



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 DU DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: Toxicologie

Intitulée

**Evaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules
(ZnO) sur deux modèles biologiques unicellulaires
(*Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium* sp)**

Présentée par : Khebbeb Mohamed Nabil

Membres de Jury:

H. Berrebbah, Pr.	Présidente	Université d'Annaba.
M. R. Djebbar, Pr.	Directeur de thèse	Université d'Annaba.
Z. Bouslama, Pr.	Examinatrice	Université d'Annaba.
N. Grara, M.C.A.	Examinatrice	Université de Guelma.
F. Khaldi, M.C.A	Examinatrice	Université Souk Ahras.

Année universitaire: 2015/2016

INTRODUCTION GENERALE	11
GENERALITES ET APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
1. Les nanoparticules (NPs)	18
1.1. Domaines d'utilisation	19
1.2. Les nanoparticules - l'environnement - l'homme	19
1.3. Les nanoparticules d'Oxyde de Zinc ZnO	20
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	20
2.1. Physiologie des levures	22
2.2. Besoins nutritifs	22
2.3. Nutrition carbonée.....	23
2.4. Nutrition azotée	23
2.5. Nutriments spécifiques	23
2.6. Conditions physico-chimiques	24
2.7. Oxygène	24
2.8. Ethanol.....	24
3. Généralités sur les Biomarqueurs	25
4. Généralités sur la paramécie	27
CHAPITRE 1 : STRESS OXYDATIF DU ZNO SUR LES LEVURES	32
4.1. Matériel biologique	32
4.2. Matériel chimique	33
4.2.1. Préparation des nanoparticules de ZnO	33
4.2.2. Concentrations de ZnO utilisées	33
4.2.3. Lavage des levures	33
4.2.4. Milieu de culture et culture des levures	34
4.3. Etude physiologique et polarographique des levures	34
4.3.1. Cinétique de croissance des levures	34

4.3.2.	Pourcentage de réponse	34
4.3.3.	Etude polarographique	35
4.4.	Dosages biochimiques	35
4.4.1.	Extraction des métabolites	35
4.4.2.	Dosage des protéines totales	37
4.4.3.	Dosage des glucides	37
4.4.4.	Dosage des lipides	37
4.5.	Etude biochimique et enzymatique	37
4.5.1.	Suivi de l'activité catalase	38
4.5.2.	Suivi de l'activité superoxyde dismutase (SOD)	39
4.5.3.	Suivi de l'activité enzymatique Glutathion S-transferase (GST)	39
4.5.4.	Dosage du glutathion (GSH)	40
4.5.5.	Mesure du taux de malondialdéhyde (MDA)	41
4.5.6.	Suivi de l'activité Peroxydase	42
4.6.	Analyses statistiques	42
5.	Résultats	43
5.1.	Cinétique de croissance et consommation d'oxygène	43
5.1.1.	Cinétique de croissance des levures	43
5.1.2.	Pourcentage de réponse	44
5.1.3.	Métabolisme respiratoire	45
5.2.	Etude biochimique	46
5.2.1.	Teneur en protéines totales	46
5.2.2.	Teneur en glucides	47
5.2.3.	Teneur en lipides	48
5.3.	Etude biochimique et enzymatique	49
5.3.1.	Evolution du taux de Glutathion réduit (GSH)	49
5.3.1.	Evolution du taux de Malonedialdéhyde (MDA)	50
5.3.2.	Suivi de l'activité catalase (CAT)	51
5.3.3.	Suivi de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)	52
5.3.4.	Suivi de l'activité Peroxydases (GPx et APx)	53
5.3.5.	Suivi de l'activité Super Oxyde Dismutase (SOD totale)	54
6.	Discussion.....	55
	Effet du ZnO sur la croissance de <i>S. cerevisiae</i>	55
	Effet des ZnO-NPs sur le métabolisme respiratoire	56

Effet des ZnO-NPs sur le métabolisme des macromolécules	56
Evaluation du stress oxydatif généré par les ZnO-NPs	57
CHAPITRE 2 : ETUDE GENOTOXIQUE : EFFET DU ZNO SUR L'ADN DES LEVURES.....	61
1. Introduction	61
2. Matériels et méthodes	62
2.1. Traitement et préparation des levures pour la qPCR	62
2.2. Choix des couples d'amorces	62
2.3. Extraction de l'ARN	66
2.3.1. Préparation des solutions du kit	67
2.3.2. Protocole expérimental	67
2.3.3. Vérification de l'ARN	68
2.4. Transcription inverse de l'ARN vers L'ADNc	71
2.4.1. Protocole expérimental	72
2.4.2. qPCR: (Polymerase Chain Reaction) quantitative	73
2.5. Analyse statistique	76
3. Résultats	77
3.1. Vérification des ARN	77
3.2. Efficacité des couples d'amorces	78
4. Discussion.....	82
CHAPITRE 3 : EFFETS DU ZNO SUR LA PARAMECIE PARAMECIUM SP	86
1. Matériel et méthodes	86
1.1. Matériel biologique	86
1.2. Culture des Paramécies	87
1.3. Traitement au ZnO	87
1.4. Cinétique de croissance cellulaire.....	87
1.5. Pourcentage de réponse	87

1.6.	Etude polarographique	88
1.7.	Dosages biochimiques	88
1.8.	Analyses statistiques	88
2.	Résultats	89
2.1.	Cinétique de croissance des paramécies	89
2.2.	Pourcentage de réponse	90
2.3.	Etude du métabolisme respiratoire	91
2.4.	Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA)	92
2.5.	Evolution du taux de Glutathion réduit (GSH)	93
2.6.	Suivi de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)	94
3.	Discussion	95
CONCLUSION GENERALE		98
BIBLIOGRAPHIE		- 111 -

Liste des figures

Figure 1: Saccharomyces cerevisiae en milieu liquide _____	21
Figure2 : Présentation de la paramécie _____	28
Figure 3 Structure d'une paramécie _____	29
Figure 4: Oxygraphe Hansatech _____	35
Figure 5: Extraction des glucides, lipides et protéines des levures _____	36
Figure 6. Effet des concentrations croissantes de ZnO sur la cinétique de croissance de Saccharomyces cerevisiae. _____	43
Figure 7: Pourcentage de réponse des levures traitées à différentes concentrations de ZnO ($m \pm s$; $n=3$) _____	44
Figure 8. Consommation d'oxygène (nmoles d'O ₂ /ml de milieu de culture) chez Saccharomyces Cerevisiae témoin et traitées au ZnO. _____	45
Figure 9: Concentration en protéines totales ($\mu\text{g/ml}$) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n= 3$) _____	46
Figure 10: Concentration en glucides ($\mu\text{g/ml}$) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$) _____	47
Figure 11: Concentration en lipides ($\mu\text{g/ml}$) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$) _____	48
Figure 12 : Concentration en GSH ($\mu\text{moles/mg}$ de protéines) chez S. cerevisiae témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$) _____	49
Figure 13 : Concentration en MDA ($\mu\text{mol/mg}$ de protéines) chez S. cerevisiae témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$) _____	50
Figure 14: Activité de la catalase ($\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$). _____	51
Figure 15: Activité de la Glutathion S-transférase (nmoles/min/mg de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$). _____	52

Figure 16: Activité de la peroxydase (A : GPx et B : APx ; $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)	53
Figure 17: Activité de la Super Oxyde Dismutase (Unités/ mg de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)	54
Figure 18 : différents couples d'amorces utilisés.	64
Figure 19 : micro plaque pour qPCR	66
Figure 20: Matériel pour l'Electrophorèse sur gel d'agarose	68
Figure 21 : migration des ARN par électrophorèse	70
Figure 22 : Vérification sur le lecteur BioRad	70
Figure 23 : Amplificateur PCR « eppendorf flexlid »	72
Figure 24 : Stratagene Mx 3000 pro	74
Figure 25: Vérification des ARN sur gel d'agarose	77
Figure 26 : Courbes d'évaluation de l'efficacité des amorces.	78
Figure 27 : Efficacité des couples d'amorces	79
Figure 28 : Cinétique de croissance de paramécies témoin et traitées au ZnO.	89
Figure 29. Effet des concentrations croissantes de ZnO sur le pourcentage de réponse de Paramecium sp. ($m \pm s$, $n=3$)	90
Figure 30 : Consommation d'oxygène (nmoles d' O_2/ml) chez Paramecium sp. Témoin et traitées au ZnO.	91
Figure 31 : Concentration en MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines) chez Paramecium sp. témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)	92
Figure 32 : Concentration en GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines) chez Paramecium sp. témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)	93
Figure 33 : Suivi de l'activité GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez Paramecium sp. témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$).	94

RESUME :

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

Dans notre travail, nous avons évalué l'effet des ZnO-NPs sur un modèle alternatif, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, largement utilisée en biologie cellulaire et moléculaire.

Le métabolisme, le stress oxydant et la génotoxicité ont été évalués par le suivi de la croissance, la respiration, les différents métabolites et les biomarqueurs du stress oxydatif. L'impact génotoxique du ZnO a été évalué par la méthode qPCR.

De plus, une étude comparative des effets oxydatifs du ZnO a été effectuée entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp.*

Les résultats obtenus montrent que le ZnO induit une inhibition de la croissance et de la respiration cellulaires ainsi qu'une augmentation du taux de protéines et de lipides et une diminution du taux de glucides. Concernant le stress oxydatif généré par le ZnO, nous avons mis en évidence une diminution du taux de GSH et une augmentation du taux de MDA. Les enzymes de détoxification comme la GST, CAT, APX, GPX, SOD ont également vu leur activité augmentée. Nos résultats indiquent clairement le déclenchement d'un stress oxydatif.

Les essais génotoxiques, évalués par la méthode qPCR, ont mis en évidence un effet génotoxique des NPs de ZnO sur 5 gènes étudiés. En effet, après 1 heure de traitement les NPs induisent une augmentation du nombre de sites d'hybridation particulièrement sur les gènes responsables de la respiration et du Glutathion. Ce résultat traduit soit l'apparition de mutations soit de modifications au niveau de l'ADN.

L'étude comparative entre les deux modèles biologiques montre que la paramécie subit un stress oxydatif identique à celui observé chez la levure mais avec un degré de réponse plus accentué chez la paramécie comparativement à la levure, ce qui pourrait être dû à l'absence de paroi rigide chez la paramécie.

Mots-clés : NPs ZnO – *saccharomyces cerevisiae* – *Paramecium sp* – stress oxydatif – Génotoxicité - qPCR.

ABSTRACT :

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) are common nanoparticles and widely used in many fields such as sunscreens, cosmetics, pigments, industrial coatings, plastic additives, semiconductor, textiles and antibacterial agents.

In our work, we evaluated the effect of ZnO-NPs on an alternative model, *Saccharomyces cerevisiae* yeast, widely used in cellular and molecular biology. Metabolism, oxidative stress and genotoxicity were evaluated by monitoring the growth, respiration, the various metabolites and biomarkers of oxidative stress. The genotoxic impact of ZnO was evaluated by qPCR method.

In addition, a comparative study of oxidative effects of ZnO was conducted between *Saccharomyces cerevisiae* and *Paramecium sp.*

Obtained results showed that ZnO induced cell growth, cell respiration inhibition and increased protein and lipid levels and decreased carbohydrate content. Regarding oxidative stress generated by ZnO, results showed a decrease in GSH levels and stimulation of detoxifying enzymes such as GST, CAT, APX, GPX, SOD. Our results clearly indicated the onset of oxidative stress.

Genotoxic tests, evaluated by qPCR method, showed an effect of ZnO-NPs on 5 genes studied. Indeed, after 1 hour of treatment NPs induced an increase of the number of hybridization sites particularly genes responsible for the breathing and Glutathione. It reflects the occurrence of mutations or modifications in the DNA level.

The comparative study between the two biological models (yeast and *Paramecium*) showed that, firstly, *paramecium* undergoes oxidative stress similar to that observed in yeast, and secondly, the degree of response was higher in *Paramecium* compared with yeast response, which could be due to the absence of rigid wall in *Paramecium*.

Key-words: NPs ZnO – *saccharomyces cerevisiae* – *paramecium sp* – oxydative stress – genotoxicity- qPCR.

ملخص:

النانوية أكسيد الزنك هي الجسيمات النانوية المشتركة، واستخدمت على نطاق واسع في العديد من المجالات مثل واقيات الشمس، ومستحضرات التجميل والأصبغ والطلاءات الصناعية والمضافات البلاستيكية، وأشباه الموصلات، المنسوجات وكلاء المضادة للبكتيريا.

في عملنا، قمنا بتقييم تأثير أكسيد الزنك على نموذج بديل، خميرة الخبز، و الذي تستخدم على نطاق واسع في علم الأحياء الخلوي والجزيئي.

عملية تقييم الاكسدة والسمية الوراثية من خلال رصد النمو، والتنفس، ومختلف الأيض والمؤشرات الحيوية من الاكسدة. تم تقييم تأثير السمية من أكسيد الزنك عن طريق أسلوب QPCR.

بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء دراسة مقارنة لآثار المؤكسدة من أكسيد الزنك بين خميرة الخبز والمتناقلة.

