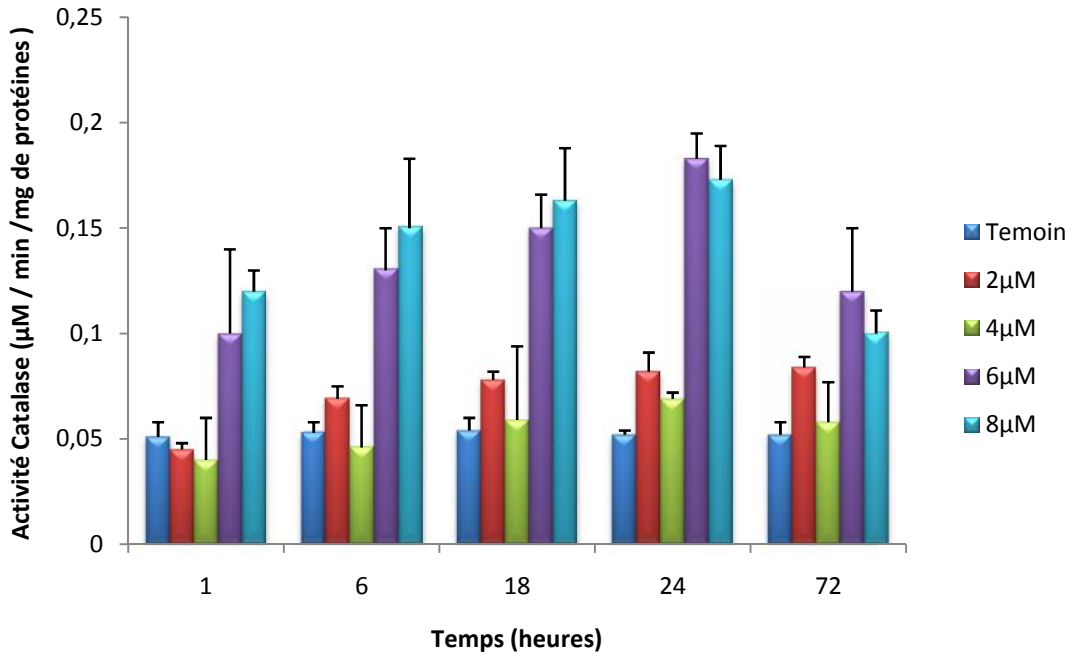

Figure 31 : **Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité Catalase chez les paramécies en fonction du temps**

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (32) illustre l'évolution de l'activité Catalase chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nous constatons que l'activité Catalase augmente de manière très hautement significative ($p \leq 0.001$) pour toutes les concentrations testées et quel que soit la durée du traitement.

En effet pour la plus forte concentration d'Ibuprofène (8µM) l'activité Catalase passe de 0,07 µM/min/mg de protéines après 1h de traitement à 0.14 µM/min/mg après 72H de traitement. Chez les témoins cette activité reste stable et ne dépasse pas 0,05 µM/min/mg de protéines.

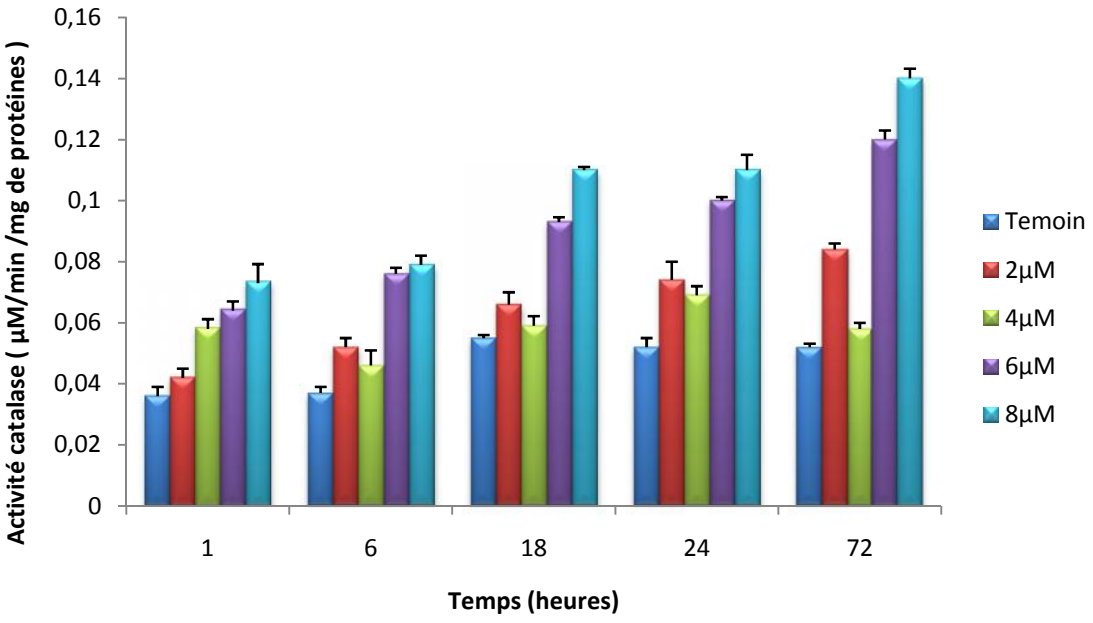

Figure 32 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'activité Catalase en fonction du temps.

2.2 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur le taux de GSH

- **Effet du Paracétamol**

La figure (33) illustre l'effet du paracétamol sur l'évolution du taux de GSH chez les paramécies témoins et traitées en fonction du temps. Ainsi nous remarquons que pour les premiers temps de traitement (jusqu'à 24H), le taux de GSH augmente d'une manière très

hautement significative par rapport aux témoins. Dans un premier temps, et plus précisément entre 1h et 18h de traitement, nous remarquons une augmentation du taux de GSH de manière dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$).

A partir de 24h de traitement nous notons une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) du taux de GSH pour la plus forte concentration de xénobiotique. En revanche, le taux de GSH reste constant chez les témoins.

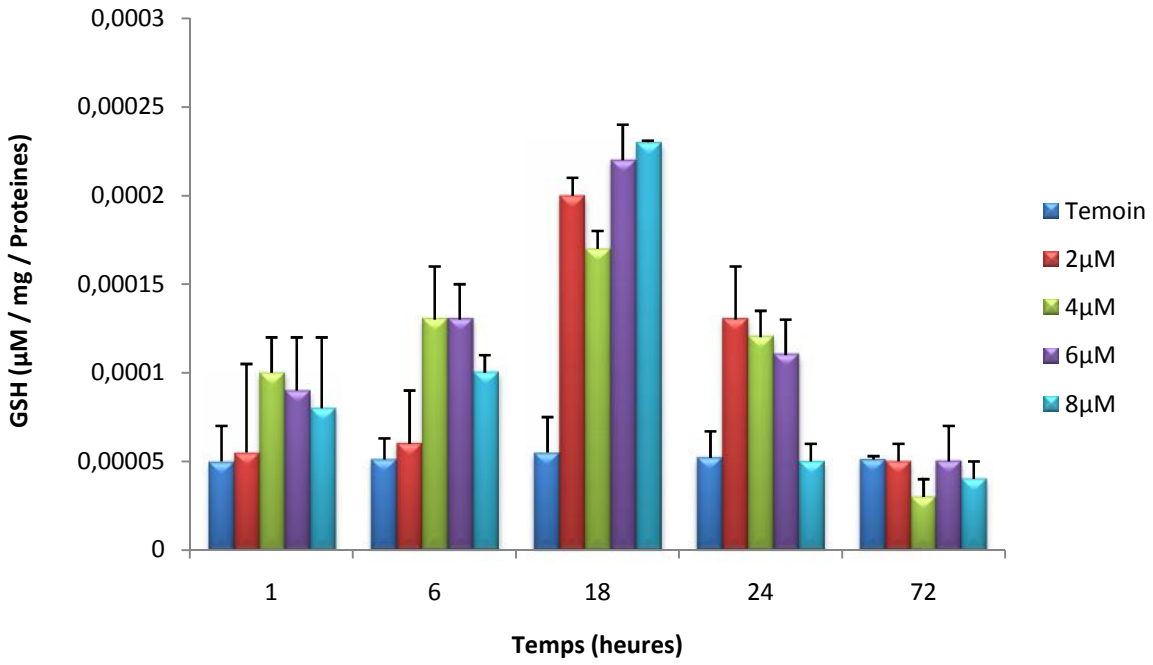

Figure 33 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur le taux de GSH chez les paramécies en fonction du temps.

- **Effet de l'Ibuprofène**

L'évolution du taux de glutathion chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène est illustrée dans la figure (34). Nous remarquons que le taux de GSH tend à diminuer de manière hautement significative ($P \leq 0,01$) dès 6H de traitement et ce par rapport aux témoins. Ainsi, à 72H de traitement, le taux de GSH, ne dépasse pas 0,022 x 10^{-3} µg/mg de protéines pour les plus fortes concentrations alors qu'il est de $0,070^{-3}$ µg/mg après 1H de traitement.

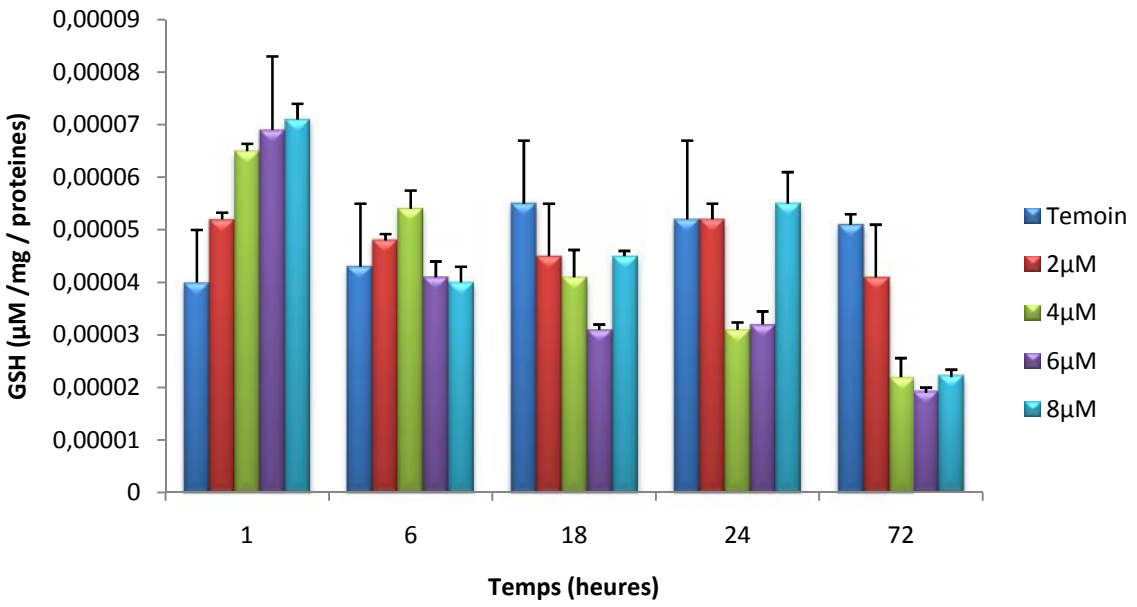

Figure 34 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'évolution du taux de GSH en fonction du temps

2.3 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les variations du taux de GST

- **Effet du Paracétamol**

L'évolution de l'activité de la glutathion-S-transférase chez les cellules témoins et traitées par des concentrations croissantes de Paracetamol est illustrée dans la figure (35).

Nous constatons une augmentation hautement significative de l'activité de GST ($p \leq 0.01$) cette augmentation est progressive et atteint son maximum après 18H de traitement particulièrement pour les traités avec la plus forte concentration de Paracétamol où l'activité GST est d'environ 1,7 µM/min/mg de protéines alors que celle des traitées avec la plus faible concentration est de 1,3 µM/min/mg de protéines et celle des témoins ne dépasse pas 0,8 µM/min/mg toujours au temps 18H.

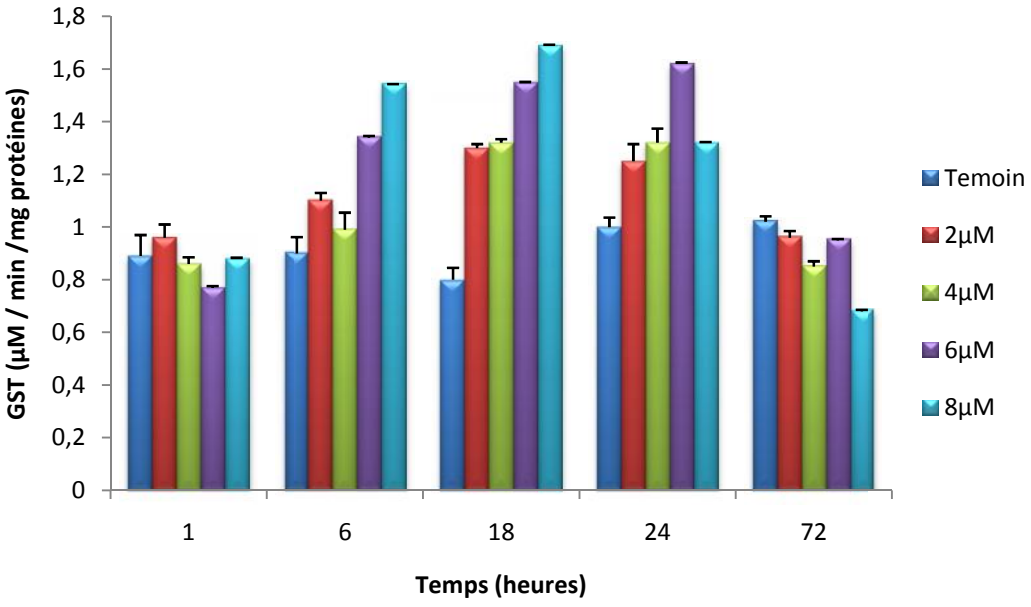

Figure 35 : Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité GST chez les paramécies en fonction du temps

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (36), illustre l'évolution de l'activité GST chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nos résultats mettent en évidence une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) de cette activité aux temps 6 et 18 h de traitement par rapport aux témoins. Au temps 24H et après une diminution de cette activité, nous remarquons une induction dose-dépendante et hautement significative de l'activité GST après 72H de traitement. Néanmoins cette évolution de l'activité GST évolue de manière inversement proportionnelle à celle du taux de GSH.

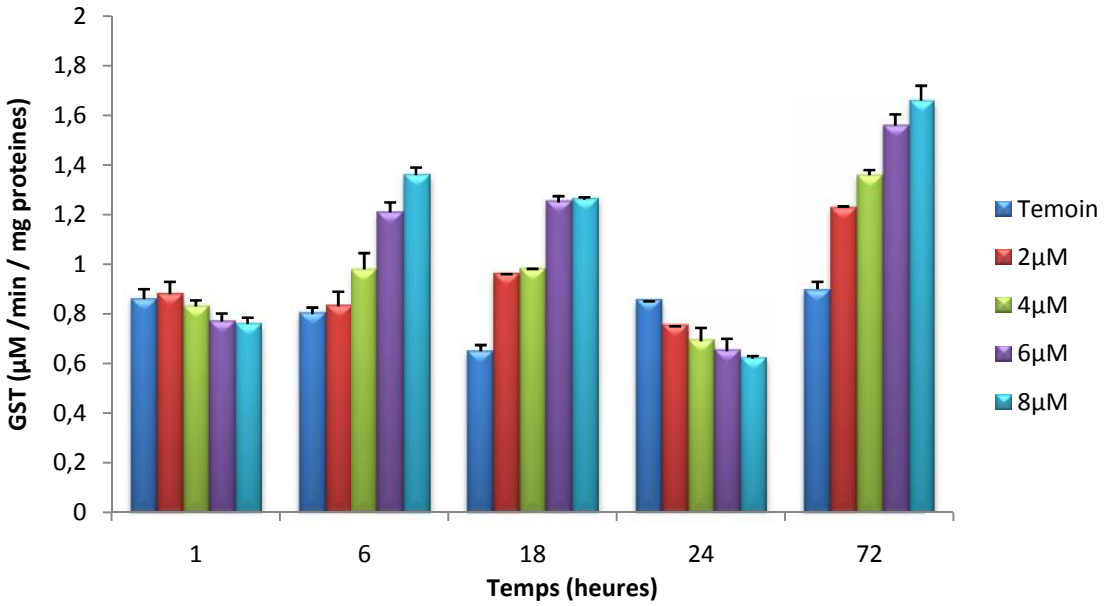

Figure 36 : Effet de concentrations croissantes d'lbuprofène sur l'activité GST des paramécies en fonction du temps.