أظهرت النتائج أن أكسيد الزنك يؤدي الى تثبيط نمو الخلايا، والتنفس الخلوي وزيادة في مستويات البروتين ومستويات الدهون وانخفاض محتوى الكربوهيدرات. وفيما يتعلق الاكسدة التي تم إنشاؤها بواسطة أكسيد الزنك، ونحن قد أظهرت انخفاضا في مستويات GSH وتحفيز إزالة السموم الإنزيمات مثل ضريبة السلع والخدمات، CAT، APX، GPX، نتائجا تشير بوضوح إلى ظهور الاكسدة.

متى السمية الوراثية تقييمها من قبل طريقة QPCR، أظهروا له تأثير السمية من أكسيد الزنك مصادر القدرة النووية من 5 الجينات المدروسة. في الواقع، بعد 1 ساعة من مصادر القدرة النووية علاج لحث على زيادة عدد المواقع التهجين ولا سيما الجينات المسؤولة عن التنفس والجلوتاثيون. وهذا يعكس إما حدوث الطفرات أو تعديلات في مستوى DNA.

وتبين الدراسة المقارنة بين النماذج البيولوجية اثنين من ذلك، أولا، متناقلة يخضع الاكسدة مماثلة لتلك التي لوحظت في الخميرة، وثانيا، درجة استجابة أعلى بالمقارنة مع الخميرة، التي يمكن أن تكون بسبب غياب جدار صلب في المتناقلة.

Introduction générale:

L'utilisation de nanoparticules (NPs) a extrêmement augmenté dans les procédés domestiques et industriels au cours de ces dernières années. Ces NPs présentent des caractéristiques physiques et chimiques uniques en raison de leur grand rapport surface sur volume, de leur taille extrêmement réduite, et de leurs propriétés optiques (Xiao *et al.*, 2008).

Les nanoparticules métalliques (MNP) possèdent des propriétés catalytiques particulières (Migowski et Dupont 2007) et au cours de la dernière décennie, le domaine de la nanocatalyse a énormément progressé (Narayanan et El-Sayed 2005).

Les applications utilisant des MNP sont nombreuses et touchent les domaines de la biotechnologie (Sönnichsen *et al.*, 2005), la bio détection (Wang *et al.*, 2001; Kwon et Bard 2012), le diagnostic clinique et la thérapie (Jain *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2014), la sécurité alimentaire (Ricke et Hanning 2013), l'eau et le traitement des eaux usées (Patil et Parikh 2014). De ce fait, un investissement énorme s'est développé pour la recherche en nanotechnologie.

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

Les nanoparticules d'oxyde de Zinc (ZnO-NPs) sont des nanoparticules communes et largement utilisées dans de nombreux domaines tels que les produits de protection solaire, les cosmétiques, les pigments, les revêtements industriels, les additifs de matière plastique, semi-conducteurs, les textiles et les agents antibactériens (Li *et al.*, 2012).

La production mondiale de nanoparticules à destination des produits de protection solaire, par exemple, a été estimée à environ 1000 tonnes au cours des années 2003/2004, principalement constituées de ZnO et de TiO₂ (Borm *et al.*, 2006).

La production et l'utilisation généralisée des ZnO-NPs augmente le risque de contamination de l'environnement, bien qu'en 2007, les concentrations de ZnO dans l'environnement aient été estimées à moins de 100 pg/L dans l'eau et à quelques mg/kg

dans le sol (Boxall *et al.*, 2007). Cependant, les niveaux de ZnO tendent à augmenter de plus en plus compte tenu des nombreuses applications utilisées actuellement. Toutefois, les informations sur les effets écotoxicologiques des ZnO-NPs sont encore limitées.

La plupart des travaux ont porté sur l'activité antimicrobienne des ZnO-NPs, principalement sur des cultures pures (Shen *et al.*, 2015).

De nombreuses espèces y compris les espèces de bactéries pathogènes (telles que *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Campylobacter jejuni*) (Applerot *et al.*, 2009 ; Jin *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009 et Xi *et al.*, 2011) et les espèces écologiques (telles que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* et *Shewanella oneidensis*) (Adams *et al.*, 2006 ; Gajjar *et al.*, 2009 ; Jones *et al.*, 2008 et Wu *et al.*, 2010) ont été testées et les résultats ont montré des degrés de toxicité variables.

Ces résultats ont surtout mis en évidence la sélectivité de la nature toxique des ZnO-NPs sur les systèmes bactériens et l'incidence de la taille des particules sur la toxicité. Les mécanismes proposés incluent la dissolution des ZnO-NPs en des ions zinc (Zn^{2+}), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'interaction directe avec les cibles biologiques (Ma et Diamond, 2013). De plus, ces mécanismes sont influencés par les conditions environnementales (Li et Lin, 2011).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée en alimentation (fabrication de pain, de la bière et du vin...). On désigne sous le nom de levures les champignons eucaryotes immobiles, microscopiques et unicellulaires ou qui représentent, au cours de leur développement, une phase unicellulaire (Leyral et Vierling, 2007).

Les levures sont de plus en plus considérées comme modèle alternatif de par leur faible coût et leur facilité de culture. Ce sont des organismes unicellulaires eucaryotes dont le caractère diploïde (cas des levures *Saccharomyces cerevisiae*) les rapproche plus des espèces supérieures que les bactéries. Plusieurs types de réponse après exposition des levures à des polluants peuvent être détectés (Fujita *et al.*, 1998 ; Haubenstricker *et al.*, 1990 ; Iwahashi *et al.*, 2000 ; Tomaska, 2000).

S. cerevisiae a particulièrement été utilisée pour l'étude du stress oxydatif et du vieillissement (Unlu et Koc, 2007), mais également dans l'évaluation toxicologique des produits chimiques tels que les métaux lourds (Kungolos *et al.*, 1999; De Freitas *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2004), les médicaments anticancéreux (Buschini *et al.*, 2003), les

herbicides (Cabral *et al.*, 2003) et les conservateurs alimentaires tels que les acides monocarboxyliques (Kasemets *et al.*, 2006).

Par contre, très peu de données existent sur la toxicité des nanoparticules vis-à-vis de *S. cerevisiae* (Kasemets *et al.*, 2009).

En effet, la majorité des travaux consultés portent sur des organismes unicellulaires et des cultures de cellules eucaryotes. Les données toxicologiques des effets des nanoparticules métalliques portent sur des lignées cellulaires de mammifères (Brunner *et al.*, 2006; Limbach *et al.*, 2007; Karlsson *et al.*, 2008), de bactéries (Adams *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Heinlaan *et al.*, 2008; Mortimer *et al.*, 2008) et d'algues (Hund-Rinke et Simon, 2006; Franklin *et al.*, 2007; Aruoja *et al.*, 2009).

Kahru *et al.*, (2008) ont souligné que dans le cas des nanoparticules métalliques, comme le ZnO, la libération d'ions métalliques peut expliquer leur écotoxicité.

En effet, la toxicité des nanoparticules de ZnO sur les bactéries *Vibrio fischeri* est causée par la libération d'ions Zn^{2+} dissous (Heinlaan *et al.*, 2008). Allant dans le même sens, Brunner *et al.*, (2006) ont montré que la cytotoxicité de nanoparticules d'oxyde de métal (ZnO, CeO₂, ZrO₂, SiO₂, Fe₂O₃) sur des cultures *in vitro* de cellules de mammifères est due à la solubilité de ces nanoparticules.

Ce mécanisme d'action s'applique parfaitement aux bactéries et aux algues unicellulaires ; par contre, la cytotoxicité vis-à-vis des levures ne pourrait s'expliquer uniquement par ce mécanisme du fait de la présence d'une paroi rigide qui devrait empêcher l'absorption directe des ions dissous et de la forte tolérance des levures vis-à-vis des ions Zn (Kasemets *et al.*, 2009).

Selon Ma et Diamond (2013), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'interaction directe avec les cibles biologiques pourraient également expliquer la cytotoxicité des NPs envers *S. cerevisiae*.

La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est l'un des mécanismes les plus cités pour expliquer le stress oxydatif des xénobiotiques (Kasemets *et al.*, 2009 ; Sharifi *et al.*, 2012 ; Ma et Diamond (2013). Actuellement, le meilleur moyen de mettre en évidence un stress oxydatif est d'évaluer l'activité de biomarqueurs cellulaires.

Introduction générale

Les biomarqueurs sont des outils mis en œuvre pour établir un diagnostic de risque environnemental en général, et plus particulièrement, pour aider au diagnostic de contamination et à la gestion du risque toxique (Galloway *et al.*, 2006 ; Hagger *et al.*, 2008). Leurs usages et leur intérêt, notamment dans la détermination du risque de pollution, sont devenus incontournables.

Le terme biomarqueurs se réfère à tous les paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1994).

En réponse à une exposition à des polluants, l'organisme peut être directement perturbé ou va tenter de s'adapter par une série de mécanismes biologiques.

Ainsi, le biomarqueur mesuré sur un organisme (au niveau infra-cellulaire, cellulaire ou tissulaire) peut être interprété comme une réponse adaptative à un stress, telle qu'une pression toxique, ou encore comme un signal d'alerte d'apparition ultérieure de perturbations du fonctionnement de l'organisme, voire de sa population (Garric *et al.*, 2010).

Certains biomarqueurs peuvent contribuer à caractériser le type de contamination chimique.

Ils sont généralement classés en biomarqueurs d'exposition (Glutathion S-transférase, Acétylcholine estérase, Glutathion réduit, Protéines, activité EROD...), lorsqu'ils signalent l'activation de mécanismes de régulation intrinsèques au métabolisme de l'organisme (qui jouent alors un rôle de système d'adaptation et de défense), ou en biomarqueurs d'effet (Peroxydation lipidique, enzymes antioxydantes comme la catalase, la superoxyde dismutase, les peroxydases...), qui diagnostiquent un dépassement, éventuellement transitoire des capacités de régulation de l'organisme avec des conséquences sur la viabilité (cellule, tissu, individu) (Hagger *et al.*, 2008).

Actuellement, les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux dommages que pourraient causer les NPs à l'ADN. Mesurer la génotoxicité au niveau de l'ADN présente plusieurs avantages (sensibilité et temps de réponse courts).

Les récents développements dans la technologie de marqueurs moléculaires ont fourni de nouveaux outils pour la topographie de l'ADN génomique afin de mettre en

évidence divers types de dommages et de mutations de l'ADN des bactéries, des plantes, des animaux et des cellules (Atienzar *et al.*, 1999).

La technique de la RAPD est une réaction PCR plus simple et plus rapide que les outils classiques de l'analyse génotoxique, car elle est capable de détecter non seulement des mutations ponctuelles, mais aussi des modifications temporaires dans l'ADN (Labra *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004).

La plupart des travaux a porté sur la génotoxicité des NPs sur les plantes (Singh *et al* 2009; López Moreno *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2010; Atha *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) et, à notre connaissance, peu d'études se sont penchées sur les effets génotoxiques des NPs et plus particulièrement des ZnO-NP sur les bactéries et les levures.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'évaluer non seulement le stress oxydatif induit par le ZnO-NP chez la levure *S. cerevisiae*, mais également les effets génotoxiques éventuels pouvant apparaître sur l'ADN des levures. Notre étude comporte quatre principales parties :

1. Les effets du ZnO (à différentes concentrations) seront d'abord évalués sur la cinétique de croissance des levures, le métabolisme respiratoire (par la mesure de la consommation d'O₂), le pourcentage de réponse des cellules au traitement et l'impact du traitement sur le métabolisme (par la quantification des concentrations en protéines, lipides et glucides des levures).
2. Une étude toxicologique sera ensuite menée pour évaluer les capacités de défense des levures suite au traitement. Divers biomarqueurs seront évalués (Taux de Glutathion réduit, et de Malondialdéhyde, ainsi que plusieurs activités enzymatiques de défense contre le stress oxydatif (la Catalase, la Glutathion S-transférase, les Peroxydases et la Superoxyde dismutase).
3. Cette 3^{ème} partie portera sur l'effet génotoxique du ZnO sur les levures en utilisant la qPCR qui nous permet de mettre en évidence les dommages causés à l'ADN (mutations et modifications temporaires).
4. Nous achèverons ce travail par une étude comparative entre la levure et une bactérie ciliée (la paramécie) traitées à différentes concentrations de ZnO, en évaluant certains paramètres physiologiques (courbe de croissance, consommation d'O₂, pourcentage de réponse) et toxicologiques (Glutathion réduit, Malondialdéhyde et activité de la Glutathion S-transférase) afin de

Introduction générale

mesurer et de comparer le degré de sensibilité de ces deux organismes unicellulaires aux ZnO-NPs.

Généralités
et
aperçu bibliographique

Généralités et aperçu bibliographique

1. Les nanoparticules (NPs) :

Les nanoparticules sont des éléments dont la taille est comprise approximativement entre 1 et 100 nanomètres, 1 nanomètre étant 1 milliard de fois plus petit qu'un mètre.

A titre de comparaison, il existe le même rapport de taille entre une orange et la Terre qu'entre une nanoparticule et une orange. Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des comportements particuliers et des propriétés très intéressantes. Les nanotubes de carbone par exemple, sont 100 fois plus résistants que l'acier.