2.4 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur l'évolution de l'activité APX

- **Effet du Paracétamol**

La figure (37) illustre l'évolution de l'activité APX chez les paramécies témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracetamol. Nous remarquons une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) et progressive de cette activité pour tous les temps de traitement et particulièrement pour les plus fortes concentrations de xénobiotique. Parallèlement, l'activité APX reste faible et constante chez les témoins.

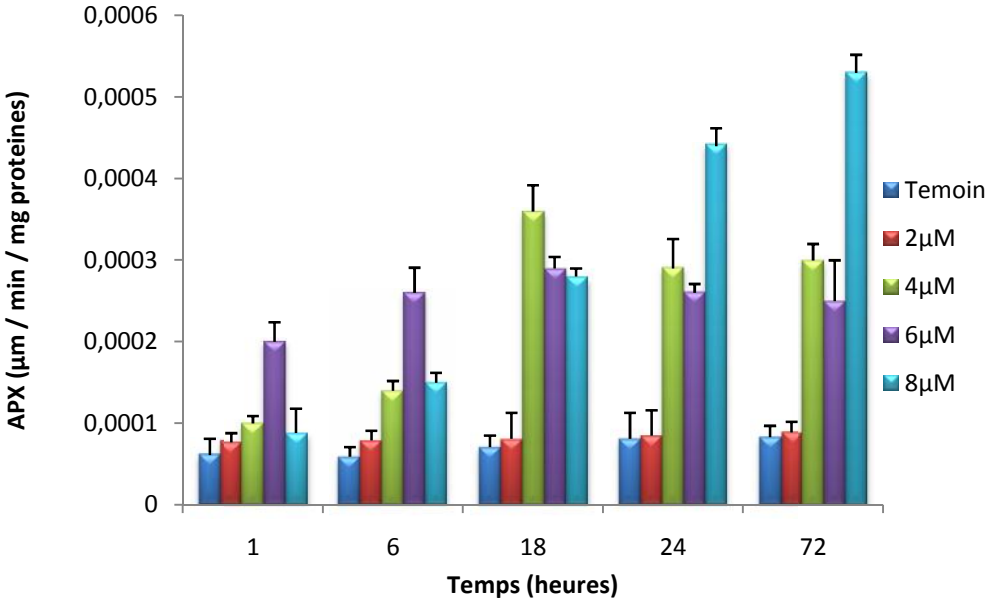

Figure 37: Effet de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité APX des paramécies en fonction du temps

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (38) représente les variations de l'activité APX observées chez les cellules traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nous remarquons que l'activité APX augmente de manière hautement significative ($p \leq 0.01$) pour toutes les concentrations de xénobiotique testées et ce par rapport aux témoins chez qui l'activité APX reste faible pendant tout le temps de traitement.

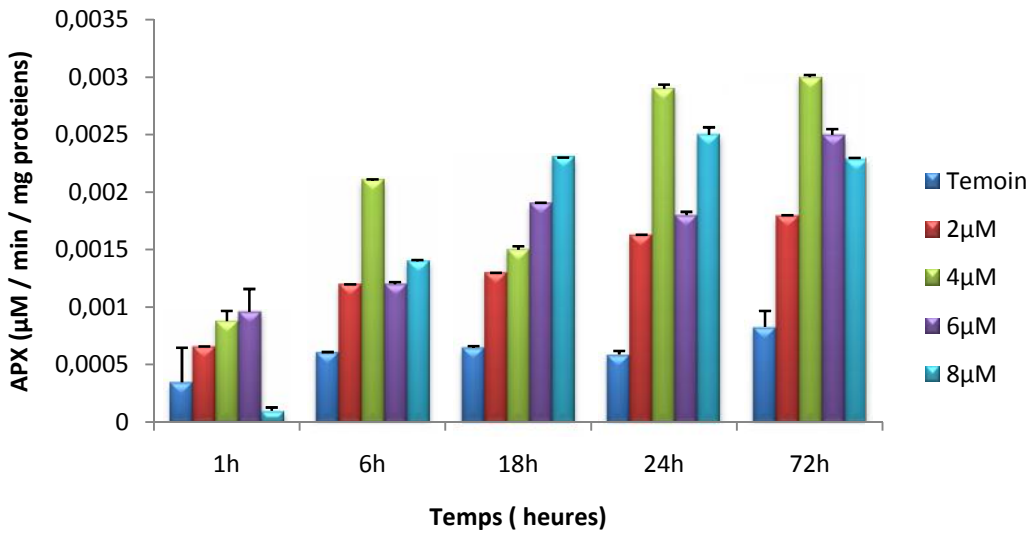

Figure 38 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'évolution de l'activité APX chez les paramécies.

2.5 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur l'evolution du taux de MDA

- **Effet du Paracétamol**

La figure (39) représente les variations du taux de MDA observées chez les paramécies traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol. Nous remarquons que ce taux tend à augmenter d'une manière très hautement significative. ($p \leq 0.001$) et ce pour toutes les concentrations testées.

En effet ce taux passe de 24.5 µM/mg de protéines chez les traités par la plus forte concentration de Paracétamol (8uM) après 1h de traitement à 86.2 µM/ mg de protéines après 72h de traitement. En revanche, le taux de MDA reste constant chez les témoins avec une valeur ne dépassant pas 10 µM

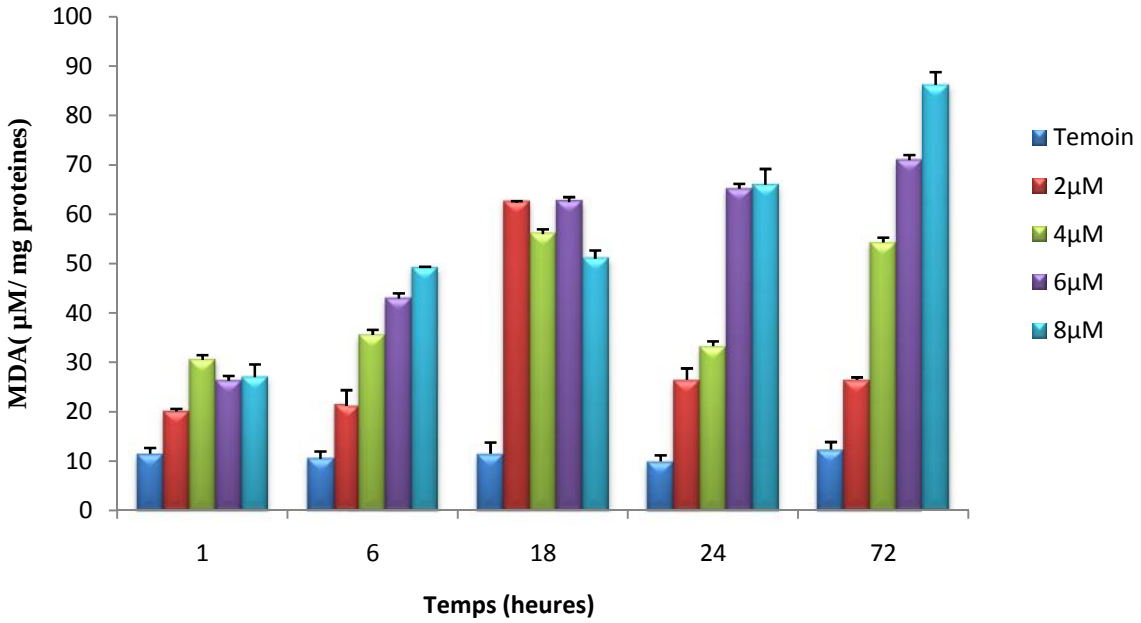

Figure 39: Effet des concentrations croissantes de Paracétamol sur taux de MDA en fonction du temps

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (40) illustre les variations du taux de MDA chez les paramécies traitées aux différentes concentrations d'Ibuprofène. On constate que le taux de MDA tend à augmenter d'une manière dose-dépendante et très hautement significative chez les traités par les différentes concentrations d'Ibuprofène ($p \leq 0.001$),

en effet, après 1H de traitement,ce taux passe de 16.5µg/mg de protéines chez les traités à la plus forte concentration d'Ibuprofène (8uM) à 24.1 µg/mg de protéines après 72h d'exposition au xénobiotique. Chez les témoins par contre le taux de MDA reste stable et ne dépasse pas 10,2 ug/mg de protéines.

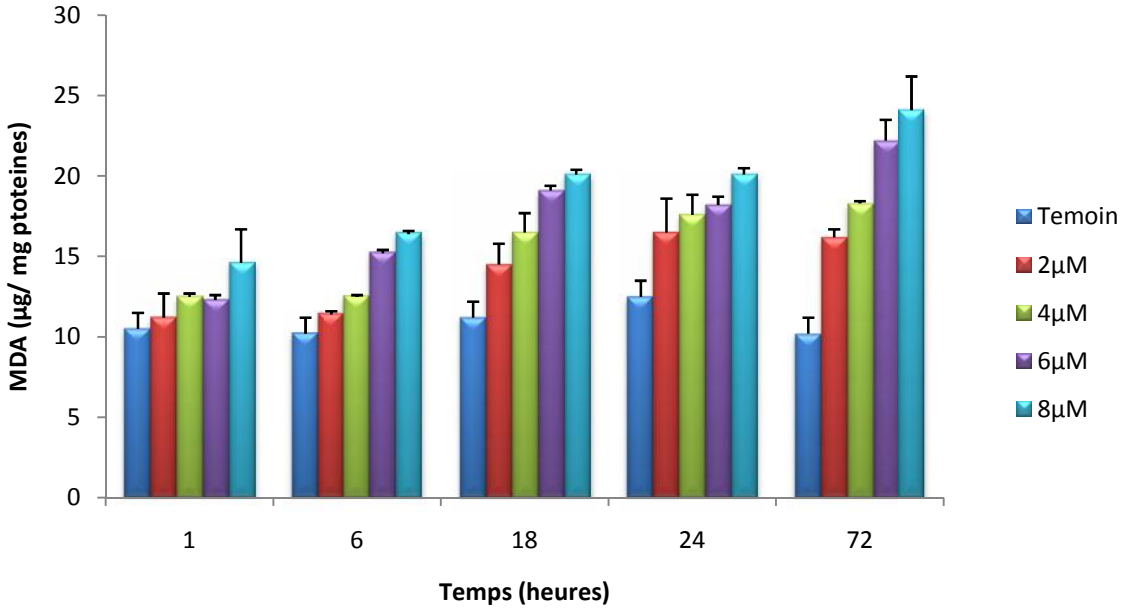

Figure 40 : Effet de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur taux de MDA en fonction du temps.

Discussion

Lorsque des organismes vivants sont soumis à des fluctuations dans leur environnement, ils subissent un stress intense, provoquant une batterie de réponses, via l'activation d'une cascade de mécanismes de détoxification, afin de survivre ou de s'acclimater a ce changement (Lagadic *et al.,* 1997). L'utilisation de biomarqueurs pertinents peut s'avérer très utile pour déterminer des réponses biologiques à des expositions proches des concentrations environnementales.

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la réponse des paramécies vis-à-vis d'un stress oxydatif, via le suivi des mécanismes de défense spécifiques à ce type de toxicité ou encore le cas échéant par la mise en évidence d'un stress oxydatif au niveau cellulaire et ce à travers suivi de l'évolution de biomarqueurs spécifiques de la destruction de la membrane par les radicaux oxygénés et qui sont les MDA.

Notre intérêt s'est porté sur l'évlution du taux de MDA , car ces molécules lorsqu'elles sont abodantes dans le milieu intracellulaire rendent compte d'une toxicité spécifiques aux radicaux libres . En effet, selon Bebianno *et al.,* (2005) et Al-Mutairi *et al.,* (2007) l'augmentation du taux de Malondialdéhyde indique une peroxydation lipidique, cette dernière est suivie de changements et d'une dégradation des structures membranaires, Il s'ensuit une perte des récepteurs et des enzymes de la membrane (Pampanin *et al.,* 2005). Ainsi la peroxydation lipidique est une source endogène des dommages de l'ADN (Marnett, 2002) et l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique constitue le marqueur biochimique le plus commun du stress oxydatif. (Chen *et al.,* 2005).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation de MDA en présence des deux xénobiotiques testés et cette augmentation est dose-dépendante. Nos résultats confirment ceux de Recknagel et Turocy (1977) qui a démontré que les produits dérivés d'une fonction oxydative microsomale, sont très toxiques pour les cellules de *Paramecium multimicronucleatum*., Sbartai (2013) et Djekoun *et al* (2012) ont mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez respectivement *Pamamecuim sp* et *Sacharomyces cerivisiae* . Il en est de de même concernant les travaux de Grara (2011) sur les gastéropodes Helix aspersa ou encore Zaouani (2010) qui a mis en évidence une augmentation du taux de MDA chez des rats traités par des pesticides.

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

Dans notre étude nous avons enregistré une réduction du taux de GSH pour les deux xénobiotiques testés en fonction du temps parallèlement à une induction de l'activité GST. Ces deux paramètres rendent compte de la prise en charge des deux xénobiotiques par les enzymes de la Phase II de la métabolisation où les métabolites formés lors e la phase I sont conjugués au GSH grâce à la GST le complexe conjugué est soluble et peut être éliminé facilement. Ce résultat est en accord avec ceux de Benbouzid *et al*(2012) Bouaricha *et al.*(2013)

C'est au cours du métabolisme des xénobiotiques que le système enzymatique Cytochrome P450 intervient (Guengerich, 1991). Il permet d'amorcer le processus d'élimination des composés indésirables. Cependant, les métabolites qu'il produit peuvent être toxiques s'ils ne sont pas transformés rapidement et éliminés. En effet, il est clairement démontré aujourd'hui que les radicaux libres sont responsables de processus toxiques (Lahouel *et al.*, 1998). C'est ainsi que le paracétamol est métabolisé par le CY P450 pour donner un métabolite réactif (N-acétyl-p-benzoquinoneimine) conduisant à une nécrose (O'Grady, 1997).

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

l'APX, une autre enzyme très importante dans le système de détoxification cellulaire, protège la cellule contre les dommages oxydatives causés par le H_2O_2 toxique Prassad *et al.*,(1999) ont mis en évidence une induction de cette enzyme chez les lichens soumises à un stress chimique, il en est de même des travaux de Khaldi *et al* (2009) qui ont mis en évidence

l'augmentation de l'activité APX chez les lichens *Ramalina farinacea* traitées par des engrais (NPKs) ou encore ceux de Gallego *et al.*,(2002) et Mediouni *et al.*, (2009). Nos résultent abondent dans le même sens puisque nous avons mis en évidence une indution de l'activité APX en présence de concentrations croissantes de Paracétamol et d'Ibuprofène. Cet effet pourrait s'expliquer par le fait que l'APX réduit le peroxyde d'hydrogène en eau en utilisant l'Ascorbate comme donneur d'électron. Il sera recyclé en Ascorbate par le biais du GSH comme donneur d'électron et le Gluthation oxydé (GSSG) est converti en GSH par la NADP-H qui dépend de la Gluthation réductase. Selon Asada et Takahashi, (1987), la stimulation de cette enzyme traduit la mise en place chez les cellules d'un état de tolérence et met en évidence son rôle dans l'élimination de l'eau oxygéné H2O2 formée suite à l'accumulation des xénobiotiques dans les cellules il en ai de même pour ceux obtenus par;

Introduction

L'utilisation de cellules en culture pour les études toxicologiques réside dans le fait que les concentrations du xénobiotique, de même que les conditions dans lesquelles il est employé, peuvent être étroitement contrôlées dans un environnement semblable à celui retrouvé *in vivo*, sans les restrictions imposées par l'utilisation d'animaux (Rauckman et Padilla., 1987). Schwaiger *et al.* (2004) et Triebskorn *et al.*, (2004) ont étudié les effets du Diclofénac sur des truites adultes et ont montré une altération au niveau des hépatocytes. Pour les auteurs, il s'agit d'une réponse au stress, d'une mobilisation d'énergie et d'une modification de la structure des organites liée à des réponses de détoxication qu'à une action.

- **Objectif du travail**

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés particulièrement à l'effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les mitochondries isolées des paramécies. Pour cela, les effets des deux xénobiotiques à différentes concentrations ont été évalués d'une part sur la phosphorylation oxydative via les paramètres caractéristiques de l'oxydation du Succinate, tels que la vitesse d'oxydation, le contrôle respiratoire et le rapport ADP/O). Ensuite des changements d'absorbance indicateurs d'un probable gonflement mitochondriale sont suivis, de même que l'activité enzymatique mitochondriale.