Le terme de nanoparticules fait référence à différentes familles de particules (Sajid *et al.*, 2015, pour revue) telles que :

- Les oxydes de métaux (titane, cuivre, zinc, aluminium, silicium),
- Les nanotubes de carbones, qui forment des fibres solides aux propriétés électriques particulières,
- Les fullérènes [C60, C70], utilisées pour améliorer les propriétés électriques et optiques de polymères ou pour des applications pharmaceutiques,
- Les nanopoudres d'argent, dont les propriétés antibactériennes sont mises à profit notamment dans le textile.

La présence des NPs peut affecter négativement l'environnement et entraîner des effets toxiques sur les organismes vivant dans les sols ou l'eau (Waalewijn-Kool *et al.*, 2013).

Les données écotoxicologiques sont nécessaires pour établir une évaluation des risques pour cette classe de substances. L'utilisation des NPs manufacturées est un domaine relativement nouveau de la science et la technologie et les principaux travaux portant sur les NPs et l'écotoxicité datent de 2006 (Kahru et Dubourguier, 2010).

Pour rappeler le potentiel de contamination des NPs, il est important de savoir que 2g de NPs de 100 nm de diamètre sont suffisants pour entraîner l'exposition de chaque être humain sur terre avec 300000 particules (Hardman 2006).

1.1. Domaines d'utilisation :

L'industrie de la nanotechnologie est en constante évolution et la nanotechnologie est présente de plus en plus dans les produits de consommation.

Cosmétiques, emballages, automobiles, textiles, les nanoparticules ont envahi notre quotidien (Sajid *et al.*, 2015). Les industriels y voient la solution à de nombreux problèmes car ces toutes petites particules possèdent des propriétés physico-chimiques que n'ont pas les particules plus grosses.

Ainsi, l'exposition de l'environnement par les nanoparticules (NPs) est une conséquence inévitable. Il est prouvé que plus de 500 produits de consommation sur le marché sont liés à la nanotechnologie (Jones et Grainger 2009).

1.2. Les nanoparticules - l'environnement - l'homme :

On sait que les nanoparticules ont des niveaux d'interaction et de pénétration plus importants que leurs homologues macros (Sajid *et al.*, 2015).

Le danger potentiel provient de leur petite taille, qui facilite leur passage à travers les cellules de l'organisme puis vers la circulation sanguine et les organes internes. Etant 50 000 fois plus petites qu'un cheveu, leurs dimensions sont inférieures à celles des particules atmosphériques ultrafines, reconnues comme cancérogènes par l'OMS en juin 2012 !

Par ailleurs, les nanoparticules présentent une surface spécifique (rapport surface/masse) énorme, ce qui augmente leur capacité d'interactions avec les organismes vivants.

Le phénomène est identique avec un carré de chocolat et du chocolat en poudre : plongés dans un bol de lait chaud, le carré de chocolat ne va pas fondre totalement tandis que le chocolat en poudre, va se dissoudre immédiatement.

Les nanoparticules pourraient également servir de « cheval de Troie » pour les autres polluants présents dans l'environnement. Certaines nanoparticules ont, en effet, la propriété d'adsorber à leur surface des molécules qui peuvent être toxiques.

Dans ces conditions, la toxicité ne relève pas de la nanoparticule elle-même mais des substances véhiculées à sa surface et qui peuvent ainsi pénétrer parfois plus facilement dans l'appareil respiratoire.

1.3. Les nanoparticules d'Oxyde de Zinc ZnO:

Selon différentes sources, la production mondiale annuelle de ZnO-NPs est estimée entre 550 (Piccinno *et al.*, 2012) et 33.400 tonnes (Research and Markets, 2012).

Ainsi, parmi les NPs contenant des métaux, le ZnO est le troisième plus haut volume global de la production après les nanoparticules de SiO₂ et TiO₂ (5.500 et 3.000 tonnes par an, respectivement) (Piccinno *et al.*, 2012).

Les ZnO-NPs sont essentiellement utilisés comme un additif de dispersion de la lumière UV dans le domaine cosmétique, tels que les filtres solaires, les dentifrices et les produits de beauté (Serpone *et al.*, 2007).

Ils sont également largement utilisés dans la fabrication du caoutchouc, la production de cellules solaires et LCD, de pigments (comme agent de blanchiment), de fibres textiles (Dastjerdi et Montazer 2010; Song *et al.*, 2010).

En outre, le ZnO est un ingrédient essentiel dans presque tous les types de peintures antisalissure et récemment les ions ZnO ont été de plus en plus remplacés par les ZnO-NPs en raison de leurs propriétés antibactériennes (Padmavathy et Vijayaraghavan 2008).

2. *Saccharomyces cerevisiae*:

La levure est une cellule eucaryote avec une paroi cellulaire rigide entourant une membrane plasmique, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites dont les mitochondries et une grande vacuole (Thuriaux, 2004).

C'est un matériel de choix qui a fait l'objet de plusieurs travaux (Pineau., 2008 ; Grioras, 2005 ; Jawich, 2005 ; Todorova, 2007 ; Tijana, 2015 ; Neheme, 2008 et Fréchin, 2010) et qui est utilisé depuis des millénaires par l'homme aussi bien en industrie agroalimentaire (fabrication de nombreux aliments et boissons), qu'en

industrie pharmaco chimique (Van Maris et al 2006 ; Vargas et al., 2010 ; Kocharin, 2013 ; Accituno, 2013). Les levures sont de plus en plus utilisées en écotoxicologie comme modèle alternatif de par leur faible coût et leur facilité de culture. Plusieurs types de réponse après exposition des levures à des polluants peuvent être détectés (Fujita *et al.*, 1998 ; Haubenstricker *et al*, 1990 ; Iwahashi *et al*, 2000 ; Tomaska, 2000).

Ce sont aussi des organismes unicellulaires eucaryotes dont le caractère diploïde (cas des levures *Saccharomyces cerevisiae*) les rapproche plus des espèces supérieures que les bactéries. Le génome complet de *Saccharomyces cerevisiae* est disponible depuis 1996.

Génétiquement et physiologiquement, *Saccharomyces cerevisiae* est l'espèce la plus caractéristique, elle montre une complexité génétique intermédiaire entre les organismes eucaryotes et procaryotes.

L'origine du terme levure provient du mot latin <levare> qui veut dire <lever> (Oteng et Gyang, 1984) mais n'est pas forcément synonyme de fermentation qui n'existe que chez certaines espèces à l'instar de la plus connue, la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae* (fig.1) dont le nom fait référence au fait que c'est un champignon <myces> qui se nourrit de saccharose <saccharo> et y est utilisé dans la fabrication de la bière et du vin (*cerevisiae* pour cervoise nom qu'on donnait autrefois à la bière).

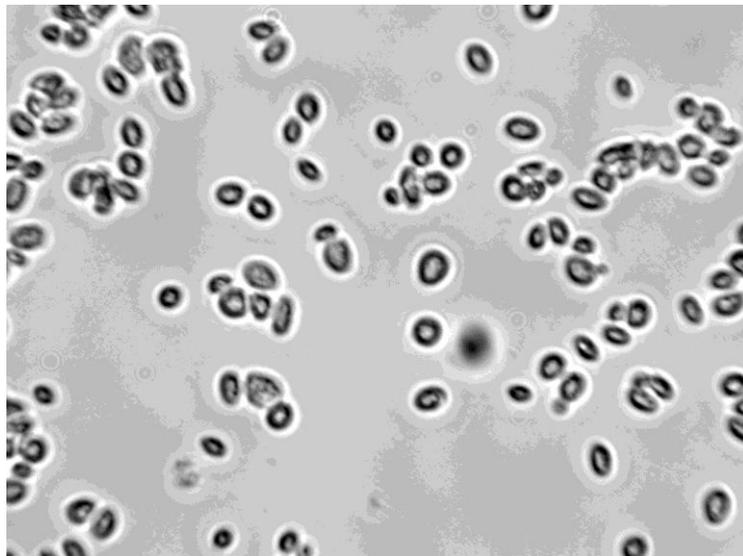


Figure 1: *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide (Konig, 2009).

On désigne sous le nom de levures les champignons eucaryotes immobiles, microscopiques et unicellulaires ou qui représentent, au cours de leur développement, une phase unicellulaire (Leyral et Vierling, 2007).

Elles furent reconnues comme des champignons par De Bary en 1866 lorsqu'il détecta des ascospores chez les levures de bières. Elles sont très répandues, on peut même les trouver dans différents milieux sucrés (fruits, nectar de fleurs...) mais aussi en sel (salaisons), à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants (dans le tube digestif des animaux et des insectes), elles peuvent persister libres dans les sols, les eaux et l'atmosphère (Scriban, 1993 et Bacha, 2008).

Cette large abondance dans l'environnement est due à une grande capacité d'adaptation métabolique et à des sources nutritives très variées due en majeure partie à une large gamme d'enzymes extra et intracellulaires.

Les levures possèdent une grande tolérance, ainsi elles survivent à des températures allant de 0° à 55°C, là où leur température optimale de croissance se situe entre 25°- 30°C. Elles préfèrent les milieux acides mais s'adaptent aussi à tous les pH de l'ordre de 2,8 à 8, excepté les extrêmes (Leyral et Vierling, 2007). Elles ont une tolérance presque complète vis-à-vis de la dessiccation (déshydratation des levures) et peuvent résister à une pression osmotique de l'ordre de 3M, en plus d'une forte tolérance alcoolique jusqu'à 20%. (Jackson, 1994 ; Panon, 1997 et Van Maris *et al.*, 2006).

2.1. Physiologie des levures

Plusieurs caractéristiques physiologiques des levures contribuent à leur succès en tant que microorganismes industriels.

2.2. Besoins nutritifs :

Pour leur vie, pour leur développement et pour l'expression de leurs propriétés, les microorganismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs. Leur croissance est considérée comme une série d'interaction entre la cellule et l'environnement, celui-ci devant fournir les éléments nécessaires à la nutrition et, de plus, sous la forme utilisable par ces microorganismes.

2.3.Nutrition carbonée

Le carbone est le composé majeur de la cellule, il constitue environ 50% du poids sec (Bocquet, 1993). Les composés carbonés sont utilisés à la fois comme source d'énergie, fournie par leur oxydation, et de carbone exigé pour la biosynthèse des constituants cellulaires (Arnaud et Guiraud, 1993).

Les glucides sont les plus utilisés : glucose, fructose et mannose sont consommés par plus de 400 espèces décrites (Botton, 1991) ; *Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'utiliser les pentoses alors que certaines espèces de *Metschnikowia* peuvent convertir le D- Xylose en éthanol (Bouix et Leveau, 1993).

La voie de dégradation des glucides est la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate, la destinée de celui-ci dépend surtout du type de levure considéré.

Pour les aérobies strictes, le pyruvate est complètement oxydé par le cycle de Krebs couplé avec la chaîne respiratoire ; tandis que chez les anaérobies facultatives, la respiration et la fermentation contribuent ensemble à la dégradation du glucose. Selon la prédominance de l'un ou l'autre des deux métabolismes on peut distinguer le type oxydatif et le type fermentaire (Botton, 1991 ; Freire-Picos *et al.*, 1995). Pour ce dernier, les glucides sont surtout transformés en éthanol, une petite proportion va former du glycérol (Martinez *et al.*, 1998).

2.4.Nutrition azotée

L'azote est quantitativement le substrat de deuxième importance pour la levure (Bocquet, 1993), son rôle est capital car il est constitutif des molécules simples et des macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (Bouix et Leveau, 1993). La plupart des levures sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples, mais aussi des composés organiques divers tels que les acides aminés et les peptides (Botton, 1991).

Saccharomyces cerevisiae est incapable d'utiliser les nitrates (Bouix et Leveau, 1993) et les nitrites sont toxiques pour beaucoup d'espèces (Botton, 1991).

2.5.Nutriments spécifiques

Certaines substances sont nécessaires à des concentrations assez faibles.

Les minéraux et oligo-éléments (sodium, fer, calcium, chlore, magnésium et autres) sont souvent fournis par les impuretés des autres ingrédients. La majorité représente des constituants essentiels des systèmes enzymatiques (Bocquet, 1993).

Les facteurs de croissance agissent sur la multiplication et l'activité cellulaire, leur carence perturbe le métabolisme (Bocquet, 1993).

La thiamine joue un rôle dans le métabolisme respiratoire, le métabolisme des lipides, la glycolyse et la fermentation alcoolique (Bouix et Leveau, 1993), et les déficiences en pyridoxine et acide pantothénique (incorporé dans les coenzymes A) peuvent altérer le métabolisme de la levure (Jackson, 1994).

2.6. Conditions physico-chimiques

Outre les exigences nutritives, le développement microbien est sous la dépendance de paramètres environnementaux créés autour de lui par son milieu. Les levures tolèrent de larges gammes de pH (de 3 à 8), et la température optimale de leur culture se situe entre 25 et 30°C.

2.7. Oxygène

Le développement de la levure et la fermentation ne sont pas possibles en l'absence complète d'oxygène ; il n'y a pas de levures anaérobies strictes (Bouix et Leveau, 1993).

Une anaérobiose partielle augmente l'utilisation du glucose par la levure et améliore sa production de biomasse et sa capacité fermentaire, en permettant la biosynthèse des stérols et des acides gras insaturés à longues chaînes constitutifs des membranes (Charpentier, 1993).