1. Matériel et méthodes

1.1 Isolement des mitochondries

L'isolement a été effectué selon la méthode de Djebar (1988) à partir de pommes de terre et de Otto *et al.,(*1998) à partir des paramécies, que nous avons modifiée .Figure (41).

1litre de milieu de culture des paramécies a d'abord été centrifugé pendant 5 minutes à 300 g dans une centrifugeuse de type Sorval RC 6. Les cellules sont lavées une fois avec une solution de lavage contenant (2mM de Sodium Phosphate, 2mM Sodium Citrate, 1.5 mM $CaCl_2$ (pH 7.2)) puis centrifugées pendant 10 min à 160 g . Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 200 ml de solution (a) contenant (0,2 M de Saccharose, 1mM tampon Phosphate (pH 6,2)), puis elles sont passées dans un Potter.

Une lyse cellulaire est provoquée et les mitochondries sont isolées à partir d'une série de centrifugations différentielles. Initialement, le broyat est centrifugé pendant 5 min à 500 g.

Le surnageant centrifugé pendant 2 minutes à 1500 g. Le surnageant est centrifugé pendant 5 min à 5000 g. le culot est remis en suspension dans la solution (a) et centrifugé pendant 2 minutes à 1000 g pour éliminer toute trace de contaminations des corps cellulaires. Après une dernière centrifugation du surnagent pendant 5 minutes à 5000 g, nous récupérons le culot final qui contient essentiellement des mitochondries pures.

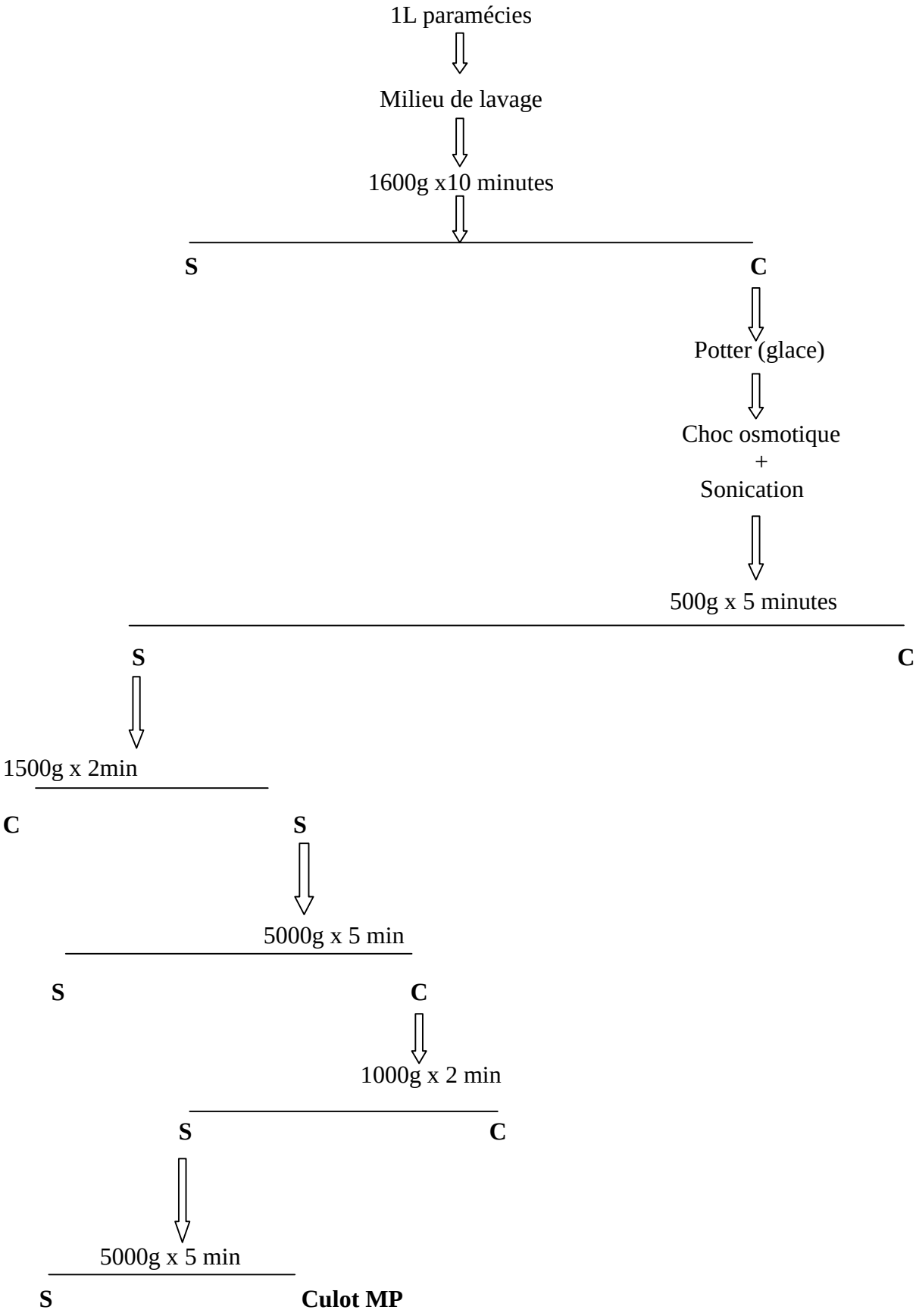

Figure 41: Schéma descriptif des principales étapes d'isolement des mitochondries des paramécies (C : Culot; S: Surnageant).

1.2 Mesure de la respiration mitochondriale

La consommation d'oxygène mitochondriale est mesurée dans une chambre d'oxygraphie (figure 42) (Hansatech Instruments) fermée, agitée et thermostatée à 30°C. Les signaux produits par les électrodes ont été recueillis à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition et traités à l'aide du logiciel Oxygraph+ (Hansatech Instruments) puis exprimés en nmol d'O_2/ml.

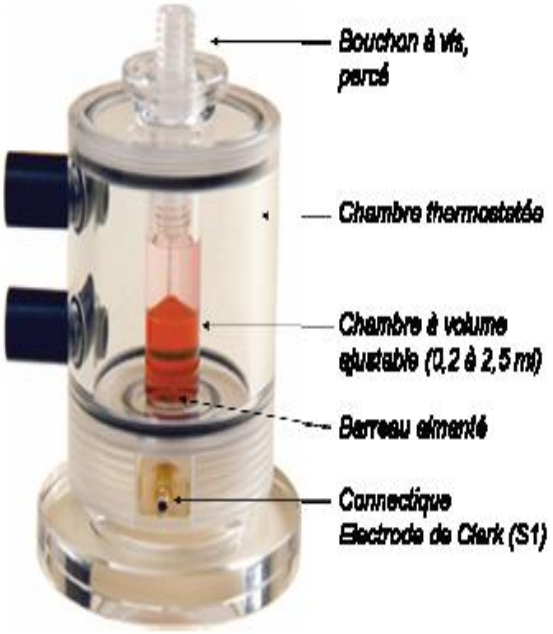

Figure 42 : Chambre d'oxygraphie ajustable.

Le mélange réactionnel contient 0,5 M de mannitol, 0,05% d'albumine de sérum bovin, 5 mM $MgC1_2$ et 10 mM tampon phosphate, pH 7,3, La concentration initiale en oxygène du support d'électrode est de 240µM. Les mesures de consommation d'oxygène des mitochondries isolées ont été réalisées par simple addition d'organelles (0,2 mg / ml mitochondries).

- Du succinate (10 mM), afin d'explorer la chaîne respiratoire à partir du complexe de la succinate déshydrogénase (complexe II).

- L'adjonction de 300µM d'ADP permet d'obtenir la respiration à l'état 3, c'est-à-dire en conditions phosphorylantes. Les résultats sont représentés dans le tableau (06) :

1.3 Traitements des mitochondries

Le traitement des mitochondries isolées à partir des paramécies se fait en traitant les suspensions mitochondriales avec différentes concentrations de Paracétamol et d'Ibuprofène (0, 2, 4, 6, et 8 µM) pendant 5 min et 25 ° C.

1.4 Mesure du gonflement des mitochondries

Les mesures du gonflement des mitochondries sont effectuées à 25 ° C avec un spectrophotomètre (Jenway, modèle UV6300) à la longueur d'ondes $\lambda = 520$ nm. Le milieu de suspension contient 100 mM de KCl. La réaction est déclenchée par l'addition de mitochondries (0,2 à 0,5 mg de protéines pour un volume final de 3 ml).

1.5 Mesure des activités enzymatiques mitochondriales

Les échantillons sont broyés dans un Potter en verre à 4 °C dans un tampon de broyage. Après avoir été centrifugés à 3000g pendant 5 minutes les surnageants ainsi obtenus sont récupérés pour le suivi des différentes activités enzymatiques.

1.5.1 Dosage de l'activité Catalase

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode décrite par Beers et Sizer (1952). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène du fait de l'activité de la catalase selon la réaction suivante :

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Le dosage est basé sur la disparition de l'H_2O_2 et la lecture est effectuée à 240 nm. C'est une réaction du premier ordre. La quantité d'H_2O_2 décomposée est directement proportionnelle à la concentration en substrat à la concentration en enzyme.

1.5.2 Activité Glutathion peroxydase (GPX)

Le dosage de la GPX est basé sur une réaction couplée entre la Glutathion Peroxydase et la Glutathion réductase (Flohe et Gunzler, 1984).

L'activité GPX est mesurée selon la méthode de Chance et Maehly (1955), basée sur l'utilisation du Gaïacol comme donneur d'hydrogène.

Le milieu réactionnel est composé de Mannitol 300mM, MOPS 50mM (pH7,2), Gaïacol 20mM et une solution de mitochodries . La réaction est déclenchée par addition de H_2O_2 10mM. La vitesse d'apparition du produit coloré de la réaction est mesurée à 470nm, le coefficient d'extinction à 470nm du tétra- gaïacol est $\Delta E = 26,6 mM^{-1} cm^{-1}$.

2 .Résultats

2.1 Mesure de la consommation d'oxygène chez les mitochondries isolées témoins.

Le tableau (06) illustre l'effet des différents substrats sur la vitesse d'oxydation des mitchondries isolées des paramécies. Nous constatons l'addition de Succinate +ADP provoque une accélération de la vitesse d'oxydation (118 ±2 nmol/min/mg^{-1}prot) contrairement au Succinate + KCN qui sont à l'origine d'une inhibition de la vitesse d'Oxydation. En effet celle ci ne dépasse pas 5 nmol/min/mg^{-1}prot)

Tableau (06): Variations des vitesses d'oxydation chez les mitochondries isolées des paramécies en présence de plusieurs substrats.

substrat/ inhibiteur	**vitesse d'oxydation (nmol/min/mg^{-1}prot)**
Succinate	82 ± 3
Succinate + ascorbate	95 ± 4
Succinate + ADP	118 ± 2
Succinate + KCN	< 5

2.2 Effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les activités oxydatives des mitochondries de paramécies incubées en présence d'ATP :

Les tableaux (07), (08) mettent en évidence les valeurs moyennes des vitesses d'oxydation obtenues avec les mitochondries traitées par les deux xénobiotiques et les mitochondries témoins. Ils fournissent également les valeurs des contrôles respiratoires (CR) et des rapports ADP/0.

- **Effet du Paracétamol**

Les résultats obtenus après traitement des mitochondries isolées au Paracétamol sont représentés dans le tableau (07).

Le Tableau (07) : Effet du Paracétamol sur les activités oxydatives des mitochondries isolées des paramécies

Vitesse Oxydation (nmol/ min/ mg/prot.)				
Paracetamol (µM)	Etat 3	Etat 4	CR	ADP/O
0	120	52	2.3	1.20
2	97	38	2.5	0.90
4	62	31	2	0.70
6	22	14	1.75	0.60
8	Nd	Nd	Nd	Nd

Nous remarquons que la vitesse d'oxydation en état 3 diminue de manière inversement proportionnelle aux concentrations de Paracétamol. Ainsi, à la concentration 6 µM de Paracétamol, la vitesse d'oxydation diminue d'environs 80 % par rapport aux témoins.

En état 4, la vitesse d'oxydation diminue également en fonction des concentrations de paracétamol, ainsi pour la concentration de 6µM la vitesse diminue d'environ 75% par rapport aux témoins. . A la plus forte concentration de Paracetamol, (8µM) la valeur de cette vitesse ne peut être déterminée.

Les valeurs du CR varient quant à elle de 2.3 pour les témoins et 1.75 pour les concentrations de 6µM. Concernant le rapport ADP/O, nous remarquons que celui-ci également diminue de manière inversement proportionnelle aux concentrations de Paracétamol.

- **Effet de l'Ibuprofène**

Les résultats obtenus après traitement des mitochondries isolées avec des cocentrations croissantes d'Ibuprofène sont représentés dans le tableau (08).

Tableau (08) : Effet de l'Ibuprofène sur les activités oxydatives des mitochondries isolées des paramécies

Vitesse d'Oxydation (nmol /min/ mg/prot.)				
Ibuprofene (µM)	Etat 3	Etat 4	CR	ADP/O
0	110	56	1.96	1.30
2	81	42	1.92	0.80
4	55	29	1.89	0.70
6	24	16	1.5	0.50
8	Nd	Nd	Nd	Nd

Le tableau (08) nous renseigne sur l'évolution des vitesses d'oxydation en état 3 et 4, Nous remarquons que celles-ci diminuent de manière inversement proportionnelle aux concentrations d'Ibuprofène, ainsi pour les témoins, la VOX en état 3 et en état 4 est respectivement de 110 (nmol /min/ mg/prot) et 56(nmol /min/ mg/prot.) alors qu'elle ne dépasse pas 24 (nmol /min/ mg/prot) et 16 (nmol /min/ mg/prot) pour les traités avec la concentration 6 µM. Il en est de même pour le CR qui diminue de manière inversement proportionnelle chez les traités par rapport aux témoins (1 .96 pour les témoins et 1.5 pour les traités avec 6uM d'Ibuprofène)

Le même effet est observé avec le rapport ADP/O qui est de 1.30 pour les témoins et varie de 0.80 à 0.50 pour les autres concentrations d'Ibuprofène.

Nous n'avons pas pu obtenir de valeurs pour tous les paramètres à la plus forte concentration d'Ibuprofène car ces dernières sont en dessous du seuil de détection de l'oxygraphe.

2.3 Le gonflement mitochondriale

- **Variation du volume des mitochondries traitées avec le Paracétamol**

La figure (43) illustre les changements de volumes des mitochondries en présence de concentrations croissantes de Paracétamol et en fonction du temps.

Nous remarquons une diminution progressive et inversement proportionnelle aux concentrations de Paracétamol. Ces valeurs de l'absorbance traduisant ainsi une augmentation du volume des mitochondries traitées avec le Paracétamol par rapport aux témoins.Ainsi pour la plus forte concentration de xénobiotique et après 15 min de traitement, nous notons une DO d'environ 0.89 pour les témoins alors qu'elle ne dépasse pas 0.25 chez les traités avec la plus forte concentration de Paracétamol.

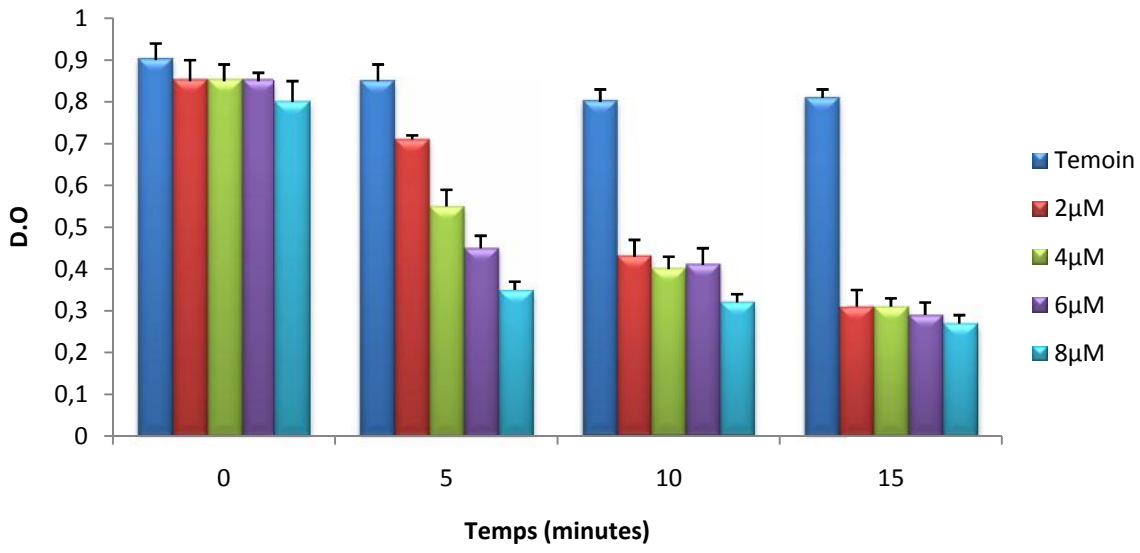

Figure 43 : Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol en fonction du temps.