2.8. Ethanol

Selon les souches et l'état physiologique de la culture, l'éthanol est toxique pour des concentrations de 8 à 18 % en volume et peut entraîner la mort des cellules (Charpentier, 1993).

Les molécules d'éthanol vont se substituer aux molécules d'eau à l'intérieur de la membrane plasmique, réduisant ainsi sa fluidité et sa perméabilité et entraînant une inhibition du transport de substrat (Strephaiano et Delia-Dupuy, 1996).

Toutefois, les levures ont la possibilité de corriger l'action de l'éthanol en augmentant la proportion d'acides gras insaturés à longue chaîne et des stérols membranaires (Charpentier, 1993).

3. Généralités sur les Biomarqueurs :

Selon Lagadic *et al.* (1997), les biomarqueurs sont "des changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant".

Certains pesticides peuvent pénétrer dans les organismes. Ils se répartissent alors au sein des tissus où ils interagissent avec diverses molécules biologiques. Les interactions moléculaires se traduisent par une (ou des) variation(s) de paramètres biochimiques, lesquels peuvent alors être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition de l'organisme aux toxiques.

Certains changements biochimiques peuvent avoir des effets physiologiques sur les individus. Lorsqu'un grand nombre d'individus est affecté, les effets des toxiques sont décelables au sein des populations dont les performances écologiques (taux de croissance, expansion, efficacité d'utilisation des ressources, adaptabilité...) peuvent être perturbées.

A terme, les déséquilibres causés par la disparition ou, au contraire, l'expansion excessive de quelques populations (bioindicateurs) peuvent se répercuter sur l'ensemble des communautés, modifiant ainsi le fonctionnement de l'écosystème dans son ensemble (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Il est fréquent que les biomarqueurs soient répartis en trois catégories : les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effets de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition (Setac, 1992).

Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant a pénétré dans l'organisme. Ils correspondent fréquemment au résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques présentes dans l'organisme intoxiqué : métabolites spécifiques de la conjugaison au glutathion ou à d'autres substrats endogènes (Lagadic *et al.*, 1997 ; 1998).

Les biomarqueurs d'effet permettent de montrer que le polluant a pénétré dans l'organisme, qu'il s'est éventuellement réparti entre les différents tissus et qu'il a interagit avec une ou des cibles biologiques (Garric *et al.*, 2010).

De nombreux paramètres utilisés comme biomarqueurs joueraient un rôle fonctionnel dans l'organisme, y compris parfois en l'absence de contaminants (Depledge, 1994).

Pour des faibles concentrations individuelles de toxique et/ou si l'exposition est brève (paramètres variables selon l'espèce, l'âge, le stade de développement, etc.), les biomarqueurs contribuent essentiellement au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Lorsque la concentration et/ou la durée d'exposition augmentent, certains biomarqueurs interviennent pour compenser l'action des contaminants, notamment en limitant leur toxicité (biomarqueurs de compensation: EROD, métallothionéines par exemple) (Depledge, 1994).

D'autres biomarqueurs, au contraire, reflètent l'action toxique des contaminants (biomarqueurs de non-compensation : inhibition de l'AChE, formation d'adduits aux macromolécules par exemple).

Pour des concentrations plus élevées et/ou des durées d'exposition plus importantes, les biomarqueurs de compensation ne suffisent plus à limiter l'action des polluants toxiques, et l'état de santé des individus se dégrade de façon fréquemment irréversible ; l'issue est alors fréquemment fatale, même lorsque l'exposition a cessé (Depledge, 1994).

Généralités et aperçu bibliographique

Le tableau suivant montre les biomarqueurs biochimiques et moléculaires courants pour une recherche d'exposition et/ou d'effet (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Tableau 1 : biomarqueurs biochimique et moléculaire (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

	Biomarqueurs	Commentaires	Effets	Substances chimiques
Biomarqueurs d'exposition	CYP 1A1, expression et activité EROD, BaP hydroxylase, Glutathion-S-transferase	Les activités monooxygénases impliquant diverses isoformes de cytochromes P450 (la mesure la plus connue est l'induction de l'activité enzymatique EROD) sont impliquées dans le métabolisme des composés endogènes lipophiles, et sont inductibles par des substances exogènes.	Induction	Pesticides organochlorés, PCBs, dioxines, HAPs, BaP, non spécifique
	Protéines multi, xénobiotique, résistance (MXR)	Les protéines de transport membranaire (système MXR/MDR) peuvent être induites ou inhibées par diverses substances organiques. C'est un mécanisme de défense cellulaire qui permet à la cellule transporter des métabolites ou des xénobiotiques.	Induction/ inhibition	Substances organiques (HAPs, PCBs et métabolites...)
	Acétyl cholinestérase	Activité enzymatique du métabolisme de neurotransmetteurs.	Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Vitellogénine	Protéines de réserves des œufs synthétisés dans le foie.	Induction (mâle)	Perturbateurs endocriniens
	Métallothionéines/ phytochélatines, protéines de stress	Les métallothionéines (MTs) et phytochélatines (PCs) normalement exprimées dans les tissus, impliquées dans l'homéostasie des métaux, peuvent être surexprimées en présence de métaux, mais aussi de composés organiques aromatiques inducteurs de stress oxydatif cellulaire.	Induction	Métaux, autres xénobiotiques
	Dommage ADN, adduits ADN	Les polluants (HAPs, organiques persistants...), comme des facteurs physiques, peuvent altérer de différentes façons l'intégrité de la structure de l'ADN (cassure simple et double brin, liaison ADN, dommages chromosomiques), soit directement soit via leurs métabolites.	Occurrence	Mutagènes, génotoxiques
Dommage ADN	Occurrence		Mutagènes, génotoxiques ?	
Biomarqueurs d'effet	Acétyl cholinestérase		Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Peroxydation lipidique	Des polluants peuvent augmenter les niveaux cellulaires de molécules oxygénées fortement réactives (ROS), soit par une induction de synthèse soit par une inhibition des mécanismes de défense. Lorsque ces derniers sont débordés les lipides membranaires, les protéines cellulaires sont endommagées par des réactions de peroxydation. Ces processus peuvent être mesurés et utilisés comme indicateurs de stress.	Induction	Non spécifiques
	Enzymes antioxydantes		Induction/ inhibition	
	Intégrité lysosomiale	La stabilité de la membrane semi-perméable des lysosomes est un indicateur de l'état de la cellule.	Diminution	

4. Généralités sur la paramécie :

La paramécie est une espèce eucaryote unicellulaire facile à cultiver, sa taille permet de suivre à faible grossissement le cycle cellulaire, la conjugaison, le

comportement, la sécrétion, la morphogenèse, et les mutations touchant une gamme de fonctions cellulaires. Plusieurs particularités biologiques en font d'une part, un modèle de choix et d'autre part, le processus d'autogamie, qui produit des clones 100% homozygotes, simplifie l'analyse toxicologique.

C'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.

C'est une cellule allongée à la forme d'une pantoufle, dont l'extrémité antérieure est arrondie et l'extrémité postérieure effilée. Cette cellule de grande taille (à peu près 130 μm) a une polarité dorso-ventrale, la face ventrale étant reconnaissable par la présence d'une grande invagination correspondant à l'appareil oral. Sur la face dorsale se trouvent deux vacuoles pulsatiles (fig.2) (Gogendeau, 2005).

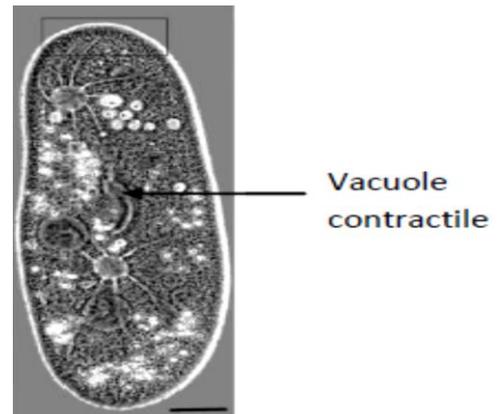
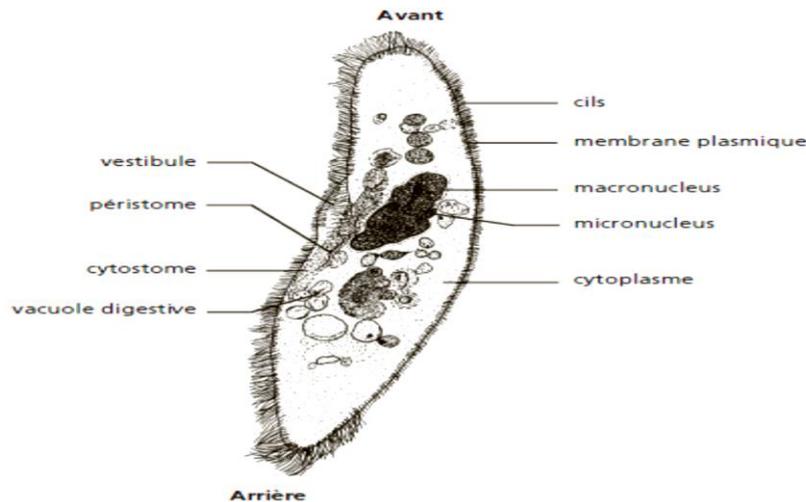


Figure2 : Présentation de la paramécie

Vue d'une paramécie en microscopie électronique à balayage : la ciliature d'une paramécie vue en immunofluorescence (anticorps anti-tubuline) et vue en contraste de phase (Gogendeau, 2005).

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 (Fig. 3). 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 (Sonneborn, 1974).



**Figure 3 Structure d'une paramécie
(Bricheux et Brugerolle, 1986).**

Locomotion respiration et nutrition de la paramécie :

Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé, une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle (Cohen, 2007).

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle car présentant un rapport surface / volume donc surface / masse corporelle élevé (Wehner et Gehring, 1995).

La paramécie porte sur sa face ventrale une vaste dépression ciliée, qui s'élargit en un vestibule donnant accès au péristome (cavité buccale).

Généralités et aperçu bibliographique

Le cytostome s'ouvre au fond de celui-ci et débouche sur le cytopharynx. Les particules alimentaires y sont englobées au sein de vacuoles digestives qui migrent ensuite dans le cytoplasme. Durant ce transit, les aliments sont digérés.

Les déchets non assimilables sont déversés dans le milieu extérieur au niveau du cytoprocte (Bricheux et Brugerolle, 1986).

Stress oxydatif
Du ZnO
Sur les levures

Chapitre 1 : Stress oxydatif du ZnO sur les levures

Les levures *S. cerevisiae* sont d'excellents modèles alternatifs particulièrement adaptés aux études toxicologiques des produits chimiques tels que les métaux lourds (Kungolos et al., 1999). Ce sont des organismes unicellulaires eucaryotes dont le caractère diploïde (cas des levures *Saccharomyces cerevisiae*) les rapproche plus des espèces supérieures que les bactéries.

4.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est un champignon eucaryote unicellulaire, la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*), de forme variée, caractéristique du genre car la forme peut varier assez largement selon les étapes du cycle biologique et les conditions du milieu (Bocquet, 1993).

La classification systématique de la levure est la suivante :

Domaine : **Eucaryotes**

Règne : **Fungi**

Embranchement : **Mycètes**

Division : *Ascomycota*

Sous-division : *Saccharomycotina*

Classe : *Saccharomycetes*

Ordre : *Saccharomycétale*

Famille : *Saccharomycetaceae*

Genre : *Saccharomyces*

Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. Matériel chimique :

Le xénobiotique utilisé est l'oxyde de zinc (ZnO) (diamètre 25nm) préparé et fourni par le Pr. A. DJEKOUN du Laboratoire de Magnétisme et de Spectroscopie des Solides de l'Université Badji Mokhtar, Annaba.

4.2.1. Préparation des nanoparticules de ZnO :

L'oxyde de zinc est un composé chimique de formule « ZnO » qui se présente généralement sous la forme d'une poudre blanche communément appelée « zinc blanc » ou « blanc de zinc » non soluble dans l'eau. Ce solide est utilisé dans de nombreuses applications, telle que la fabrication de verres, de céramiques, dans la formation d'eugénate, dans la composition d'aliments et de crèmes solaires.

La poudre de ZnO élémentaire (pureté 99,99%) est utilisée comme matière de départ. Le processus d'alliage mécanique est effectué dans une haute énergie broyeuse planétaire (Fritsch Pulverisette 7) à température ambiante dans une atmosphère d'air.

La poudre mélangée est scellée dans des flacons cylindriques à billes en acier inoxydable. Le poids total des poudres est de 2 g, le rapport bille à poudre poids est de 20: 1. La vitesse de rotation du flacon est de 500 trs /min.

La poudre est broyée pendant 3 heures par périodes successives de 30 min avec une pause de 10 min entre chaque période afin d'éviter un chauffage excessif au cours du broyage et de limiter l'adhérence des poudres sur les parois des flacons.

4.2.2. Concentrations de ZnO utilisées :

Une solution mère concentrée (1mg de ZnO/ml) est préparée dans de l'eau déminéralisée, agitée aux ultra sons pendant 30 min (100W, 40KHz) et conservée à l'obscurité à 4°C.

Après plusieurs essais, différentes dilutions sont effectuées afin d'obtenir les concentrations de traitement suivantes : 0, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml. Le traitement se fait après les deux heures d'agitation, et les dosages se font après 1heure de traitement.

4.2.3. Lavage des levures :

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

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

4.2.4. Milieu de culture et culture des levures :

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

4.3. Etude physiologique et polarographique des levures :

4.3.1. Cinétique de croissance des levures :

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

4.3.2. Pourcentage de réponse :

Le pourcentage de réponse est obtenu selon la méthode de Wong *et al.*, (1999) grâce à la formule suivante :

$$\%R = 100 * \frac{Nt - Npc}{Nt}$$

Nt : DO des cellules témoins

Npc : DO des cellules traitées par le ZnO à la concentration c.

Les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance, tandis que les valeurs positives traduisent une inhibition de la prolifération.

4.3.3. Etude polarographique :

L'activité respiratoire des levures est mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène, plus communément appelé électrode de Clark selon la méthode de (Djebar et Djebar, 2000).

L'oxygraphe Hansatech est constitué d'une cellule de réaction cylindrique à volume réglable (0,2 ml à 2,5 ml), baignant dans un bain marie avec un système de circulation d'eau, permettant une bonne visibilité de l'échantillon et un contrôle excellent de la température (ajustée à 25°C). La cellule de réaction renferme un agitateur magnétique assurant une homogénéité adéquate du milieu réactionnel (Fig.4) (Hansatech Instrument Ltd, 2002).



Figure 4: Oxygraphe Hansatech

(Laboratoire de Toxicologie Cellulaire Annaba)

Le système est composé d'une cathode en platine et d'une anode en argent. Ces deux électrodes sont reliées par une solution saturée de KCl servant d'électrolyte. Elles sont séparées par une membrane semi-perméable (imperméable à l'eau et aux ions mais perméable à l'oxygène dissous dans le milieu). La concentration initiale de l'oxygène qui est en équilibre avec l'atmosphère est estimée à 240 nmoles/ml. La consommation d'oxygène est évaluée à partir de la concentration d'O₂ mesurée dans le milieu.

4.4. Dosages biochimiques :

4.4.1. Extraction des métabolites :

L'extraction des glucides, lipides et protéines des levures a été réalisée selon le procédé de Shibko *et al* ,(1966) selon la figure suivante :

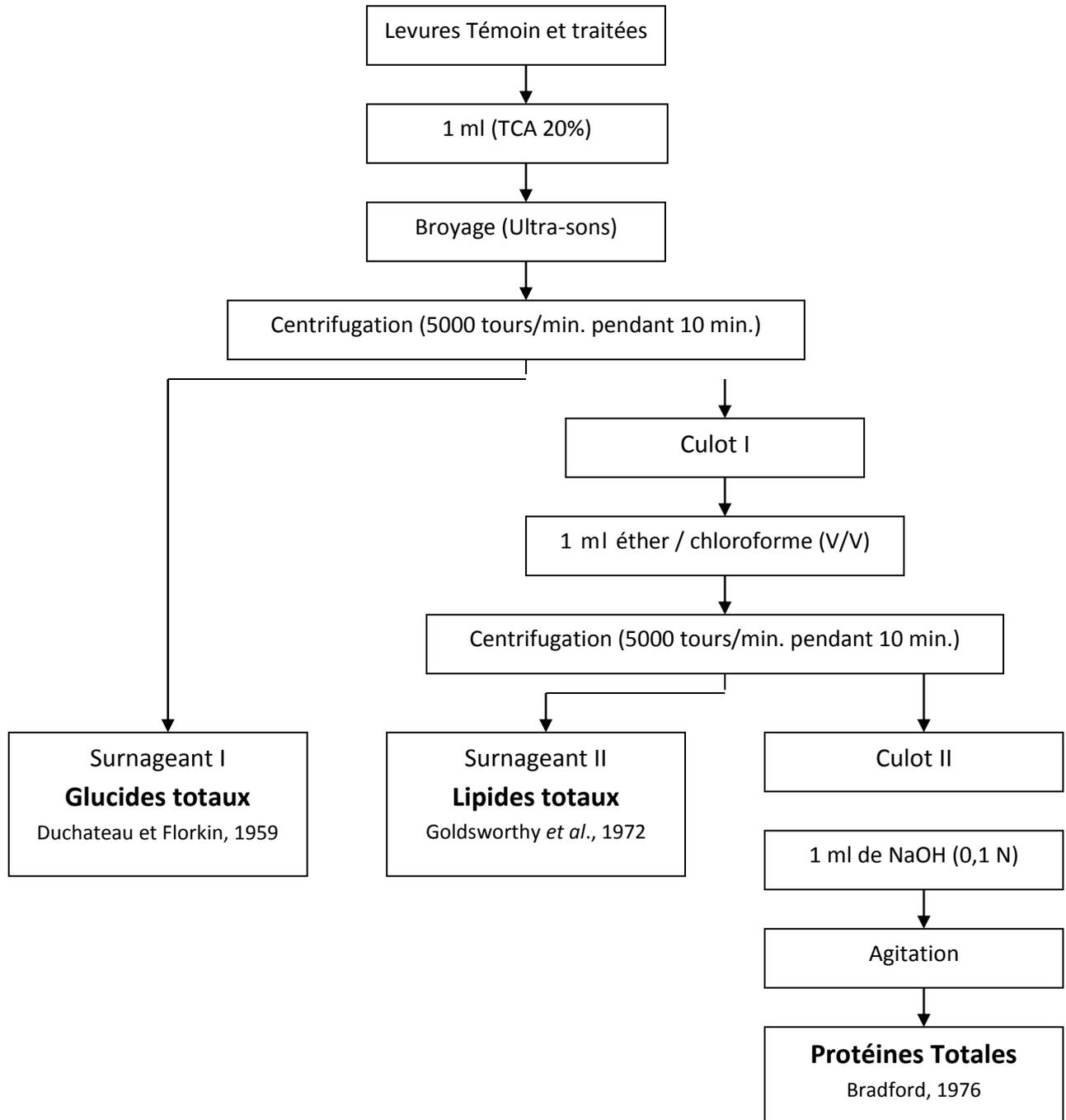


Figure 5: Extraction des glucides, lipides et protéines des levures témoins et traitées au ZnO selon Shibko *et al.*, 1966.

4.4.2. Dosage des protéines totales :

La concentration des protéines est estimée par colorimétrie selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant le bleu brillant de Coomassie comme réactif.

Le principe de la méthode est basé sur la fixation d'un colorant acide (bleu de Comassie) sur les protéines au niveau des résidus basiques et aromatiques ce qui provoque une coloration bleue qui est mesurée à 595nm en utilisant une solution d'Albumine Bovine (1 g/l) comme standard.

4.4.3. Dosage des glucides :

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de Duchateau et Florin, 1959. La coloration obtenue par le réactif à l'antrone est quantifiée à 620 nm en utilisant une solution de glucose (10 mg/ml) comme standard.

4.4.4. Dosage des lipides :

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de Goldsworthy *et al.*, (1972) qui utilise la vanilline comme réactif et une solution mère de lipides à 2,5 mg/ml comme standard.

Le dosage est réalisé sur des prises aliquotes de 100µl d'extraits lipidiques de levures témoins et traitées ou de la gamme étalon auxquels on ajoute 1ml d'acide sulfurique. Après agitation et chauffage à sec à 100°C pendant 10 min, les tubes sont refroidis et 200µl sont repris dans 2,5ml du réactif à la vanilline. Les tubes sont agités et mis à l'obscurité pendant 30 min pendant lesquels une coloration rose se développe. L'intensité de la coloration est ensuite lue à une longueur d'onde de 530nm.

4.5. Etude biochimique et enzymatique :

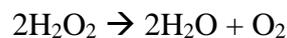
Les différents dosages se font à partir d'un extrait de levures témoins et traitées au ZnO.

Les levures sont homogénéisées aux ultra sons dans du tampon phosphate pH 6,8. L'homogénat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 30min à 9000 g et le surnageant obtenu est utilisé pour le suivi des activités enzymatiques de la Glutathion S-transférase (GST), de la Catalase (CAT), de la SOD totale et de la peroxydase ainsi que pour le dosage de la concentration du glutathion réduit (GSH) et de la production du malondialdéhyde (MDA).

4.5.1. Suivi de l'activité catalase :

Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), toxique pour la cellule, en eau et en oxygène moléculaire.

La technique utilisée est décrite par Claiborne (1985) qui consiste à suivre la disparition du peroxyde d'hydrogène par action de la catalase selon la réaction suivante :



Le protocole de dosage s'effectue de la manière suivante :

Pour 780 µl de tampon phosphate de sodium (Na₂HPO₄ 100 mM, pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM PMSF) on ajoute 200 µl de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 0,5 mM) et 20 µl de l'extrait de levures témoin et traitées au ZnO préalablement préparé.

Parallèlement, un blanc est utilisé contenant les mêmes composés mis à part l'extrait de levures qui est remplacé par 20 µl de tampon phosphate. Après 15 secondes, l'estimation de l'activité de la catalase s'effectue dans une cuve en quartz à 240 nm en mesurant l'absorbance toutes les 30 secondes à 5 secondes d'intervalle.

Les résultats de l'activité catalase sont exprimés en µmoles de H₂O₂ consommées/min/mg de protéines selon la formule suivante :

$$\text{Activité } (\mu\text{moles/min/mg de protéines}) = \frac{\Delta DO * 10}{\epsilon * L * X * Fd}$$

ΔDO : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps

Fd : Facteur de dilution (égal à 1)

L : Longueur du trajet optique : 1 cm

X : mg de protéines par ml de la fraction à doser

ε : coefficient d'extinction molaire de la catalase (0,04 mmol/cm)

4.5.2. Suivi de l'activité superoxyde dismutase (SOD) :

La SOD est une métalloprotéine de détoxification qui a un rôle dans les mécanismes de défense contre les radicaux libres ; elle est responsable de la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ en dioxygène O_2 et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Le principe du dosage (Servais, 2004 et Barillet, 2007) repose sur la mesure de l'activité de la SOD en utilisant l'auto-oxydation du β -mercaptoéthanol en présence d'EDTA/MnCl₂ comme générateur des anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) lors de la réaction.

Ces anions vont provoquer l'oxydation du NADH. La SOD entre alors en compétition pour l'utilisation du $O_2^{\bullet -}$ qui tend à diminuer dans le milieu provoquant ainsi l'inhibition de l'oxydation du NADH. On estime alors que 50% d'inhibition correspondent à une unité d'enzyme.

0,1ml de l'extrait enzymatique sont ajoutés à 1,3ml d'une solution composée de 0,8ml de NADH (7,5mM), 0,5ml d'un mélange (V/V) EDTA (200mM)/MnCl₂ (100mM) et 16 ml de tampon phosphate pH 7,4.

La réaction est déclenchée par l'ajout de 0,1 ml de β -mercaptoéthanol (10mM). L'absorbance est mesurée pendant 5 min après 0 et 20 min d'incubation à 340 nm (SOD totale). L'activité est exprimée en Unité/mg de protéines.

4.5.3. Suivi de l'activité enzymatique Glutathion S-transferase (GST) :

La mesure de l'activité enzymatique 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 réduit (GSH).

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

L'activité est déterminée selon la formule suivante :

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

ΔDO : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps

V : Volume de l'échantillon en ml (0.2 ml)

P : mg de protéines par ml de la fraction à doser

ε : Coefficient d'extinction molaire du complexe GSH-CDNB (9.6 nM/cm)

4.5.4. Dosage du glutathion (GSH) :

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

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons dans 1ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, 0,8 ml d'homogénat subissent une déprotéinisation par addition de 0,2 ml d'acide sulfosalicylique (ASS) à 25%.

Le mélange, après agitation, est plongé dans un bain de glace pendant 15 min, puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 minutes. 500 μ l de surnageant sont récupérés auxquels on ajoute 1ml de tampon Tris/EDTA (0,02M, pH 9,6) et 0,025 ml de DTNB (0,01M). Après 5 minutes de repos nécessaire au développement et à la stabilisation de la coloration, la lecture des DO est effectuée à 412 nm et la quantité de GSH est calculée selon la formule :

$$\text{Taux de GSH } (\mu\text{moles/mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{13,1} * \frac{V_d}{V_h} * \frac{V_t}{V_s} / \text{mg de protéines}$$

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

13,1 : coefficient de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

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

Vt : volume total dans la cuve : 1,525ml (0,25ml surnageant + 1ml Tris/EDTA + 0,025ml DTNB

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

4.5.5. Mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) :

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

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

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

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

La lecture des absorbances est effectuée à 532 nm contre un blanc (1 ml de tampon Tris-HCl à la place de l'extrait butanolique).

Le taux de MDA est déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux } (\mu\text{moles/mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{156} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

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

156 : Coefficient d'extinction molaire du TBA

Vt : Volume total dans la cuve : 1ml (butanol renfermant TBA/MDA)

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

4.5.6. Suivi de l'activité Peroxydase :

Les peroxydases sont des enzymes de détoxification qui catalysent la transformation du peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et en oxygène en présence d'un substrat déterminé.