- **Variation du volume des mitochondries traitées avec l'Ibuprofène**

La figure (44) illustre l'évolution du volume mitochondrial des témoins et traités avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nos résultats mettent en évidence une diminution du volume des mitochondries traitées. Cette diminution et progressive et dose-dépendante aux plus fortes concentrations de xénobiotique et ce après 10 min de traitement.

Ainsi, pour la plus forte concentration de xénobiotique et après 15min de traitement nous notons une DO de 0.9 pour les témoins alors qu'elle est de 0.22 pour les traités.

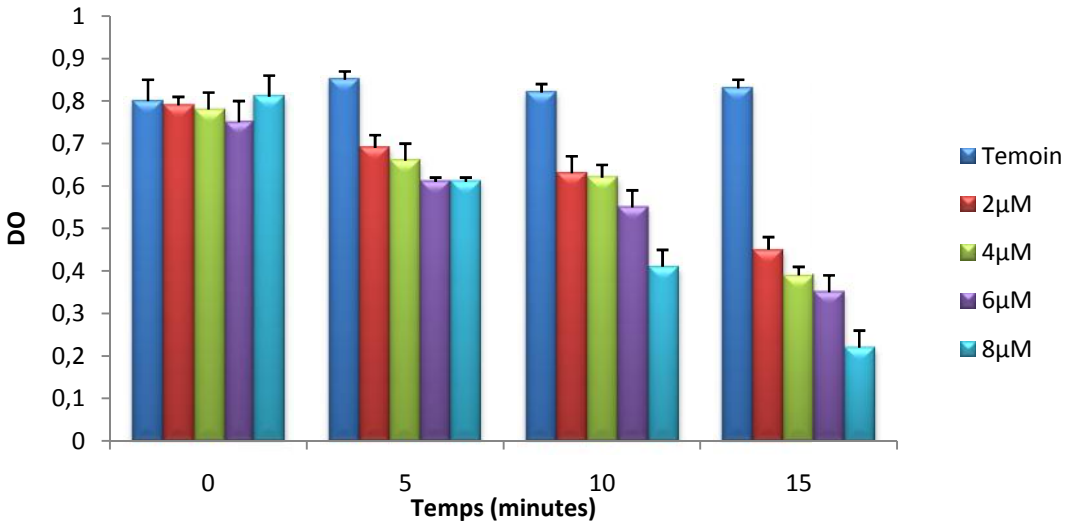

Figure 44 : Variations du volume des mitochondries isolées témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène en fonction du temps.

2.4 Suivi des activités enzymatiques mitochondriales :

2.4.1 Activité Catalase :

- **Effet du Paracétamol**

La figure (45) met en évidence l'évolution de l'activité Catalase chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol. Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante de l'activité catalase en fonction du temps. Ainsi l'activité catalase est d'environ 0.1 (µmolH_2O_2 min-1 mg-1 prot) chez les témoins alors qu'elle ne dépasse pas la valeur de 0.04 µ molH_2O_2 min-1 mg-1 prot chez les traitées avec la

concentration de 6 µM. Pour la plus forte concentration de Paracétamol (8µM) l'activité catalase est totalement inhibée.

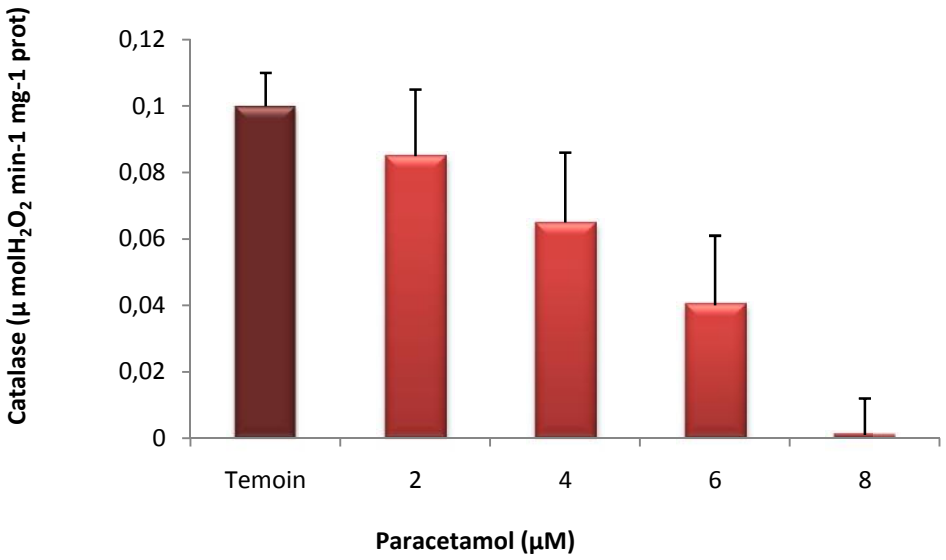

Figure 45: Effets du Paracétamol sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des paramécies.

- **Effet de l'ibuprofène**

La figure (46) met en évidence l'évolution de l'activité Catalase chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante de l'activité catalase en fonction du temps. Ainsi cette activité enzymatique est d'environ 0.1 (µmolH_2O_2 min-1 mg-1 prot) chez les témoins alors qu'elle ne dépasse pas la valeur de 0.03 (µ molH_2O_2 min-1 mg-1 prot) chez les traitées avec la concentration de 4 uM. Pour les plus fortes concentrations de Paracetamol (6 µM et 8µM) l'activité catalase est totalement inhibée.

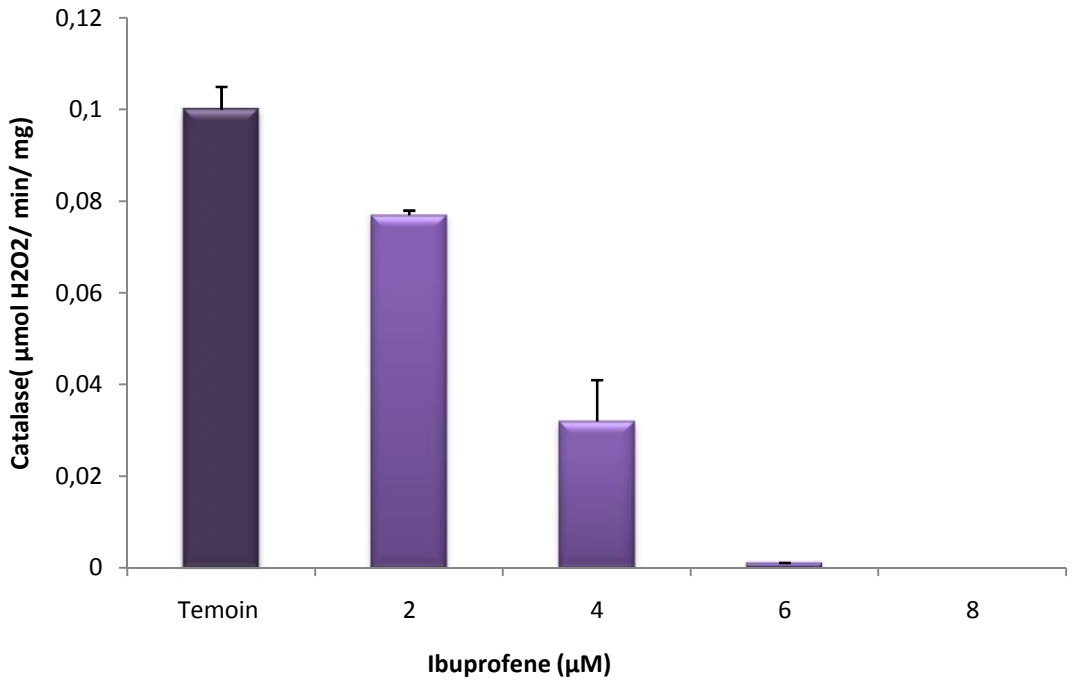

Figure 46: **Effets de l'ibuprofène sur l'activité enzymatique Catalase des mitochondries isolées à partir des paramécies.**

2.4.2 Activité GPX

- **Effet du Paracétamol**

La figure (47) met en évidence l'évolution de l'activité GPX chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes de Paracétamol. Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante de l'activité GPX. Ainsi cette activité enzymatique est d'environ 1.2 (nmol/ min/ mg proteine) chez les témoins alors qu'elle ne dépasse pas la valeur de 0.5 (nmol/ min/ mg proteine) chez les traitées avec la concentration de 2 µM. Cette activité enzymatique est totalement inhibée dès la concentration 4 µM.

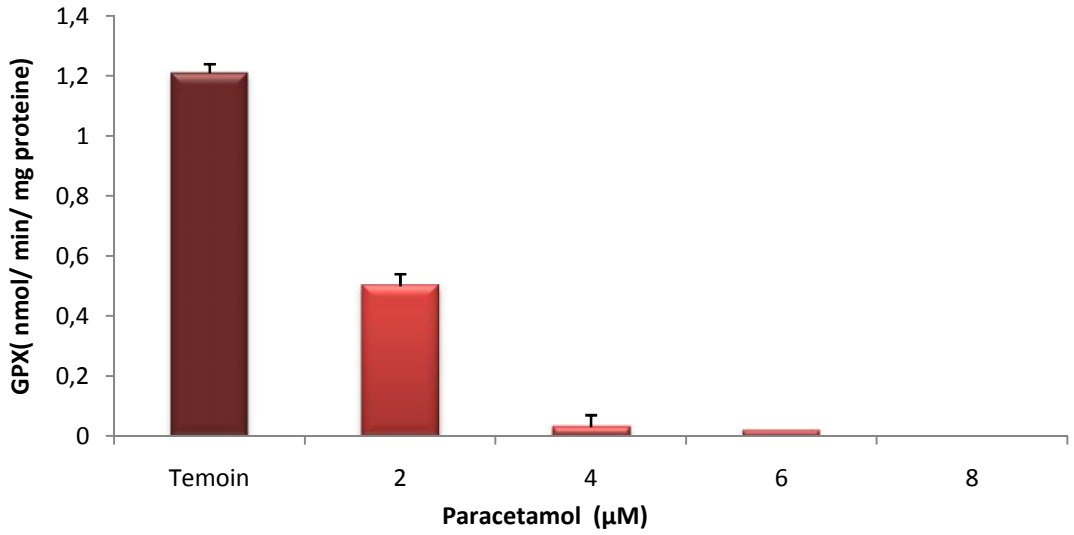

Figure 47 : Effets de concentrations croissantes de Paracétamol sur l'activité GPX chez les mitochondries isolées des paramécies.

- **Effet de l'Ibuprofène**

La figure (48) met en évidence l'évolution de l'activité GPX chez les mitochondries témoins et traitées avec des concentrations croissantes d'Ibuprofène. Nos résultats montrent une diminution dose-dépendante de l'activité GPX. Ainsi cette activité enzymatique est d'environ 1.2 (nmol/ min/ mg proteine) chez les témoins alors qu'elle ne dépasse pas la valeur de 0.42 (nmol/ min/ mg proteines) chez les traitées avec la concentration de 2 µM. Cette activité enzymatique est totalement inhibée dès la concentration 4 µM.

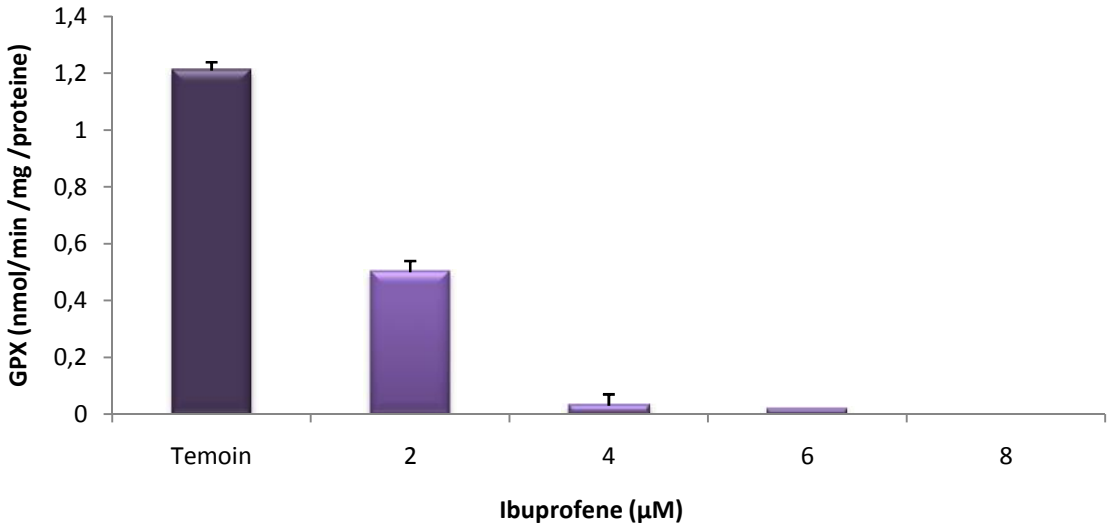

Figure 48 : **Effets de concentrations croissantes d'Ibuprofène sur l'activité GPX chez les mitochondries isolées des paramécies.**

Discussion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'effet de deux médicaments (Paracétamol et Ibuprofène) à l'échelle subcellulaire. En effet nous avons suivi les modifications physiologiques et morphologiques induites par ces deux xénobiotiques chez des mitochondries isolées à partir des paramécies.

Dans un premier temps, nous avons suivi la consommation d'oxygène chez les mitochondries isolées non traitées et ce après addition de plusieurs substrats et inhibiteurs de l'activité mitochondriale. Nous avons mis en évidence une fortes vitesse d'oxydation chez les mitochondries en présence de Succinate, d'Ascortbate et d'ADP ; ceci est du au fait qu'une part importante du contrôle de la respiration est exercée au niveau de l'apport en coenzymes réduits à la chaîne respiratoire. Une augmentation de l'apport en substrats potentialise l'oxydation de coenzymes réduits (NADH, FADH2) à différents niveaux de la chaîne respiratoire mitochondriale et stimule la respiration sur mitochondries isolées (Leverve et Fontaine, 2001). La majorité des expériences portant sur la régulation de l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries isolées sont réalisées en présence de concentrations saturantes de substrats. (Groen *et al,* 1982, Tager *et al.,* 1983).

Au contraire lors de l'addition de l'inhibiteur (KCN) qui est le plus puissant des poisons de la chaîne respiratoire, nous remarquons une inhibition de la vitesse d'oxydation car les inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont des éléments chimiques qui par leur liaison avec l'enzyme ralentissent la vitesse de réaction enzymatique du complexe cible (la cytochrome oxydase ou complexe IV pour le cyanure). Leur action de poison très spécifique a permis d'élucider de nombreux mécanismes du fonctionnement de la chaîne respiratoire in vitro. (Djebar et Moreau,1990)

La perturbation de la phosphorylation oxydative induite par les médicaments peut en fait se manifester *in vitro* directement chez les mitochondries hépatiques isolées (Ruppe *et al.,* 2002 ; Pessayreet *al* ., 2010 ;Berson *et al.*,2001)

Des études ont prouvé qu'en cas de surdosage au Paracétamol, la respiration mitochondriale des hépatocytes de rat est inhibée en raison d'une forte diminution des taux d'ATP (Bernuau *et al.,* 1986). Kon *et al,* (2004) expliquent que le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale pourrait être un des mécanismes fondamentaux impliqués dans les altérations de la chaîne respiratoire en condition d'intoxication au Paracétamol. De plus

Jasso-Chavez *et al.,* (2010) ont mis en évidence une forte inhibition de la respiration des mitochondries isolées à partir d' *Euglena gracilis* traitées avec du chrome (CR). Les auteurs constatent que la cytotoxicité du Cr entraine à la fois la diminution de la respiration, de la glycolyse et par conséquent, une baisse de l'ATP cellulaire. Dans notre travail, nous avons observé les effets du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur la phosphorylation oxydative de mitochondries isolées de paramécies et ce en mesurant les paramètres caractéristiques de l'oxydation du Succinate (vitesse d'oxydation, Contrôle Respiratoire, Rapport ADP/O) des mitochondries isolées en présence des différentes concentrations des médicaments. Nos résultats sont en accord avec ceux cités ci-dessus puisque qu'ils montrent que la vitesse de l'oxydation du Succinate chez les mitochondries isolées est inhibée sous l'effet des deux xénobiotiques. De plus, nous avons également mis en évidence que la vitesse en état non phosphorylant (état 4) est aussi fortement réduite et induit par conséquent une diminution du contrôle respiratoire. Il en est de même pour les valeurs des rapports ADP/O qui tendent également à diminuer chez les traités.