Pour évaluer l'activité Peroxydase, nous avons préparé un mélange contenant 50 mmol/l de tampon phosphate (pH 7,5), 20 mmol/l d'un substrat déterminé comme donneur d'électron, le guaïacol et l'ascorbate, afin de doser respectivement l'activité Guaïacol peroxydase (GPx) et Ascorbate peroxydase (APx) en présence de 0,1 ml d'extrait enzymatique.

La réaction est initiée par l'addition de 40 mmoles/l de H₂O₂ et le changement d'absorbance est suivi à 470 nm pour le GPx et 290 nm pour l'APx. Les activités enzymatiques sont exprimées en Unités/mg de protéines.

4.6. Analyses statistiques :

L'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés est utilisée pour estimer les différences signalées entre les paramètres étudiés.

Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins la déviation standard ($m \pm s$). Les différences sont considérées comme significatives ($P \leq 0,05$); très significatives ($P \leq 0,01$) et hautement significatives ($P \leq 0,001$).

Ce test est effectué en utilisant le logiciel d'analyse de traitement statistique des données: R i386. La différence entre les groupes témoins et traités est analysée en utilisant le test « t » de Student après contrôle de la normalité de la distribution des résultats.

5. Résultats

5.1. Cinétique de croissance et consommation d'oxygène :

5.1.1. Cinétique de croissance des levures :

La figure (6) montre la croissance des cellules témoins et traitées par les différentes concentrations de ZnO. Nous remarquons que dès la 60^{ème} minute, le nombre de cellules témoins augmente de manière exponentielle et atteint un plateau entre les 90^{ème} et 120^{ème} minutes pour atteindre environ $(30 \cdot 10^6)$ cellules) avec une DO égale à environ 1 puis décroît au delà de ce temps. La même évolution est observée chez les cellules traitées au ZnO mais une inhibition dose dépendante significative ($P \leq 0,05$) de la croissance cellulaire est observée. En effet le nombre de cellules lors de la phase exponentielle de croissance ne dépasse pas $(20 \cdot 10^6)$ cellules) pour les traités par 5 $\mu\text{g/ml}$ de ZnO et est totalement inhibée pour la plus forte concentration (100 $\mu\text{g/ml}$).

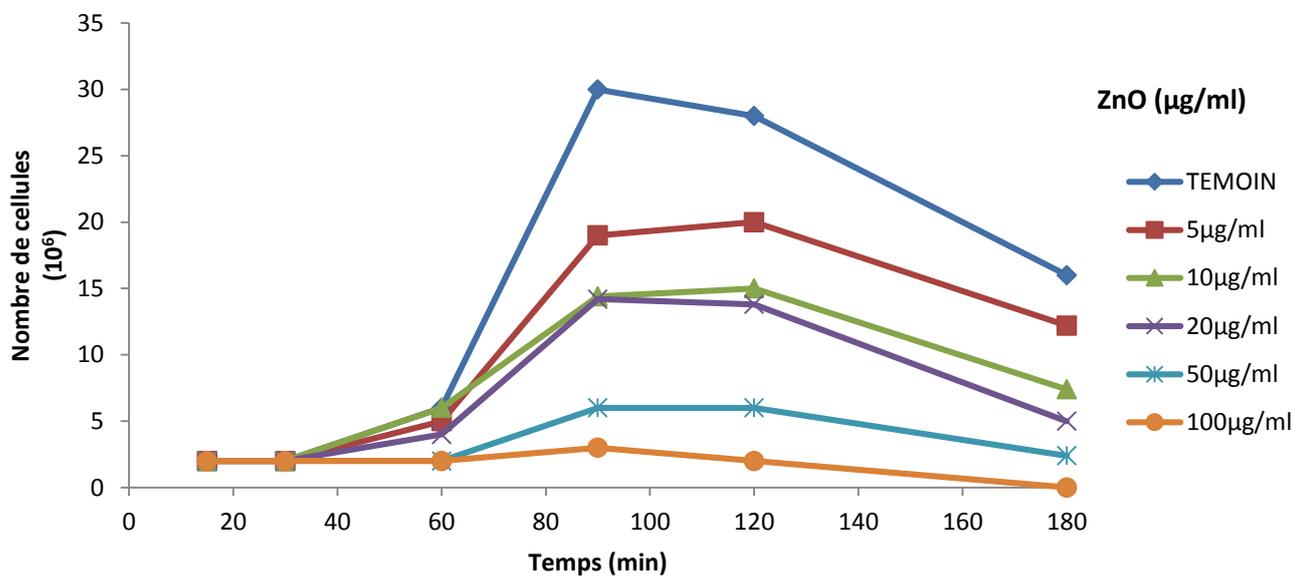


Figure 6. Effet des concentrations croissantes de ZnO sur la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1.2. Pourcentage de réponse :

La figure (7) représente le pourcentage de réponse des cellules traitées au ZnO par rapport aux cellules témoins. Les résultats montrent une inhibition dose dépendante de la prolifération cellulaire significative ($p \leq 0.05$) dès la 1^{ère} concentration puisque les pourcentages de réponse sont tous positifs chez les cellules traitées.

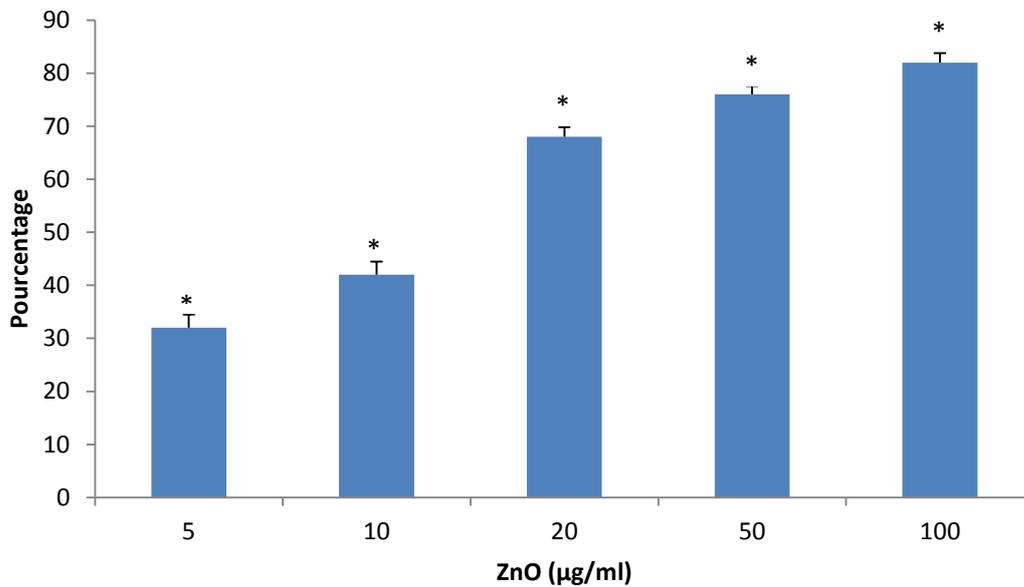


Figure 7: Pourcentage de réponse des levures traitées à différentes concentrations de ZnO (m±s ; n=3)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.1.3. Métabolisme respiratoire :

La figure (8) représente les concentrations d'O₂ dans le milieu de culture des levures traitées et témoins. Ainsi, toute diminution du taux d'O₂ du milieu en fonction du temps indique en fait une consommation d'O₂ par les levures.

Nos résultats montrent une augmentation de la consommation d'O₂ chez les cellules traitées avec les faibles concentrations (5 et 10 µg/ml) de ZnO par rapport aux cellules témoins, alors qu'avec les fortes concentrations cette consommation diminue d'une manière dose dépendante jusqu'à s'annuler pour la concentration de 100 µg de ZnO/ml traduisant une mort cellulaire.

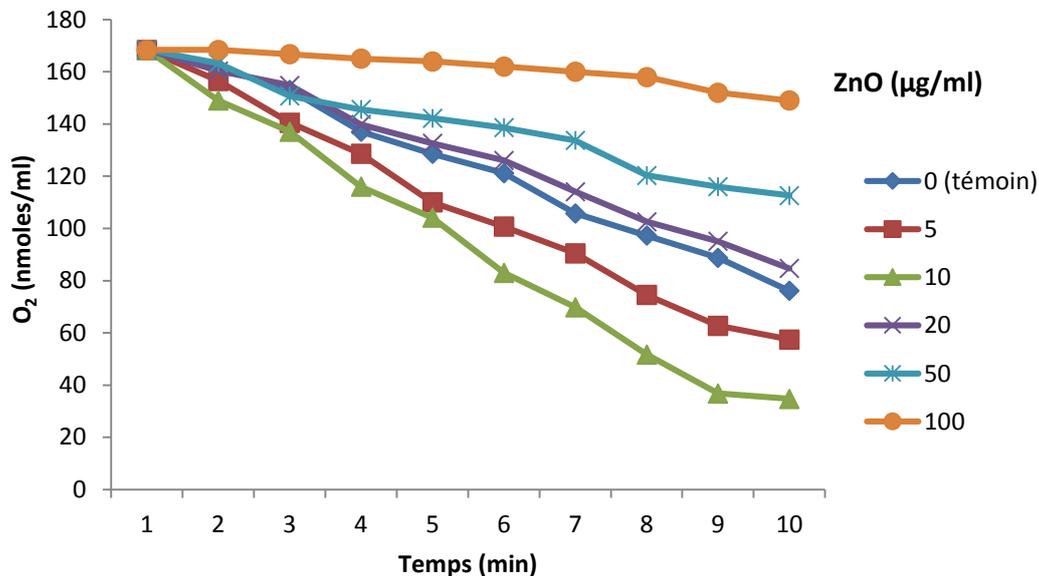


Figure 8. Consommation d'oxygène (nmoles d'O₂/ml de milieu de culture) chez *Saccharomyces Cerevisiae* témoin et traités au ZnO.

5.2. Etude biochimique :

5.2.1. Teneur en protéines totales :

Le traitement des levures avec des concentrations croissantes de ZnO induit une augmentation significative ($p \leq 0.05$) du taux de protéines totales (atteignant plus de huit fois celle des cellules témoins pour les traitées avec les concentrations 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$ de ZnO (Figure 9). En effet, le taux de protéines des témoins ne dépasse pas 0,5 $\mu\text{g/ml}$ alors qu'il atteint environ 4,5 $\mu\text{g/ml}$ chez les traitées par 100 μg de ZnO suggérant probablement une augmentation de la synthèse des systèmes de détoxification.

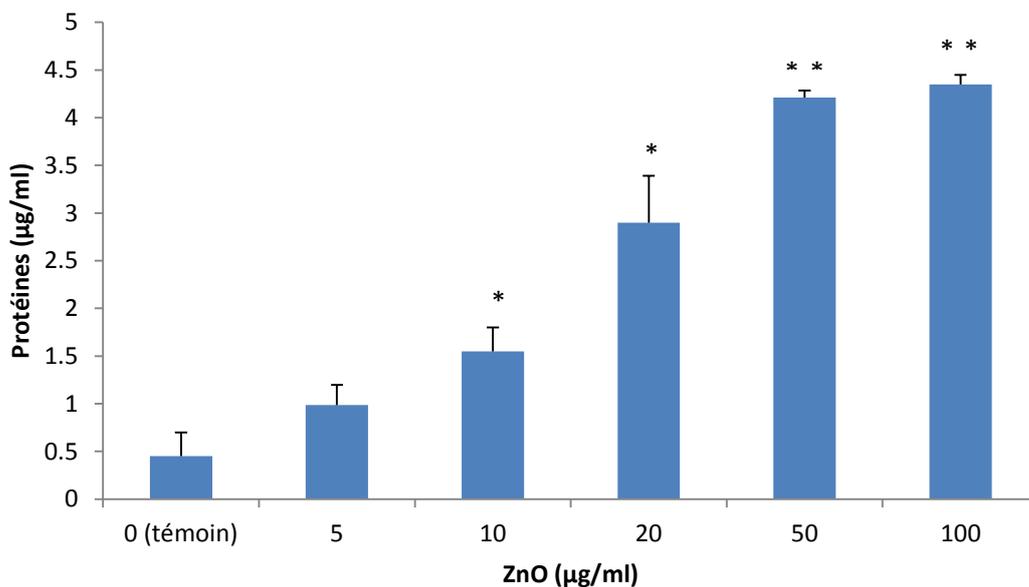


Figure 9: Concentration en protéines totales ($\mu\text{g/ml}$) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n = 3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.2.2. Teneur en glucides :

La concentration en glucides des cellules traitées au ZnO (Figure 10) diminue significativement ($P \leq 0,05$) d'une manière dose dépendante et ce dès la concentration 20 $\mu\text{g/ml}$. Pour la plus forte concentration de ZnO (100 $\mu\text{g/ml}$), le taux de glucides diminue d'environ 50% par rapport aux témoins.

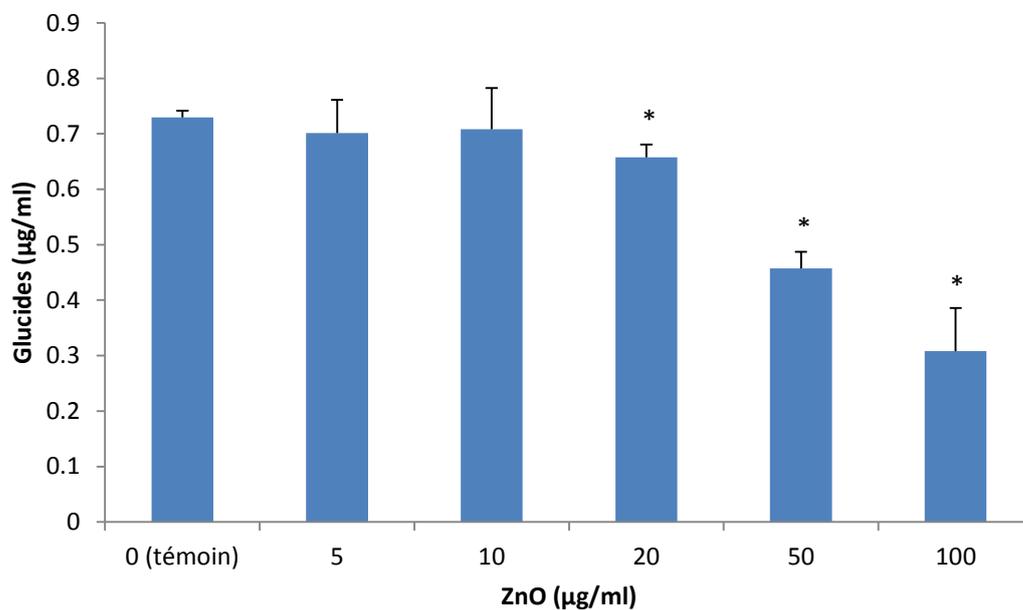


Figure 10: Concentration en glucides ($\mu\text{g/ml}$) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.2.3. Teneur en lipides :

Le traitement des levures avec des concentrations croissantes de ZnO entraîne une diminution des lipides dès la concentration de 10 µg/ml (Figure 11). Cette diminution est très significative ($P \leq 0,01$) car le taux de lipides diminue de 3 fois chez les traités par les plus fortes concentrations de ZnO (50 et 100 µg de ZnO/ml) par rapport aux témoins.

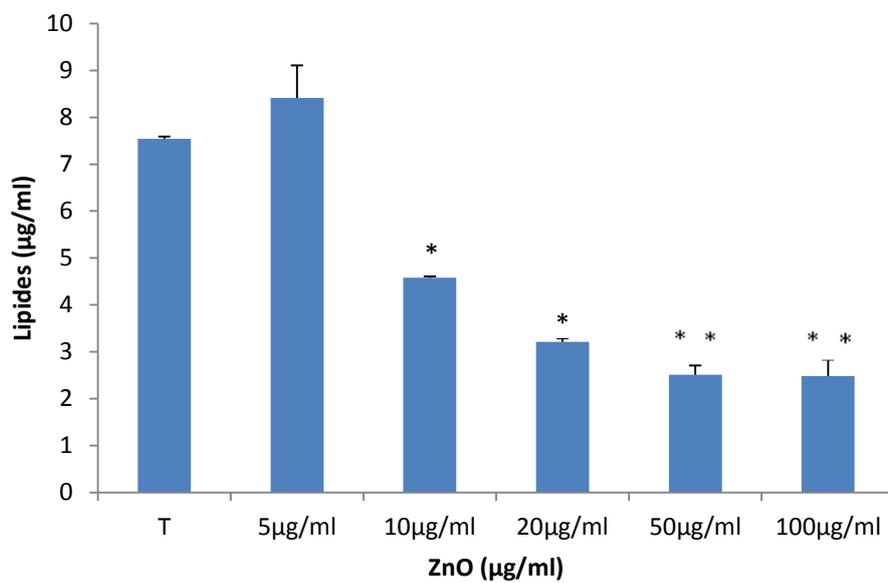


Figure 11: Concentration en lipides (µg/ml) des levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.3. Etude biochimique et enzymatique :

5.3.1. Evolution du taux de Glutathion réduit (GSH) :

Le GSH réduit est un cofacteur des réactions de défense contre un stress polluant. Son utilisation accrue peut être la conséquence de l'action d'un xénobiotique. La figure (12) montre les concentrations en GSH chez les levures témoins et traitées avec des concentrations croissantes de ZnO. Nos résultats indiquent une diminution dose dépendante significative ($P \leq 0,05$) du taux de GSH comparativement aux taux enregistrés chez des cellules témoins. Ainsi, le taux de GSH est d'environ 6 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines chez les témoins et il n'est que de 1 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines chez les traités par la plus forte concentration de ZnO (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

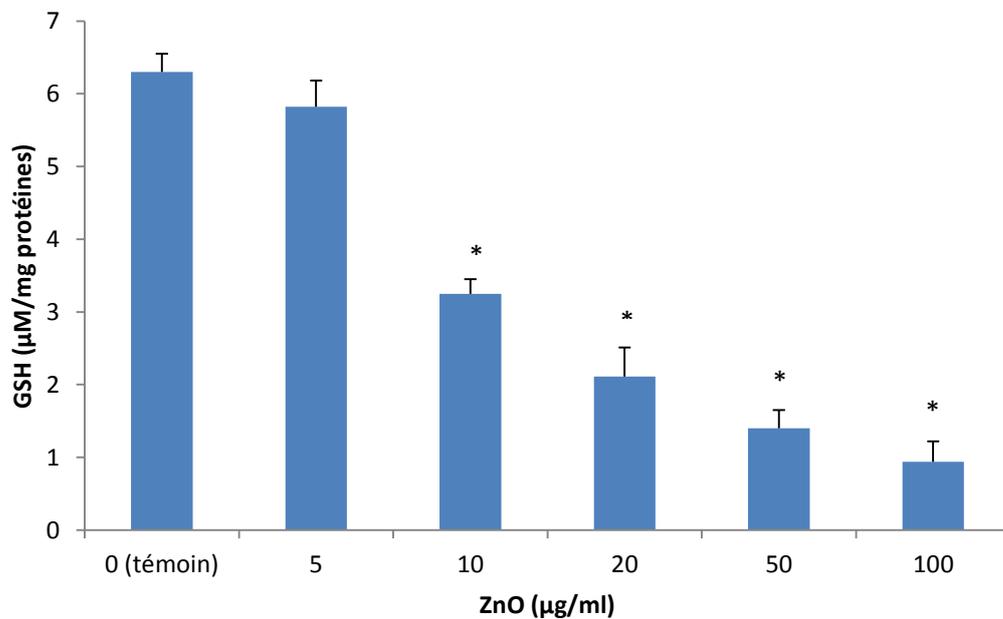


Figure 12 : Concentration en GSH ($\mu\text{moles}/\text{mg}$ de protéines) chez *S. cerevisiae* témoins et traités au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.3.1. Evolution du taux de Malonedialdéhyde (MDA) :

Le MDA est un produit issu de la peroxydation lipidique induite par l'action d'un xénobiotique sur les membranes. Contrairement au GSH, son augmentation traduit un effet toxique du ZnO sur les membranes. La figure (13) met en évidence l'effet du ZnO sur les concentrations de MDA chez les levures traitées comparativement à des levures témoins. Nos résultats mettent en évidence une augmentation significative ($P \leq 0,05$) dose dépendante du taux de MDA chez les traités et ce dès la concentration de 10 μg de ZnO/ml et atteint plus de 20 fois celui des témoins pour la plus forte concentration (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

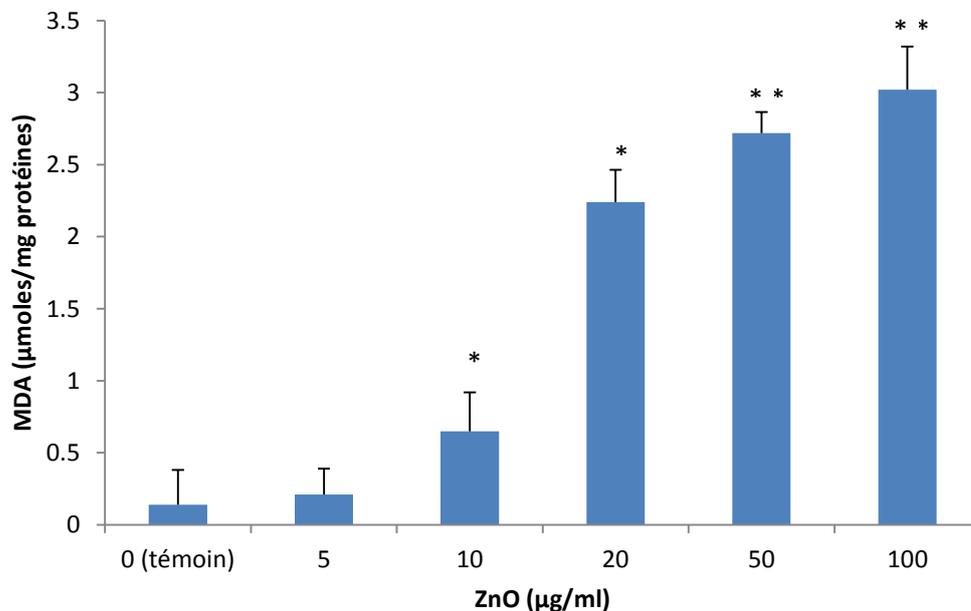


Figure 13 : Concentration en MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines) chez *S. cerevisiae* témoins et traités au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.3.2. Suivi de l'activité catalase (CAT) :

La Figure (14), met en évidence les variations de l'activité catalase chez les levures traitées aux ZnO. Nous constatons une induction de cette activité enzymatique à partir de la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$, cette induction se poursuit de manière progressive et dose-dépendante pour atteindre son maximum à la concentration 100 $\mu\text{g/ml}$ (16 $\mu\text{M/min/mg}$ protéines) alors que chez les témoins cette activité ne dépasse pas 5,8 $\mu\text{M/min/mg}$ protéines.

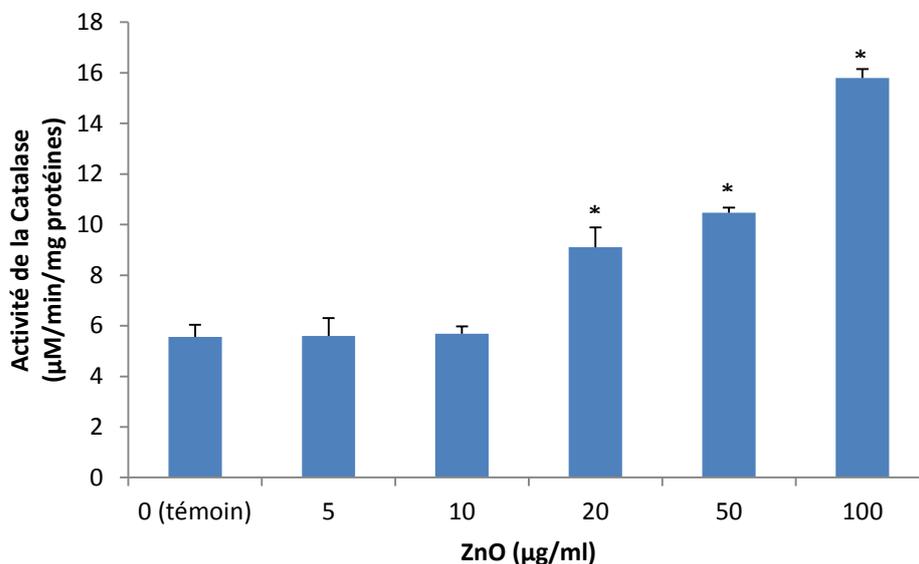


Figure 14: Activité de la catalase ($\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$).

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.3.3. Suivi de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) :

La figure (15) illustre l'effet des ZnO-NPs sur l'évolution de l'activité GST. Ainsi, nous constatons que le traitement par les nanoparticules de ZnO induit une augmentation de l'activité GST d'une manière dose-dépendante et cela dès la concentration 10 µg/ml de ZnO-NPs. En effet cette activité enzymatique est d'environ 9nM/min/mg de protéines chez les traités par la plus forte concentration de ZnO-NPs (100 µg/ml) alors qu'elle ne dépasse pas environ 2 nM/min/mg de protéines chez les témoins.

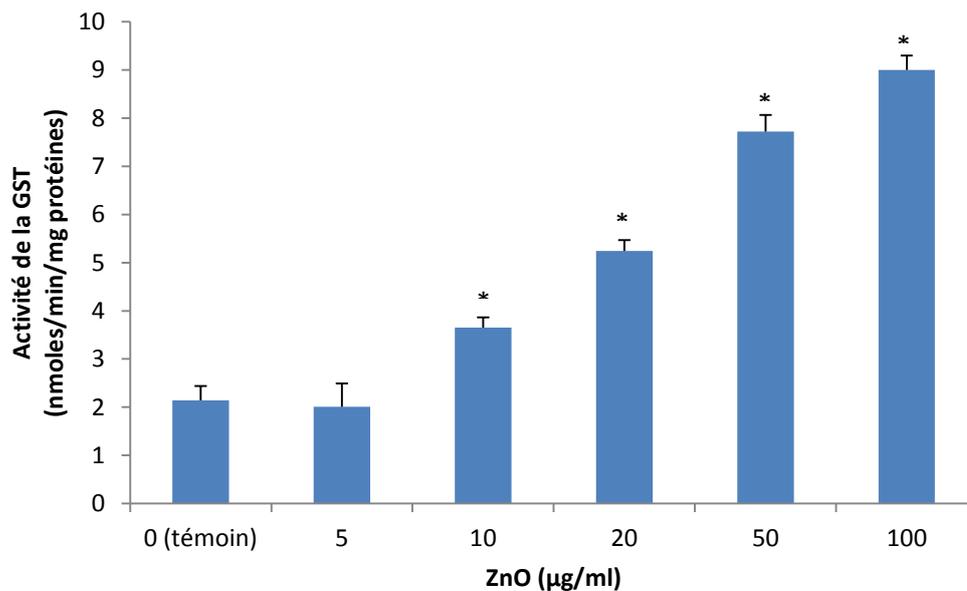


Figure 15: Activité de la Glutathion S-transférase (nmoles/min/mg de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$).