A la plus forte concentration des deux xénobiotiques aucune mesure n'est possible en raison de la destruction des mitochondries.

L'autre paramètre aussi intéressant que nous avons jugé utile de mesurer est : le gonflement des mitochondries.. Ce gonflement peu être expliqué par la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées car certains médicaments sont capables d'entraîner une ouverture des PTPM, tels le Diclofénac, l'acide Salicylique, le Nimésulide et l'acide Valproïque (Labbe *et al.,* 2008, Berson *et al.,* 2006).La Troglitazone et l'Alpidem , peuvent également induire une ouverture de ces pores (Pessayre *et al.*, 2010). Les mécanismes précis par lesquels certaines molécules induisent l'ouverture des PTPM ne sont pas encore connus (Djebar et Djebar, 2000), mais il est possible que deux types d'évènements puissent jouer un rôle important :

- La production par la chaîne respiratoire, ou d'autres sources subcellulaires, d'ERO qui vont oxyder et altérer des protéines impliquées dans le PTPM ;
- La production par l'intermédiaire de cytochromes P450 d'un ou de plusieurs métabolites réactifs, capables également d'altérer de façon irréversible des protéines du PTPM. (Labbe et *al.,* 2008, Lee et *al.,* 2005)

Il semble que ce dernier cas survienne avec le paracétamol qui est transformé par le cytochrome P450 2E1 en N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). En effet, ce métabolite réactif se fixe de façon covalente à plusieurs protéines mitochondriales, ce qui pourrait non seulement faciliter l'ouverture des PTPM mais également entraîner d'autres dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à une réduction de la production d'énergie (Masubuchi *et al* .,2005, Ruepp *et al.*,2002). Quel que soit le mécanisme impliqué, la conséquence principale de l'ouverture des PTPM est la mort cellulaire par apoptose, ou par nécrose, en fonction du nombre de mitochondries impliquées. Chagra *et al.,* (2009) ont aobservé un gonflement mitochondrial suite au traitement par le Cadmium chez les mitochondries isolées de pommes de terre. Kon (2004) suggère que le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale pourrait être un des mécanismes fondamentaux impliqués dans les altérations de la chaîne respiratoire en condition d'intoxication au Paracétamol. Nos résultats sont en parfait accord avec ces travaux puisque nous avons également mis en évidence un gonflement mitochondrial chez les mitochondries traitées avec le Paracétamol et l'Ibuprofène.

Enfin, les activités enzymatiques (Catalase et GPX) sont d'excellents indicateurs d'un stress oxydant. En effet l'atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale engendre une hyperproduction d'espèces oxygénées réactives, (Fromenty, 2010), (Chagra et *al.,* (2009). Selon Schmidt *et al.,* (2007), La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence des espèces oxygénées réactives à partir d'une fuite d'électrons en amont du complexe IV. Ces électrons s'associent à l'oxygène pour constituer des Superoxydes puis secondairement du Peroxyde d'hydrogène. Le GSH, la SOD et la GPX et la CAT se chargent de piéger ces d'espèces oxygénées réactives au sein de la mitochondrie.

Le paracétamol semble également inhiber la β-oxydation des acides gras par l'intermédiaire de son métabolite réactif, le NAPQI (Chen *et al.,* 2009). La CPT1, une enzyme clé de l'oxydation mitochondriale des acides gras à chaîne longue, pourrait être une cible privilégiée pour certains médicaments tels que l'acide Valproïque, l'Amiodarone et le Tamoxifène (Laroch *et al.,* 2007, Aires *et al.,* 2010). Les médicaments peuvent aussi former des esters avec le Coenzyme A et/ou la L-Carnitine, entraînant une diminution des concentrations intracellulaires de ces deux cofacteurs indispensables à la β-oxydation

mitochondriale. Un tel mécanisme est observé avec, l'acide Salicylique et l'Ibuprofène (Fromently 2010, Fenereaux *et al.,* 1990). Ces transitions de perméabilité mitochondriale traduisent une augmentation brutale de la perméabilité de la membrane interne aux ions et molécules de petit poids moléculaires. Les éléments déclencheurs peuvent être des oxydants comme les peroxydes ou des ions Calcium. Ces transitions de perméabilité mitochondriale s'accompagnent de modifications fonctionnelles de la membrane interne des mitochondries, de cascades de phosphorylations oxydatives, du relargage d'ions et métabolites mitochondriaux, ainsi que de la diminution de la synthèse d'ATP. Il en résulte une majoration des taux de peroxydes ainsi que d'importantes altérations de l'homéostasie calcique au sein de la cellule comme dans l'intoxication au Paracétamol. Au total, un stress oxydatif intense occasionne ces transitions de perméabilité mitochondriale qui vont à leur tour engendrer un stress oxydatif, favorisant l'auto-entretien des dysfonctionnements des systèmes antioxydants débordés (Hinson *et al.,* 1988). Ceci conforte nos résultats, puisque nous avons également mis en évidence une inhibition des activités enzymatiques antioxydantes mitochondriales et ce en présence de forets concentrations d'Ibuprofène et de Paracétamol.

Introduction

Dans le milieu aquatique, le devenir des résidus médicamenteux est fonction de leurs propriétés physico-chimiques et des conditions du milieu. Les facteurs physiques et chimiques tels que le pH, la température, la dureté, la concentration en matières en suspension et le potentiel d'oxydoréduction expliquent en grande partie le comportement environnemental des médicaments dans l'eau (Pépin, 2006). Si un certain nombre de travaux ont été consacrés aux effets des changements environnementaux sur la toxicité de polluants chimiques chez les organismes aquatiques (Heugens *et al.,* 2003; Schiedek *et al.,* 2007) très peu ont ciblé l'influence des conditions environnementales sur cette toxicité.

- **Objectif du travail**

Dans ce chapitre nous allons tenter d'étudier l'influence de certains paramètres environnementaux tels le pH, la température et la lumière UV sur la toxicité du Paracétamol et de l'ibuprofène sur la paramécie.

1. Matériel et méthodes :

1.1 Détermination de la concentration inhibitrice (CI 50)

On détermine d'abord les concentrations, qui dans les conditions standard, vont inhiber 50% de l'accroissement d'une population de paramécies selon la méthode de Bonnet, (2005). Les taux d'inhibition sont ensuite corrigés par la formule d'Abbot (1925) qui permet de connaitre la toxicité réelle du xénobiotique. Les différents taux subissent une transformation angulaire d'après les tables de Bliss. Les taux de normalité corrigés obtenus seront transformés en log probits et permettent d'établir une droite de régression en fonction des logarithmes décimaux, des doses utilisées. Le test C2 permet un bon ajustement de la droite.

Enfin, à partir de la courbe, nous pouvons déterminer toutes les doses correspondant à la CI 50, selon les procédés mathématiques de Finney (1927).

1.2 Effet du pH de la température et de la lumière UV

Le traitement par les deux médicaments s'effectue sur des cultures de paramécies dont le nombre dépasse 30000 cellules par ml. Nous avons suivi la CI 50 après 12h et 24h de traitement sous l'influence du pH, de la température, et des UV.

- **Le pH**

Le milieu de culture des témoins étant de 6.8, nous avons testé la concentration correspondant à la CI 50 sur des cultures de paramécies auxquelles nous avons modifié le pH. Les valeurs du pH ainsi choisi sont : 5, 6, 7, 8, et 9.

- **La température**

Pour tester ce paramètre, nous avons placé des cultures de paramécies traitées avec l'équivalent de la CI50 d'Ibuprofène et de Paracétamol à différentes températures en les plaçant dans une étuve à respectivement 20, 25 et 30 °C, dans une étuve de type Memmert 400.

- **Lumière UV**

Pour étudier l'effet des UV, nous avons placé les différentes cultures de paramécies témoins et traitées sous une lampe UV de type SANKYO G15T8 avec un cycle alternant 10H lumière et 14H obscurité.

2. Résultats

2.1 Effet du pH sur la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène

- **L'influence du pH sur la toxicité du Paracétamol**

La figure (49) illustre l'influence du pH sur la croissance des paramécies traitées avec le Paracétamol pendant 12H et 24H et soumises à des variations du pH de leur milieu. Nous remarquons que la CI 50 à 12h et 24h de traitement, diminue de manière dose-dépendante et très hautement significative ($p \leq 0.001$). Proportionnellement à l'augmentation du pH. En effet, la CI50 varie de 2.31 µM à 0.66 µM, après 12h d'exposition, et de 1.22 µM à 0.22 µM après 24h d'exposition.

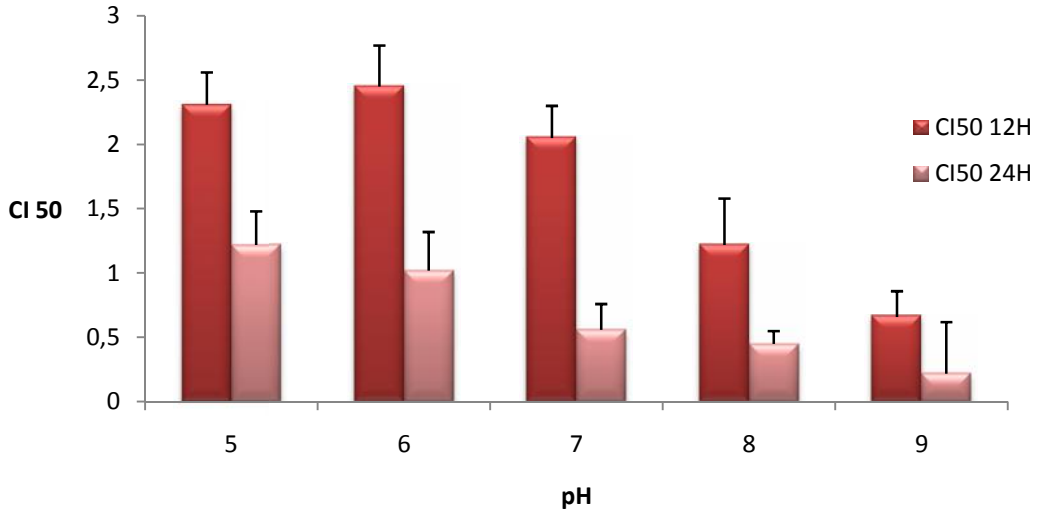

Figure 49: Influence du pH sur la toxicité du Paracétamol

- **Effet du pH sur la toxicité de l'Ibuprofène**

La figure (50) représente l'influence des variations du pH du milieu sur la croissance des paramécies soumises à un traitement par l'Ibuprofène (CI50). Nous observons des valeurs relativement constantes des CI 50 après 12h de traitement. Ces valeurs diminuent de façon hautement significative après 24h de traitement ($p \leq 0.01$) et varient entre 1.56 à pH 5 et 0.52 µM à pH 9.

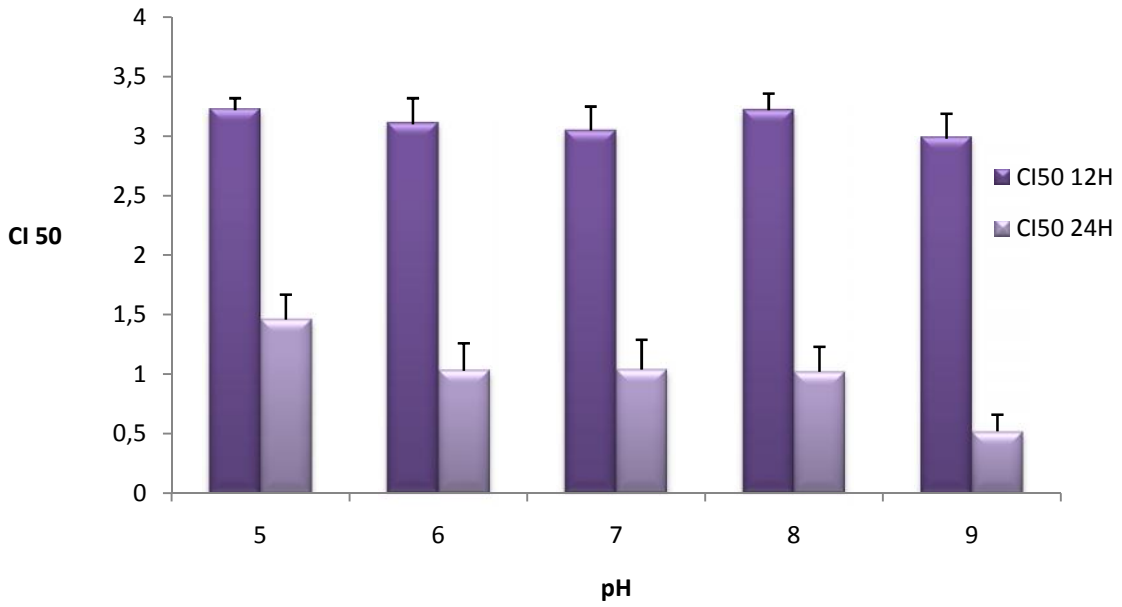

Figure 50 : Influence du pH sur la toxicité de l'Ibuprofène.

2.2 Effet de la température sur la toxicité du Paracétamol et d l'Ibuprofène

- **Effet de la température sur la toxicité du Paracétamol**

La figure (51) met en évidence l'effet des fluctuations de températures sur la toxicité du Paracétamol à travers les variations de la CI 50 chez la paramécie.

Nous remarquons que les valeurs de la CI 50 après 12h et 24h de traitement augmentent de façon dose-dépendante et hautement significative ($p \leq 0.01$) à la température de 20° C et 25°C. Au-delà de 25° C, la valeur de la CI50 diminue de manière hautement significative ($p \leq 0.01$) et ceci après 12h et 24h de traitement.

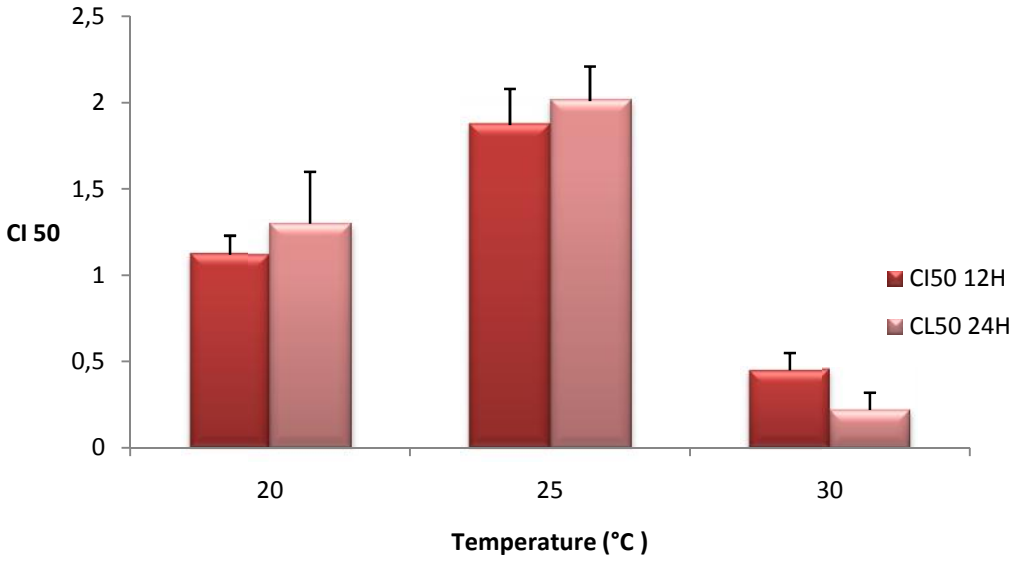

Figure 51 : Influence de la température sur la toxicité du Paracétamol

- **Influence de la température sur la toxicité de l'Ibuprofène**

La figure (52) illustre l'effet de la température sur les variations de la CI 50 après 12h et 24h de traitement avec l'Ibuprofène (CI50). Ainsi plus la température augmente et plus la valeur de la CI50 tend à diminuer de manière hautement significative (P≤0.01) par exemple, après 12H de traitement : CI50 est de 3,1 à la température 20° et de 2,3 à la température 30°.

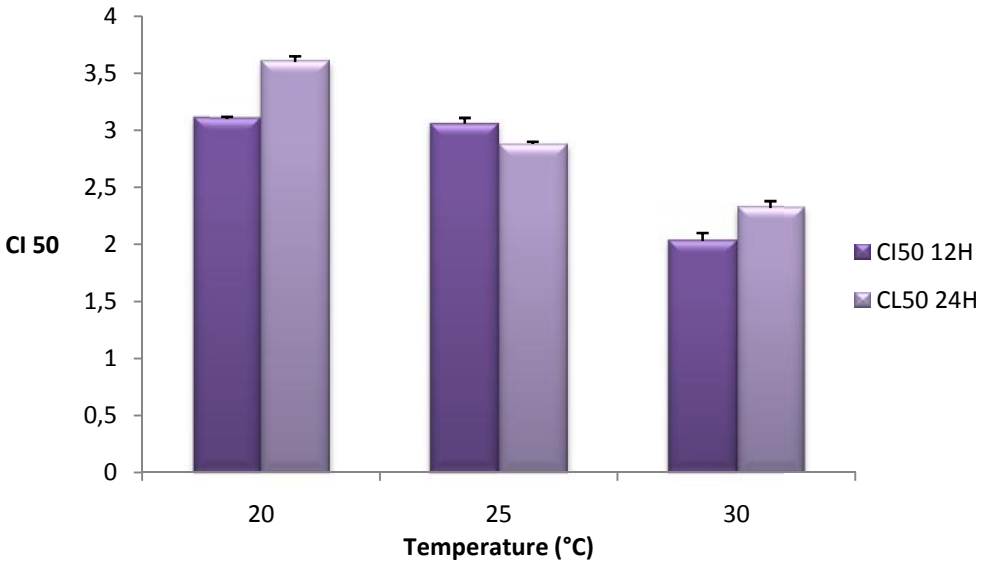

Figure 52: Influence de la température sur la toxicité de l'Ibuprofène

.

2.3 Influence des UV sur la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène

- **Influence des UV sur la toxicité du Paracétamol**

La figure (53) illustre l'effet des UV sur la toxicité de l'Ibuprofène chez les paramécies. Nous constatons une diminution significative ($p \leq 0.05$) des valeurs des CI 50 après 24h de traitement avec le xénobiotique seul, après traitement par les UV, cette toxicité persiste pour les deux temps de traitement. Par exemple après 12H de traitement, en absence d'UV, la valeur de la CI50 est de 2.4µM elle diminue vers 2.1 après traitement par les UV.

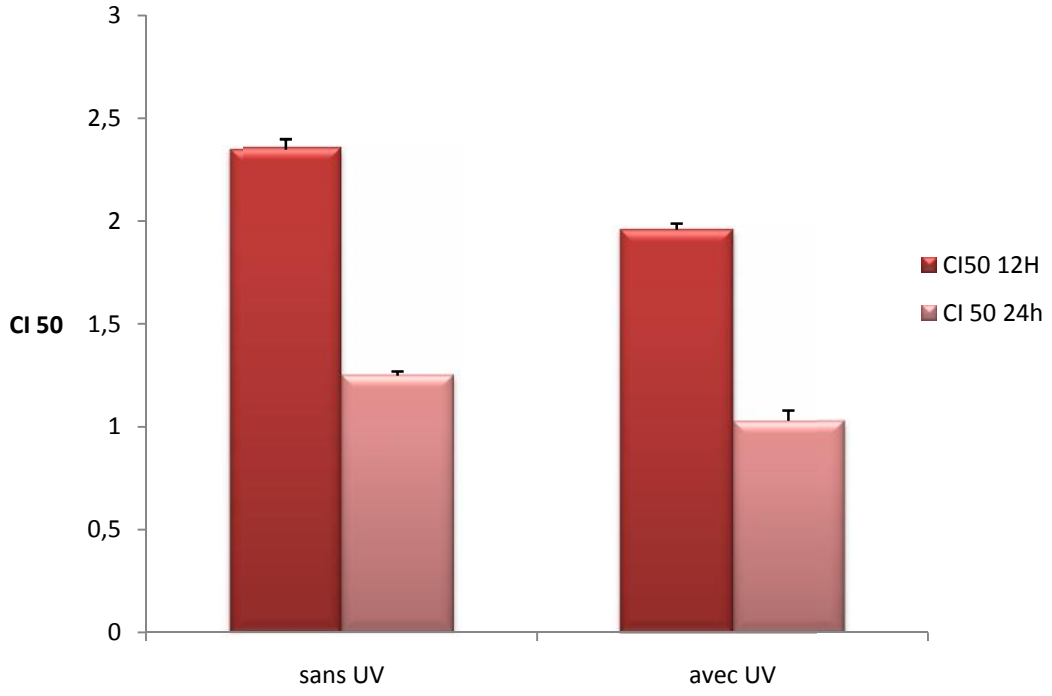

Figure 53 : Influence des UV sur la toxicité du Paracétamol

- **Influence des UV sur la toxicité de l'Ibuprofène.**

La figure (54) illustre l'influence des UV sur la toxicité de l'Ibuprobéne sur les paramécies. Ainsi, nous remarquons que les valeurs de la CI 50 diminuent de manière significative sous l'influence des rayons UV.($p \leq 0.05$)

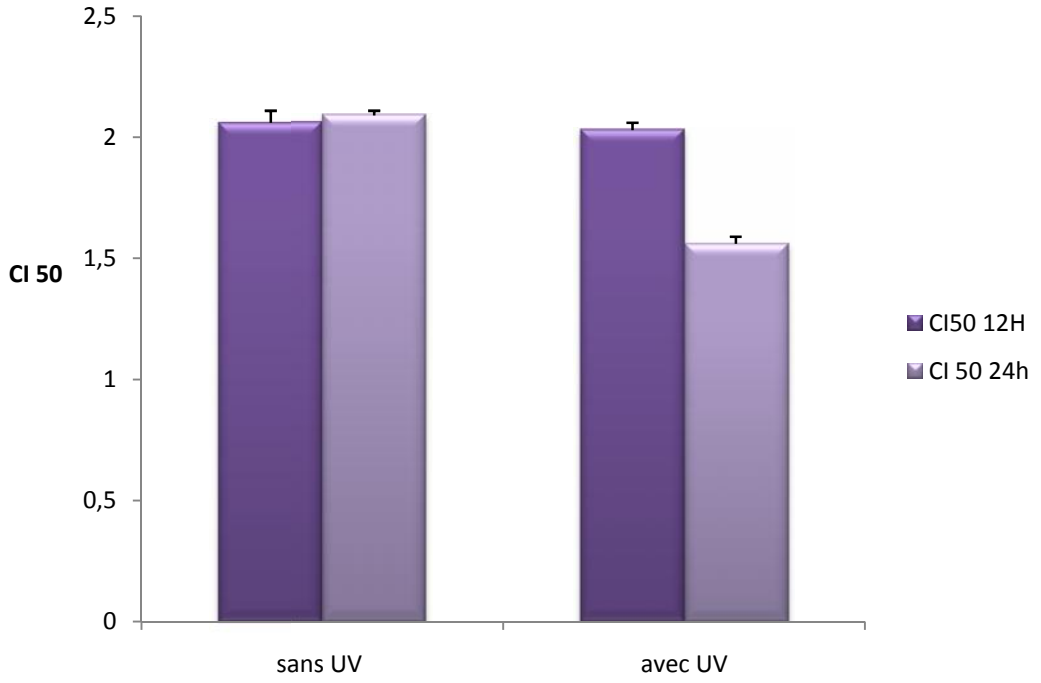

Figure 54: Influence des UV sur la toxicité de l'Ibuprofène

Discussion

Deux principaux éléments déterminent l'ampleur de la biodégradation des médicaments: les caractéristiques intrinsèques des molécules et les conditions environnementales (Yalkowsky et Dannenfelser,1992).Les structures chimiques des médicaments sont très diverses et les molécules présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes avec plus ou moins de résistance à la biodégradation (Rafols *et al.,* 1997), Les conditions environnementales (la température, le pH, le temps de séjour, les nutriments, etc.) ont un impact sur les activités microbiennes et par conséquent influencent la biodégradation. (Scheytt *et al.,* ;2005 Pépin, 2006).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'effet du pH sur lesns potencielles de l'activité/toxicité des deux molécules testées. Pour cela, nous avons calculé les CI 50 après 12h et 24h de traitement car ce paramètre est d'une grande importance dans la détermination des concentrations toxiques. Nous avons ainsi déterminé que la concentration inhibitrice du paracétamol est plus faible que celle de l'Ibuprofène suggérant ainsi une toxicité plus élevée du Paracétamol.

Le second paramètre auquel nous nous sommes intéressés est le pH du milieu. Nos résultats ont montré qu'un pH acide est un facteur favorable à la toxicité. ; le pH est acide, plus la toxicité augmente et cela pour les deux xénobiotiques testés. Nos résultats vont dans le même sens que ceux de Kim *et al.,* (2009) qui ont mis en évidence une augmentation de la toxicité d'un certains nombre de produits pharmaceutiques suite à une élevation du pH du milieu chez *Daphnia manga.* En revanche, Stehly et Hayton, (1990) ont montré que la bioaccumulation du Pentachlorophénol chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) était fortement affectée par un pH proche du pKa de ce produit chimique. Nakamura *et al.,* (2008) ont également montré que la toxicité d'un psychotrope, la fluoxétine chez O. latipes dépendait fortement du pH de l'eau et que la toxicité observée augmentait en fonction en fonction de l'augmentation de l'acidité du milieu. Cette toxicité pourrait s'expliquer par l'augmentation de la fraction du xénobiotique non ionisée dans le milieu,cette fraction étant plus plus biodisponible entraine une augmentation de sa toxicité. En effet les travaux de Beausse,(2004). ont montré que l'Ibuprofène est plus propice à migrer dans les sols acides (pH inférieur à 4) que dans les sols neutres ou basiques D'après Oppel *et al.,* (2004), cette molécule est adsorbée aux particules du sol. Les concentrations en matières organiques et en argile

influencent aussi le degré d'adsorption de l'Ibuprofène aux particules du sol (Avdeef *et al.,* 1998) ;(Buser *et al.,* 1999).

En troisième lieu nous nous sommes penchés sur l'influence de la température sur les la CI50 des deux xénobiotiques chez les paramécies. L' l'influence de la température de l'eau est choisie comme un paramètre pouvant être déterminant (Heugens *et al.,* 2006).

Ratushnyak *et al.,*(2005) ont signalé une induction de la toxicité du Fenvalerate , de la Cyperméthrine et de la Deltaméthrine chez *D. magna* sous l'influence des fluctuations de la température. D'un autre côté, selon et Lewis et Horning (1991) Heugens *et al.,(* 2003) ont mis en évidence une augmentation de la toxicité du Cadmium chez *D. magna* quand la température du milieu augmente.

Dans notre étude l'augmentation de la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène sous l'effet de la température peut être expliquée par le fait que la température de l'eau peut altérer l'accumulation et/ou la cinétique ainsi que le métabolisme des produits chimiques, et donc la sensibilité des organismes d'essai (Huovinen *et al.,* 2003) et ce en générant des métabolites plus toxiques que la molécule mère.(Shen *et al*., 2006)

La dernière partie de ce chapitre consiste à étudier les effets de la lumière UV sur la toxicité des médicaments étudiés.

Certaines études ont rapporté les effets phototoxiques ce certains médicaments sur les cellules humaines (Trisciuoglio *et al.,*2002), et plus récemment sur les invertébrés aquatiques. (Jung *et al.,* 2008). Ces effets toxiques sont expliqués par la production de ROS. Ainsi, les effets phototoxiques du Sulfathiazole sont dus à la production d'espèces réactives de l'oxygène Yamamoto et *al.,*(2001) ; Kim *et al.,* (2009). ont rapporté que les Fluoroquinolones y compris la Ciprofloxacine induisent une rupture des brins d'ADN sous l'effet des rayonnements UV-A, ce qui laisse suggérer un pouvoir phototoxique de ce groupe de produits pharmaceutiques, en accord avec nos résultats qui mettent en évidence une toxicité plus importante sois l'effet des rayons UV suggérant ainsi une augmentation de la libération des ROS comme le stipulent les travaux de Agrawal *et al.,* (2007) qui montrent une production des ROS importante en présence Ciprofloxacine sous l'effet des UV -A , UV -B , et la lumière du soleil.

Au terme de cette étude il semblerait donc que le pH de l'eau, la température et la lumière soient des facteurs qui influencent la toxicité des substances pharmaceutiques, en influençant la fraction ionique de ces dernières, en transformant les molécules en des fractions plus toxiques que la molécule mère, et en générant des Espèces Réactives a l'Oxygène (ROS).

Conclusion générale

Actuellement les grandes multinationales qui possèdent le monopole du médicament ne se préoccupent pas ou peu de son devenir dans l'environnement. En effet très peu de données sont disponibles actuellement sur l'impact des résidus de médicaments ou de leurs métabolites sur l'environnement. Une multitude de préparations chimiques sont rejetées dans l'environnement et se déversent ainsi dans les eaux de surface ou la mer à des concentrations **certes infimes mais n'a-t-on pas découvert aujourd'hui que des nanomolécules pouvaient avoir des effets toxiques parfois/souvent irréversibles ?**

C'est dans ce contexte que se situe notre travail qui consiste en la mise en évidence de la toxicité potentielle de deux médicaments couramment utilisés, en l'occurrence : le Paracétamol et l'Ibuprofène sur un modèle biologique unicellulaire d'eau douce considéré également -et à juste titre- comme bioindicateur de la pollution des eaux ; à savoir la paramécie.

Notre travail s'est fixé trois objectifs : dans un premier temps rechercher la toxicité potentielle des deux xénobiotiques à l'échelle cellulaire, puis étudier l'influence des variations physicochimiques du milieu sur leur toxicité et enfin mettre en évidence une toxicité chez un organite subcellulaire particulièrement connu pour son rôle dans la production de radicaux et dans l'initiation du phénomène de l'apoptose.

Dans la première partie nous avons mis en évidence un effet toxique du Paracétamol et de l'Ibuprofène à l'échelle cellulaire à travers l'inhibition de la croissance des paramécies confirmé par le pourcentage de réponse et un taux de mortalité particulièrement élevé pour les fortes concentrations.

D'un autre côté, cet effet sur la croissance cellulaire est accompagné par des perturbations morphologiques telles que l'apparition de bourgeonnements membranaires (trichocytes) pouvant être à l'origine d'une importante désorganisation du contenu cytolitique, d'une fragmentation membranaire, d'une désintégration du macronoyau et enfin d'une lyse cellulaire. De plus, nous avons constaté la diminution du nombre de vacuoles digestives particulièrement en présence des plus fortes concentrations des xénobiotiques.

La seconde partie de notre travail s'est articulée autour d'une étude biochimique et polarographique effectuée sur les paramécies en présence de Paracétamol et de l'Ibuprofène. Il en ressort : une forte perturbation des différents métabolites cellulaires dont les protéines, les glucides et les lipides ainsi qu'une forte inhibition de la consommation d'oxygène toujours pour les plus fortes concentrations de xénobiotiques.

L'influence des facteurs environnementaux a été abordée dans la troisième partie de notre travail. En plus du calcul de la CI50, nous avons pu mettre en évidence un effet des variations du pH, de la Température et des UV, sur la toxicité du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur les paramécies.

Ces résultats ont été complétés par une quatrième partie qui a été consacrée à l'étude des bio marqueurs de la toxicité tels que le GSH et l'activité GST ou encore l'activité des enzymes anti-radicalaires telles la Catalase et l'Ascorbate Peroxydase. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation de l'activité de ces enzymes confirmant leur implication dans la métabolisation de ces xénobiotiques et par là même la présence de ROS conduisant à une peroxydation lipidique bien mise en évidence par l'augmentation du taux de MDA.

L'isolement des mitochondries a été la consécration de ce travail. L'effet du Paracétamol et de l'Ibuprofène sur ces organites a mis en évidence un effet toxique sur les mitochondries à travers l'inhibition de la vitesse d'oxydation chez les mitochondries isolées, En plus, de la diminution des valeurs des rapports ADP/O et CR particulièrement aux plus fortes concentrations de xénobiotiques. De plus à ce niveau d'organisation cellulaire, nous avons également mis en évidence une inhibition de l'activité CAT et GPX deux enzymes connues pour leur rôle dans le piégeage des ROS.

Ainsi, il existe actuellement une pollution grave et pernicieuse provoquée indirectement à travers l'utilisation parfois abusive de médicaments. Ces derniers sont rejetés après leur métabolisation par les voies d'excrétions habituelles(les urines notamment) avec pour conséquence leur présence dans les eaux résiduelles. Aussi, nos essais sur la paramécie et un organite cellulaire jugé comme pièce maitresse dans les phénomènes de mort cellulaire, en l'occurrence la mitochondrie ont-ils apporté une confirmation sans équivoque sur la toxicité des substances médicamenteuses et ce même à des concentrations infimes.

Perspectives

- Etendre le champ d'investigation vers d'autres préparations pharmaceutiques et leurs métabolites.
- Compléter l'étude subcellulaire pour éventuellement pouvoir proposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition comme la SOD, les LDH.
- Développer des modèles prédictifs de la toxicité de cocktails médicamenteux.
- Poursuivre les essais sur des voies alternatives pour évaluer la toxicité des médicaments.

A

Abbott W.B ; 1925. A methode for computing the effectiveness of an insecticide.J. Econ. Entomol., 18 pp 265- 267.

Adams S.S, Bough R.G., Cliffe E.E., Lessel B. et Mills R.F.N.,1969. Absorption,distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **15**, 310-330.

Agrawal N, Ray RS, Farooq M, Pant AB, Hans RK., 2007. Photosensitizing potential of ciprofloxacin at ambient level of UV radiation. Photochem Photobiol 83:1226–1236

Aires CC, Ijlst L, Stet F, Prip-Buus C, de Almeida IT, Duran M, et al., 2010. Inhibition of hepatic carnitine palmitoyl-transferase I (CPT IA) by valproyl-CoA as a possible mechanism of valproate-induced steatosis. Biochem Pharmacol; 79: 792-9.

Al-Mutairi, D.A., Craik, I. Batanic-Haberle, L.T. Benov., 2007. Inductions of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridplorphyrin. Free radical research, 41: p.89-96.

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

Asada K. et Takahashi M., 1987. Production and scavenging of active oxygene in photosynthesis in : kyle, D.J., Osmond, C.J Arntzen, C.J(Eds), Photo inhibition : topics in Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, p.227.

Ashelford, K., Fry, J. C., Day, M. J., Hill, K. E., Learner, M. A., Marchesi, J. R., Perkins, C. D., Weightman, A. J., 1997. Using microsoms to study gene transfer in aquatic habitas. FEMS Microbioology Ecology, 23 81-94.

Avdeef A., Box K.J., Comer J.E.A., Hibbert C., Tam K.Y. 1998. Determination of liposomal membrane–water partitioning coefficients of ionizable drugs. Pharmaceut. Res. **15**(2), 209–215.

Azzouz, Z., 2012 .Etude des effets toxiques d‟un fongicide(Amistar Xtra) et d‟un herbicide(Glyphosate) sur la biologie et le comportement de Paramecium tetraurelia.doctorat de l‟université d‟Annaba.141,p84.

B

Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell 120: 483-495.

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

Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T. & Barber, L. B. 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewate contaminants in the United States--I) groundwater. *Sci Total Environ* 402, 192-200.

Beausse, J., 2004. "Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances."TrAC Trends in Analytical Chemistry 23(10-11): 753-761.

Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in Bathy-modiolusazoricus from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquat. Toxicol, 75, p.354–373.

Beers, R.F. y I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol.Chem. 195: 133-140.

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

Benbouzid,H., Berrebbah,H,Berredjem,M., Djebar,M.R., 2012. Toxic effects of phosphoramidate on Paramecuim sp. With special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. Toxicological & Envoronmental Chemistery, DOI : 10.1080/02772248.p.6555-696.

Berger, M.M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20: 48-53.

Bernhard M, Müller J, Knepper T. P., 2006. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. Water Research .40 3419-3428.

Bernuau J, Goudeau A, Poynard T, Dubois F, Lesage G, Yvonnet B, et al., 1986. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis .Hepatology;6:648-51.

Berrebbah, H., 1990. Etude du contrôle de la mobilité flagellaire et ciliaire par le calcium. Effet du lindane, insecticide organochloré. Thèse de Doctorat de l‟Université Pierre et Marie Curie, Paris VII : 144 p.

Berson A, Fau D, Fornacciari R, Degove-Goddard P, Sutton A, Descatoire V., 2001.Mechanisms for experimental buprenorphine hepatotoxicity: major role of mitochondrial dysfunction versus metabolic activation. J Hepatol;34:261—9.

Berson A, Cazanave S, Descatoire V, Tinel M, Grodet A, Wolf C., 2006. The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2- phenoxymethane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. J Pharmacol Exp Ther;318:444-54.

Besse, J. P., et Garric, J.,2008. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. Toxicology Letters .176, 104-123.

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

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

Bonnet, J.L., Guiraud ,P., Dusser ,M., Kadri M., Lafosse J., steiman R., Bohatier J., 2005 . Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotoc microorganisms: Tetrahymena pyriformis and selected micromycetes. Ecotocicology endEnvironmental Safety 60: 87-100.

Boreen, A. L., Arnold, W. A., et McNeill, K., 2003. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquatic Sciences* 65, 320-341.

Borgmann, U., Bennie, D. T., Ball, A. L., et Palabrica, V., 2007. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on Hyalella azteca over multiple generations. *Chemosphere* 66, 1278-1283.

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

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, 55p.

Boulassel, A., Djebar., M.R., Rouabhi R., Djebar, H., 2013. Physiological and biochemical changes observed in alternative cellular model: *Paramecuim tetraurelia* treated with paracetamol. Inter.J.Biosci.9: 1-10.

Bound, J. P., Kitsou, K., et Voulvoulis, N., 2006. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. Environmental Toxicology and Pharmacology 21, 301-307.

Boveris A, Oshino N, and Chance B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J 128: 617- 630,

Boveris A, Chance B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J; 134: 707–716.

Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S., 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. The Science of the Total Environment 311:135-149.

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, 248-254.

Bradley, P. M., Barber, L. B., Kolpin, D. W., McMahon, P. B., et Chapelle, F. H., 2007. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: Implications for use as wastewater indicators. Environmental Toxicology and Chemistry 26, 1116-1121.

Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Hanson, M. L., Sanderson, H., Lam, M. W**., Young, C., Mabury, S. A., Sibley, P. K., et Solomon, K. R., 2004.** Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytesLemnagibba and Myriophyllumsibiricum. Aquatic Toxicology 70, 23-40.

Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery**, M., La Point, T.W., Huggett, D.B. 2003.** Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. Chemosphere 52(1):135-142.

Brunneton J., 1999. Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinale, 3ème édition, Technique et Documentation (Paris) : 310-353.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Russell, L.J. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. (American Society of Plant Physiologists; Rockville, Maryland).

Buser H.-R., Poiger T., Muller M., 1999. Occurence and environmental behavior of chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and wastewater. Environ Sci Technol, 33(15), 2529-2535.

C

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnali, R. et Fanelli, R. ,2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. Environmental Science & Technology, vol. 37, no 7, p. 1241-1248.

Canesi, L., Lorusso, L. C., Ciacci, C., Betti, M., Regoli, F., Poiana, G., Gallo, G., et Marcomini, A., 2007. Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, Mytilusgalloprovincialis. Chemosphere 69, 994-1002.

Carlsson C., Johansson A. K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I : environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci Total Environ 364(1-3), 67-87.

Carrara, C., Ptacek, C. J., Robertson, W. D., Blowes, D. W., Moncur, M. C., Sverko, E., et Backus, S., 2008. Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic system plumes, Ontario, Canada. Environmental Science and Technology 42, 2805-2811.

Chagra, A., Djebar, M. R., Rouabhi R. Berrebbah H., 2009. Cadmium Induced Changes in Metabolic Function of Mitochondrial Isolated from Potato Tissue (*Solanum tuberosum* L.). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 5 (1): 35-39.

Chance B. and Maehly A. C., 1955. assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 2, 764-801.

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

Chen H.J., WU C.F., Huang J.L., 2005. Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS : correlation with cigaterre smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. Toxicol.Lett .1555 :403-410.

Chen C, Krausz KW, Shah YM, Idle JR, Gonzalez FJ., 2009. Serum metabolomics reveals irreversible inhibition of fatty acid _-oxidation through the suppression of PPAR_ activation as a contributing mechanism of acetaminophen induced hepatotoxicity. Chem Res Toxicol;22: 699-707

Chu, S., et Metcalfe, C. D. ,2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1163, 112-118.

Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., 2004. Carbamazepine as anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. Water Research, 38, 947-954.

Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicology Letters 142, 185-194.

Cleuvers, M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, et acetylsalicylic acid. Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 309-315.

Cohen, A.J., Ross Anderson, H., Ostro, B., Pandey, K.D., Krzyzanowski, M., Künzli, N., Gutschmidt, K., Pope, A., Romieu, I., Samet, J.M., Smith, K., 2005. The global burden of disease due to outdoor air pollution. J. Toxicol. Environ. Health Part A 68, 1301-1307.

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

Cotelle, N., 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. Current topics in medicinal chemistry. 1: 569-590.

D

Daughton, C. G. et Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? Environmental Health Perspectives 107, 907-938.

De Wever H., Weiss S., Reemtsma T., Vereecken J., Müller J., Knepper T., Röden O., Gonzalez S., Barcelo D., Hernando M. D., 2007. Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. Water research 41, 935-945.

Djebar M. R. et Djebar H., 2000. Bioénergétique. Les mitochondries végétales. Synthèse. 8 : 23-25.

Djebar M. R. et Moreau F., 1990: *In vitro* conversion of aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by apple mitochondria. Plant Physiol. and Biochem.; 28. (4), 523-530.

Djebar M. R., 1988 : Isolement d'une fraction membranaire convertissant l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique en éthylène chez la pomme et effets de l'éthylène sur les mitochondries végétales. Thèse de Doctorat de l'université Paris VI, UPMC. 188 pages.

Djekoun, M.,Djebar M.R., Zaoui, L., Bensoltan,S., et Djebar, H., 2012. Biochimical, Enzymatic and Energy Alteration observed in saccaromyces cerivisiae subjected to oxidative stress. AEJTS, 2(1),p 36-42.

Doll T.E., Frimmel F.H., 2003. Fate of pharmaceuticals-photodegradation by simulated solar UV-light. Chemosphere 52, 1757-1769.

Dorosz P. , 2007. Guide pratique des médicaments, Ed. Maloine.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol, 186, 241-431.

Duchateau, G., Florkin. , 1959. For treahalosemie of insects and *its* signification. Arch. Insect. Physiol. Biochem**,** 67, 306-314.

Dzialowski, EM, Turner, PK, Brooks, BW. 2006. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in Daphnia magna. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50(4):503-510.

F

Fairgrieve, W. T., Masada, C. L., Peterson, M. E., McAuley, W. C., McDowell, G. C., et Strom, M. S., 2006. Concentrations of erythromycin and azithromycin in mature Chinook salmon Oncorhynchustshawytscha after intraperitoneal injection, and in their progeny. Diseases of Aquatic Organisms 68, 227-234.

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

FDA-CDER., 1996. Retrospective Review of Ecotoxicity Data Submitted in Environmental Assessments.FDACenter for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, USA (Docket No. 96N-0057).

Fent, K., Weston, A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology 76, 122-159.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse B., Paxeus, N., Lo Giudice, R., Pollio A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment ? Environ. Toxicol. Chem**.** 23: 1344-1354.

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

Finney, D.J., 1971. Probits analysis, 3rd., Cambridge University Press, London.

Flippin, J. L., Huggett, D. & Foran, C. M., 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, Oryzias latipes. *Aquat Toxicol* 81, 73-78.

Flohe L and Gunzler WA., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105: 114-121.

Fong, P. 1998. Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors. *Biological Bulletin* 194(2), 143-149.

Fraysse, B., Garric, J., 2005. Prediction and experimental validation of acute toxicity of B-blockers in Ceriodaphnia dubia. Environmental Toxicology and Chemistry 24(10):2470-2476.

Freeman, BA., and Crapo JD., 1982. Hyperoxia increases H_2O_2 release by lung mitochondria andmicrosomes. Arch BiochemBiophys 217: 411-421.

Fréneaux, E., Fromenty, B., Berson, A., Labbe, G., Degott, C., Lettéron, P., et al., 1990. Stereoselective and nonstereoselective effects of ibuprofen enantiomers on mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. J Pharmacol Exp Ther;255:529-35

Friedl, P., Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms, Nature Reviews Cancer 3, 362-374.

Fromenty B., 2010. Drug-induced mitochondrial and metabolic toxicity: Mechanisms and deleterious consequences for the liver. Réanimation. 19(6): 552-567.

G

Gallego S.M., Benavies M., Tomato M.,2002. Involvement of antioxydant defense système in the adaptative reponse to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regul 36 :267-273.

Garric J., Ferrari B., Fraysse B., Mons R., Vollat B. 2006. Effects of some huma pharmaceutical on freshwater organisms | [Impact de medicaments a usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce]. Environnement, Risques et Sante 5 (4):290-295.

Génoscope ; 2007 : Centre National de séquençage .France

Gogendeau D., Keller A-M, Yanagi A., Cohen J., Koll F., 2005. Nd6p, a Novel Protein with RCC1-Like Domains Involved in Exocytosis in *Paramecium tetraurelia*. Eukaryotic Cell; **4(12)**: 2129-2139.

Goldsworthy, G.J., Mordue, W., Guthkelch, J., 1972. Studies on insect adipokinetic hormones. Gen. Comp. Endocrinol**,** 18 (3), 545.

Golet E.M., Xifra I., Siegriest H, Alder A. and Giger W., 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. Environ. Sci. Technol. 37:3243-3249.

Goudable, J ., Favier, A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme. 11: 115-20.

Grara,N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains pollutants industriens sur un animal bioaccumulateur (gasteropode Helix aspersa): Cas des métaux. Thése de doctorat de l'Université de Annaba.120, p.91.

Gray M.W. and Doolittle W.F., 1982. Has the endosymbiot hypothesis been proven Microbiol. Rev. 46, 1-42.

Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, van der Meer R, and Tager JM. 1982. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. J Biol Chem 257: 2754-2757.

Gros, M., Pizzolato, T.-M., Petrović, M., de Alda, M.J.L., Barceló, D. 2008. Trace level determination of β-blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A1189 (1-2):374-384.

Guengerich, F.P., 1991. Reaction and significance of cytochrome P-450 enzymes. Minireview. J. Biol Chem., 2666, p.10019-10022.

H

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130-7139.

Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., HoltenLützhøft H.C., Jørgensen S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosphere 36(2):357-393.

HalliwellBaG, JMC., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine: Oxford University Press.

Hansford RG, Hogue BA, and Mildaziene V., 1997. Dependence of H_2O_2 formation by rat heart mitochondriaon substrate availability and donor age. J Bioenerg Biomembr 29: 89-95,.

Harnagea-Theophilus, E., Gadd, S.L., Knight-Trent, A.H., DeGeorge, G.L. et Miller, M.R. ,1999. Acetaminophen-induced proliferation of breast cancer cells involves estrogen receptors. *Toxicology Applied Pharmacology* 155(3), 273–279.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters, vol. 131, no 1-2, p. 5-17

Henry, T.B., Black, M.C. 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54(2):325-330.

Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A. R., et Barcelo, D.,2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. Talanta 69, 334-342.

Heugens, EH., Jager T, Creyghton R., Kraak. MH., Hendriks AJ., Van Straalen NM, Admiraal W 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on Daphnia magna: accumulation versus sensitivity. Environ Sci Technol 37:2145–2151

Heugens, EH., Tokkie, LT., Kraak, MH., Hendriks, AJ., Van Straalen ,NM., Admiraal W 2006 .Population growth of Daphnia magna under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium. Environ Toxicol Chem 25:1399–1407

Hignite, C., et Aznaroff, D.L., 1977. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutirate and salicylic acid in sewage effluent. Life Sciences 20:337-341.

Hinson, J.A., Kadlubar, F.F., 1988. Glutathione and glutathione transferases in the detoxification of drug and carcinogen metabolites. In Glutathione Conjugation, Mechanisms and Biological Significance, edited by B. Ketterer and H. Sies (London: Academic Press), p. 235-280

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. et Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The Science of The Total Environment, vol. 225, no 1-2, p. 109-118.

Hoeger, B., Dietrich, D. R., Schmid, D., Hartmann, A., etHitzfeld, B., 2007. Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (Salmotrutta f. fario). Ecotoxicology and Environmental Safety. human use contaminating the Italian aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 122, 205-209.

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

Huovinen PS., Soimasuo, MR ., Oikari, AOJ .,**2001.** Photoinduced toxicity of retene to Daphnia magna under enhanced UV-Bradiation. Chemosphere 45:683–691

Huschek, G., Hansen, P. D., Maurer, H. H., Krengel, D., etKayser, A., 2004., Environmental risk assesssment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. Environmental Toxicology 19, 226-240.

I

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., et Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment 346,87-98.

Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., et Previtera, L., 2006. A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct. Chemosphere 63, 785-793.

Isidori, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Rubino, M., et Parrella, A., 2007 . Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. Environment International 33, 635-641.

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

J

Jasso-Chavez., R., Pacheco-Rosales., A, Lira-Silva., E., Gallardo-Perez., J.C, Noemi Garcia, Rafael Moreno-Sanchez.,2010. Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic Euglena gracilis Aquatic Toxicology vol,100, p. 329–338.

Johnson, A. C., Aerni, H. R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., et Suter, M. J. F., 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* 39, 47-58.

Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J., Solomon, K.R., 2007. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. Ecotoxicology and Environmental Safety 67 (1):128-139.

Jones, O.A.H, Voulvoulis N., Lester J.N., 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. Environmental Science and Technology 22:1383-1394.

Jones, O. A., Lester, J. N. et Voulvoulis, N., 2005. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? Trends in Biotechnology, vol. 23, no 4, p. 163-167.

Joss A., Keller E., Alder A. C., Göbel A., McArdell C. S., Ternes T., Siegrist H.. 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. Water research 39 3139-3152.

Jung, JY., Kim, YH., Kim, J., Jung, D-H., Choi, K., 2008. Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in Daphnia magna. Ecotoxicology 17:37–45

K

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., et Guwy, A. J., 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. Water Research.

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecologica lIndicators* 8, 1-13.

Khaldi F., Djebar., H Rouabhi R. and Djebar .M.R., 2009. Cellular reponse of a pollution bioindicator model (Ramalina farinacea) following treatement with fertilizer. American-Eurasian Journal of Toxicologie sciences 1 (2) :69-73.

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

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

Koechlin-Ramonatxo, C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolique. 20:165-177.

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurnman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T.,2002 . Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000 : a national reconnaissance. Environ Sci Technol 36(6), 1202-1211.

Kon, K., Kim, J.S., Jaeschke, H. et al., 2004. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. Hepatology.40(5):1170-9.

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

Kostich, M. S., et Lazorchak, J. M., 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. Science of the Total Environment 389, 329-339.

Kuehn, B. M., 2008. Traces of drugs found in drinking water: Health effects unknown, safer disposal urged. JAMA - Journal of the American Medical Association 299, 2011-2013.

Kümmerer, K., 2001. Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate and risks. Springer, Berlin, Germany,

Kummerer, K., 2004. Pharmaceuticals in the environment. Sources, Fate,Effects and Risks, 2nd Edition.

L

Labbe, G., Pessayre, D., Fromenty, B., 2008. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. Fundam Clin Pharmacol;22:335-53.

Lagadic, L., Caquet, T., Amirad, J-C., and Ramade, F., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux. Ed. Masson. 165-184.

Lahouel M, Ouadi O, Khiari N. 1996. Effets hépatique et hématologique du paracétamol. Saidal **.7**, 60–6.

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

Länge, R., Dietrich, D. 2002. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances-- conceptual considerations. Toxicology Letters 131(1-2):97-104.

Larosche, I., Lettéron, P., Fromenty, B., Vadrot, N., Abbey-Toby, A., Feldmann, G., et al., 2007. Tamoxifen inhibits topoisomerases, depletes mitochondrial DNA, and triggers steatosis in mouse liver. J Pharmacol Exp Ther;321:526-35.

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

Lee SJ, Jin Y, Yoon HY, Choi BO, Kim HC, Oh YK, et al., 2005. Ciclopirox protects mitochondria from hydrogen peroxide toxicity. Br J Pharmacol;145:469-76.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. 30: 1076-1081.

Leverve, XM and Fontaine E. 2001.Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. IUBMB Life 52: 221-229,

Lewis , PA., Horning, WB., 1991. Differences in acute toxicity test results of three reference toxicants on Daphnia magna at two temperatures. Environ Toxicol Chem 10:1351–1358

Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., et Wong, M. H. 2008. Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. Chemosphere.

Lin, A. Y. C., et Reinhard, M., 2005. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**, 1303-1309.

M

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

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

Martínez-Cayuela, M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77: 147-161.

Maskaoui, K., A. Hibberd, et al., 2007. Assessment of the interaction between aquatic colloids and pharmaceuticals facilitated by cross-flow ultrafiltration. Environmental Science and Technology 41 23, 8038-8043.

Masubuchi, Y., Suda, C., Horie, T., 2005. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. J Hepatol;42:110-6.

Medioni C., Ben Ammar W., Houlné G., Chabouté M.E., Jamal F., 2009. Cademium and copper induction of oxidative stress and antioxydative reponse in tomato (Solanum lycopresicon) leaves. Plant Growth Regul, 57 89-99.

Metcalfe, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. Environmental Toxicology and Chemistry 22(12):2872-2880.

Miège, C., Favier, M., Brosse, C., Canler, J-P, Coquery, M., 2006. Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta 70(4):739-744.

Miller DM, Buettner GR, and Aust SD., 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. FreeRadicBiol Med 8: 95-108.

Mitchell ,P .,1977. Vectorial chemiosmotic processes. Annu Rev Biochem 46, 996–1005.

Moldovan Z., 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. Chemosphere 64:1808-1817.

N

Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N ., 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (Oryzias latipes): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. Chemosphere 70:865–873

Nakano , Y., Azada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts : its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodyhydroascorbate radical. Plant Cell Physiol.28, 131-140.

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

O

O'Grady ,JG.,1997. Paracetamol-induced acute liver failure: prevention and management. Clinical journal of gastroenterology 26 suppl1:41–6.

Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature. 427: 630-633.

Oppel, J., G. Broll, et al., 2004. "Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection." Science of The Total Environment 328(1-3): 265- 273.

Otto, L., Roland, B., Roachim, E., 1988. Porin of paramecuim mitochondrial isolation caracterisation and ion selectivity of the close state. Biochimica and biophisica Acta. 978 319-327.

P

Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005. Susceptibility to oxidative stress of mussels (Mytilusgalloprovincialis) in the Venic Lagoon (Italy).Mar.Pollut. Bull, 50, 1548-15557.

Pascoe D., Karntanut W., Muller C.T., 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. Chemosphere. 51: 521-528.

Paxeus, N., 2004. Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil,carbamazepine, β-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. Water Science and Technology 50(5):253-260.

Pépin, J.-M., 2006. Impacts écotoxicologiques de certains médicaments dans l'environnement. Centre universitaire de formation en environnement - Université de Sherbrooke.

Perez-Rama, M., Abalde, A.J., Herrero, L.C. and Torres, E. ; 2001. Classe III metallothioneins in reponse to cadmium toxicity in the marine microalga Tetraselmis suecica(KYLIN) BUTCH. Envirommental Toxicology and Chemistry, 20(9) : 2061 – 2066.

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

Pessayre, D., Mansouri, A., Berson, A., Fromenty, B., 2010. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. Handb Exp Pharmacol;196:311-65.

Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. 63: 1035-1042.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002. Physiological action of antioxidant defences. Nutrition Clinique et Métabolisme. 16: 233-239.

Poiger, T., Buser, H. R., et Muller, M. D., 2001. Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. EnvironmentalToxicology and Chemistry 20, 256-263.

Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., et Calamari, D., 2006. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. Environmental Science and Technology 40, 2442-2447.

Pomati, F., Cotsapas, C. J., Castiglioni, S., Zuccato, E., et Calamari, D., 2007. Gene expression profiles in zebrafish (Daniorerio) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations. Chemosphere 70, 65-73.

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

Prassad, K.V.S.K., Saradhi, P.P., Sharmilia, P., 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassuca juncea. Environ.Exp. Bot.42: 1-10.

Q

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

R

Ra, J. S., Oh, S. Y., Lee, B. C., et Kim, S. D., 2008. The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds. Environment International 34, 184-192.

Rabiet, M., Togola, A., Brissaud, F., Seidel, JL., Budzinski, H., Elbaz-Poulichet, F., 2006. Consequences of treatedwater recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment. Environ Sci Technol;40: 5282–8.

Rafols, C., Roses, M., Bosch, E., 1997. A comparison between different approaches to estimate the aqueous pKa of several non-steroidal anti-inflammatory drugs. Anal Chim Acta 338, 127–134.

Ratushnyak, A., Andreeva, MG., Trushin, MV., 2005. Effects of type II pyrethroids on Daphnia magna: dose and temperature dependences. Riv Biol 98:349–357

Rauckman, E. J., Padilla, G. M., 1987. The isolated hepatocyte: use in toxicology and xenobiotic biotransformations. Londres: Academic Press Inc., 292 p.

Reckngel R.O., Tucory Y., 1977. Fatal susceptibility of free-swimming paramecuim to peroxidizing rat liver microsomes. Exp.Mol.Pathol. 27 :93-105.

Reddersen, K., Heberer, T., Dunnbier, U., 2002. Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere* 49(6), 539-544.

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

Regoli, F., 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, 31,143-164.

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

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

Roberts, P. H., et Bersuder, P.,2006 . Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using highperformance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1134, 143-150.

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

Rouabhi, R., Djebar-Berrebbah,H., and Djebar, M.R.,2006. Evaluation of toxicity of tow pesticides: Flucycloxuron and Diflubenzuron on a cellular model, *Paramecuim sp.comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University,* 71/2a,p.83-90.

Ruepp, SU., Tonge, RP., Shaw, J., Wallis, N., Pognan, F., 2002. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. Toxicol Sci;65:135-50.

S

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

Saye, J. D., Ogunseitan, O. A., Sayler, G. S., Miller, R. V., 1990. Transduction of linked chromosomal genes between pseudomonas aeruginosa strains during incubation in situ a freshwater habitat. Applied and Environmental Microbiology, 56, 140-145.

Sbartai, H., Rouabhi, R., Sbartai, I., Berrebbah, H., Djebar, M.R., 2008. Induction of anti-oxydative enzymes by cadmuim tress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). African Journal of Plant Science , 8 ,72-76.

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

Sbartai, I., Berrebbah, H.,Sbaitai, H., Djebar, M.R., 2012. Ealuation of the toxicity of hydrazine (Bifenzatate) and oxidiazine (indoxacarb) observed in a unicellular eukaryotes: Paramecuim sp.Advanced in Envoronmental Biology,6 (8):2249-2258.

Sbartai,I., 2013. Toxicité d'un Hydrazine carboxylate (Bifenzate) et d'un Oxidiazine (Indoxacarbe) observée chez un modéle cellulaire d'eau douche: Paramecuim sp. These de doctorat de l'université d'Annaba, 132p.

Scheytt, T., Grams, S., et Fell, H., 1998. Occurrence and reactive processes of a drug (clofibric acid) in groundwater. Vorkommen und Verhalteneines Arzneimittels (Clofibrinsaure) imGrundwasser3, 67-77.

Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstadt, R., Heberer, T., 2005. Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. Chemosphere 60(2), 245-53.

Schiedek ,D., Sundelin, B, Readman, JW, Macdonald RW .,2007. Interactions between climate change and contaminants. Mar Pollut Bull 54:1845–1856

Schmidt, LE., Larsen, FS., 2007. Meld score as a predictor of liver failure and death in patients with acetaminophen-induced liver injury. Hepatology;45:789-96.

Schulte-Oehlmann, U., Markert, B., Oehlmann, J., 2007. Development of a biotest with Marisa cornuarietis (Gastropoda : Prosobranchia) for the assessment of environmental chemicals with sex hormone-mimicking effets. Final report for R&D project 297 65 001/04, Federal Environmental Agency, Berlin

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D. 2004. Toxic effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquatic Toxicology 68(2):141-150.

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

Shen, C., Zhang, G., Qiu, H., Meng, Q., 2006. Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. Chem Biol Interact 162:53–61

Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratyneck, C., Newhall, A., Freidman, L., 1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. Analyt. Biochem, **19,** 415-428.

Sonneborn, T. M., 1975. The *Paramecium aurelia* complex of 14 sibling species. Trans. Amer. Microsc. Soc., 94, 155-178.

Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus a Biologies. 327: 649-662.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., F¨orlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R.J., Kimerly, R.A. (Eds.), Biomarkers: Biochemical, Physiological and HistologicalMarkers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 235–335.

Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K., Hartmann, A., 1997. Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage Water. Ecotoxicology and environmental safety. 36 pages 174-179.

Stehly, GR., Hayton, WL., 1990. Effect of pH on the accumulation kinetics of pentachlorophenol in goldfish. Arch Environ Contam Toxicol 19:464–470.

Stevens A., Lowe J., 1997. Anatomie pathologique génerale et special. De Boeck Supérieur. P.552

Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Vianna Rodrigues, S., Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil Science of the Total Environment 225(1-2):135-141.

Sumpter, J. P., et Johnson, A. C.,2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. Environmental Science and Technology 39, 4321-4332.

T

Ternes, T. A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32, 3245-3260.

Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 938(1/2):175–185.

Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, Duszynski J, Westerhoff HV, and Vervoorn RC. 1983. Control of mitochondrial respiration. Biochem Soc Trans 11: 40-43,

Triebskorn R., Casper H., Heyd A., Eikemper R., Kohler H.-R., Schwaiger J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 68: 151-166.

Thibaut, R., Schnell, S., et Porte, C., 2006. The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: An in-vitro study. *Environmental Science and Technology* 40, 5154-5460.

Timbrell J.A., Seabra V., Waterfield C.J., 1995. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. Gen. PharmacolMay;26(3):453-62.

Tixier, C., Singer, H., Oellers, S., Muller, S., 2003. Occurrence and fate of carbamazepine,clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters. Environ Sci Technol **37**(6), 1061– 8.

Trisciuoglio, D., Krasnowska, E., Maggi, A., Pozzi, R., Parasassi, T ., Sapora, O., 2002. Phototoxic effect of fluoroquinolones on two human cell lines. Toxicol In Vitro 16:449–456

V

Van coilli E, R., 2005 . Analyse de risques écotoxicologiques (ENV-789). Recueil de notes. Cours d'analyse de risques écotoxicologiques, Centre de formation universitaire en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 292 p.

Vander Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. Environ.Toxicol. Pharmacol, 13, 57–149.

Venkateswara J.R., Srikanth K., Arepalli S.K., Gunda V.G., 2006 . Toxic effects of acephate on *Paramecuim caudatum* with special emphasis on morphology, behavior, and generation time. Pest.Biochem.Physiol.86 :131-137.

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

W

Webb, S., 2001. A data bases perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. Aquatic risk characterization. In: Kummerer, K. (Ed.), first edition, Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks, Springer-Verlag, Berlin, 205-219.

Winter, M.J., Lillicrap, A.D., Caunter, J.E., Schaffner, C., Alder, A.C., Ramil, M., Ternes, T.A., Hutchinson, T.H. 2008. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquatic Toxicology 86 (3):361-369.

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

Weckberker, G., Cory, G., 1988. Ribonucléotide reductase activity abd growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. Cancer letters ,40 ,p.257-264.

Y

Yalkowsky, S.H., Dannenfelser, R.M., 1992. Aquasol database of aqueous solubility. Version 5, College of Pharmacy, University of Arizona ; Tuscon, AZ.

Yamamoto, T., Tsurumaki, Y., Takei, M., Hosaka, M., Oomori, Y., 2001. In vitro method for prediction of the phototoxic potentials of fluoroquinolones. Toxicol In Vitro 15:721–727

Z

Zaouni, M., 2010. Contribution à l'évaluation de la toxicité aigu et subchronique d'un produit phytosanitaire (Proclaim) chez le rat wistar. Thése de doctorat de l'Université de Annaba. 97, p.47-48.

Zelko, IN., Marian, TJ., Folz, RJ.,2002. Superoxide dismutase multigenefamily : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free radical biology&medicine. 33: 337-349.

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

Zuccato, E., calamari, D., natangelo, M. Et fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. The lancet, 9217, 1789-1790.

Zuccato, E., Castiglioni, S., etFanelli, R., 2005. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. Journal of Hazardous Materials 122, 205-209.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Chiabrando, C., Grassi, P., and Fanelli, R., 2008. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. Water Research 42, 961-968.

Zwiener, C., 2007. Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387, 1159-1162.