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

5.3.4. Suivi de l'activité Peroxydases (GPx et APx) :

L'évolution des activités Gaïacol et Ascorbate peroxydases (GPx et APx) est illustrée dans la figure (16A et B). Nos résultats montrent que ces activités enzymatiques augmentent significativement ($P \leq 0,05$) chez les levures traitées dès la concentration 10 $\mu\text{g/ml}$ comparativement à l'activité GPx et APx des cellules témoins qui ne dépasse pas respectivement 6,8 et 4,2 $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines. Cependant chez les traités avec la plus forte concentration de ZnO-NPs, l'activité GPx est multipliée par 3, elle est de l'ordre de 22 $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines et l'activité APx est de 16 $\mu\text{M/min/mg}$ de protéines (6 fois plus importante).

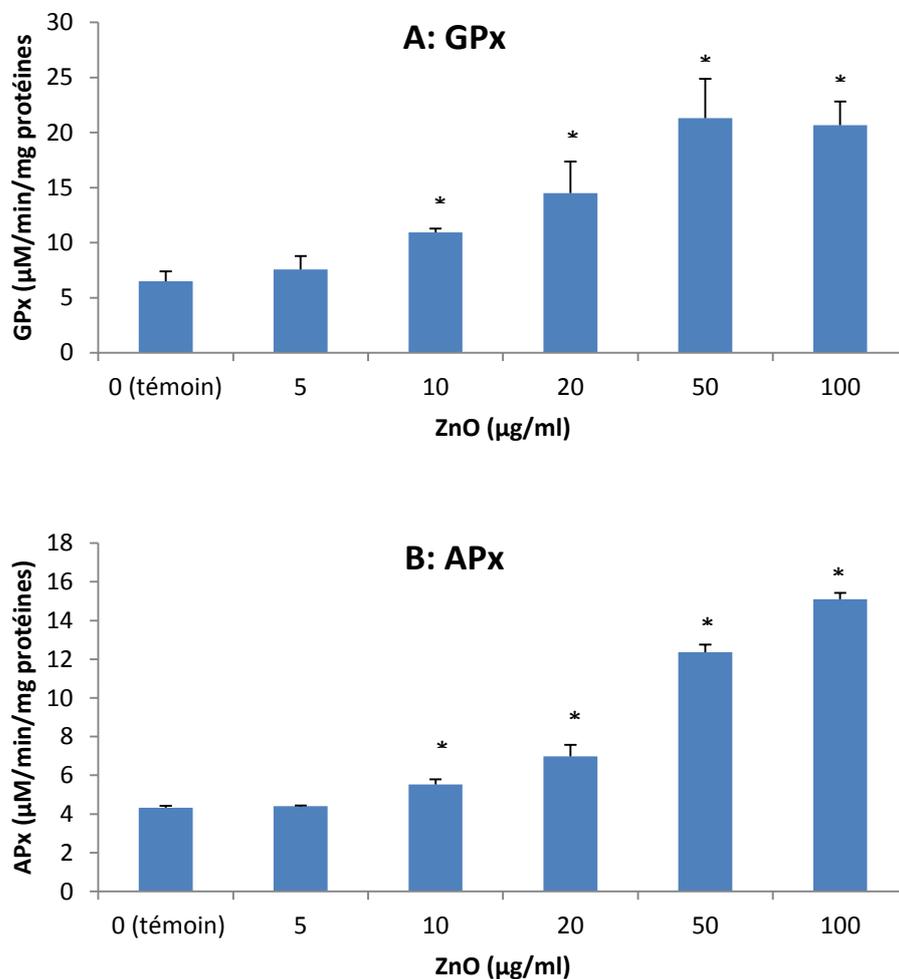


Figure 16: Activité de la peroxydase (A : GPx et B : APx ; $\mu\text{mol/min/mg}$ de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

5.3.5. Suivi de l'activité Super Oxyde Dismutase (SOD totale) :

La figure (17) met en évidence l'évolution de l'activité SOD chez les levures témoins et traitées avec des concentrations croissantes de ZnO. Nous remarquons que cette activité enzymatique augmente de manière significative ($P \leq 0.05$) et dose dépendante chez les levures traitées et ce dès la concentration 20 $\mu\text{g/ml}$ comparativement à l'activité SOD des cellules témoins. Cette augmentation est plus importante chez les cellules traitées avec la plus forte concentration de ZnO-NPs (100 $\mu\text{g/ml}$) où cette activité enzymatique est de l'ordre de 42 Unités/mg de protéines alors que chez les témoins elle ne dépasse pas 5,2 Unités/mg.

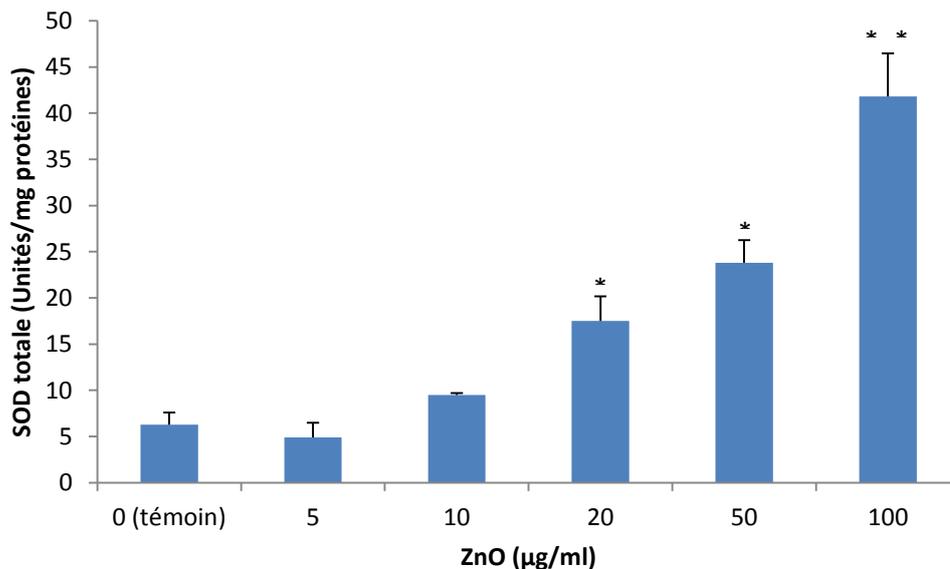


Figure 17: Activité de la Super Oxyde Dismutase (Unités/mg de protéines) chez les levures témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

6. Discussion

L'étude des réponses biologiques des organismes soumis à différentes conditions environnementales est considérée comme une approche efficace d'évaluation de l'état du stress auquel sont soumis ces organismes.

La cytotoxicité du ZnO sur différents types cellulaires a fait l'objet de divers travaux. En effet, les effets toxiques de divers NPs, dont le ZnO, ont été évalués, *in vitro*, sur différents modèles biologiques (algues, crustacés, poissons, bactéries, levures, nématodes, protozoaires et mammifère (Bondarenko *et al.*, 2013, pour revue). Plus récemment, la phytotoxicité des NPs a également été démontrée (Peralta-Videa *et al.*; 2014; Rao et Shekhawat 2014; Yoon *et al.* 2014).

Notre travail a pour but l'évaluation du stress oxydatif induit par les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) sur un modèle unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour cela, nous avons d'abord évalué la cinétique de croissance, le pourcentage de réponse et le métabolisme respiratoire ensuite nous aborderons les paramètres d'évaluation du stress oxydatif par la mesure de divers biomarqueurs.

Effet du ZnO sur la croissance de *S. cerevisiae*:

Le suivi de la cinétique de croissance est un excellent bioindicateur de la toxicité. Ainsi, Kasemets *et al.* (2009) ont mis en évidence une inhibition de l'ordre de 80% chez *S. cerevisiae* traité par 250 µg de ZnO. Une toxicité comparable a été démontrée également chez d'autres espèces traitées par le ZnO telle que, l'algue unicellulaire *P. subcapitata* et la bactérie *V. fischeri* (Heinlaan *et al.*, 2008; Aruoja *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Adams *et al.*, (2006) ont observé une inhibition de 90% de la croissance de *B. subtilis* (bactérie Gram-positif) dès la concentration de 10 µg de ZnO alors qu'avec *E. coli*, il faut une concentration de 1000 µg/ml pour observer une inhibition de seulement 48%. Ces différences entre ces modèles cellulaires seraient dues, selon Kasemets *et al.*, (2009) surtout à la nature de la paroi cellulaire et à la capacité des ions Zn²⁺ à pénétrer dans la cellule. Bouaricha *et al.*, (2012), ont également démontré une inhibition de la croissance des paramécies après traitement avec un insecticide -le Proclaim- il en est de même concernant les travaux de Saib *et al.*, (2014), qui ont également mis en évidence l'effet inhibiteur de 3 amidophosphonates de synthèse chez la paramécie et chez plusieurs autres espèces comme les algues (Franklin *et al.*, 2007 ; Aruova *et al.*, 2009 ; Ji *et al.*, 2011 et Mingsheng *et al.*, 2013), les crustacés (Blinova *et al.*, 2009 et Mingsheng *et al.*, 2013), les bactéries (Li *et al.*, 2013) et les poissons (Zhu *et al.*, 2008 ; Hao et Chen, 2012).

Nos travaux confirment cet effet inhibiteur du ZnO sur la croissance de la levure *S. cerevisiae*. Ce résultat est d'ailleurs conforté par le calcul du pourcentage de réponse, qui dans notre cas, met en évidence l'effet inhibiteur des ZnO-NPs sur la croissance des levures, puisque toutes les valeurs évaluées sont positives.

Effet des ZnO-NPs sur le métabolisme respiratoire:

Une des conséquences majeures de la toxicité cellulaire, est l'altération des fonctions mitochondriales. Aussi, l'étude polarographique par la mesure de l'oxygène dissous dans le milieu, constitue ainsi un excellent indicateur d'un éventuel disfonctionnement du système respiratoire mitochondrial et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité (Haubenstricker *et al.*, 1990).

Plusieurs travaux ont mis en évidence une perturbation de la consommation d'O₂ induite par des xénobiotiques chez des cellules en culture tels que la levure *S. cerevisiae* (Djekoun, 2012) ou la paramécie (Amamra *et al.*, 2015). Ces auteurs stipulent que cette perturbation de la fonction respiratoire pourrait être liée à la fois à un effet toxique direct sur la mitochondrie mais également à l'induction des systèmes de défenses de l'organisme. Dans notre travail, nous avons noté une inhibition de la consommation d'oxygène chez *Saccharomyces cerevisiae* traitées par les plus fortes concentrations de NPsZnO, ce qui pourrait s'expliquer par un effet toxique du xénobiotique testé et par la déplétion des multiples systèmes de défense cellulaire ,alors que pour les plus faibles concentrations de NPsZnO, la balance toxique/ système de défense est encore en faveur de ce dernier (Djekoun, 2012).

Effet des ZnO-NPs sur le métabolisme des macromolécules :

Après avoir évalué les effets des ZnO-NPs sur la cinétique de croissance et le métabolisme respiratoire des levures, nous nous sommes intéressées aux perturbations éventuelles du métabolisme de certaines macromolécules cellulaires(les protéines, les lipides, et les glucides,) dont la perturbation est considérée comme un excellent indicateur d'une perturbation métabolique chez les cellules (Mohammadkhani et Heidari, 2008 ; Djekoun, 2012).

Les protéines sont les constituants majeurs de la cellule et toute fluctuation de leur taux peut être considérée comme une réaction au xénobiotique. Quand aux lipides, ils peuvent être oxydés par les radicaux libres pour produire des produits intermédiaires, tels que le MDA, qui pourrait à son tour réagir avec l'ADN (Marnett 2000 ; Downs *et al* 2002).

Ainsi, l'augmentation des teneurs en protéines cellulaires chez les levures traitées témoigne de l'induction des systèmes enzymatiques en vue de neutraliser la production des ROS alors que la diminution des lipides indiquerait une peroxydation

lipidique qui est confortée par l'augmentation de la teneur en MDA. Le Malonyldialdéhyde (MDA) est le produit final de la peroxydation lipidique; par conséquent, la formation de MDA est considérée comme un indicateur général de la peroxydation lipidique (Downs *et al.* 2002). En accord avec les travaux de Saib *et al.*, (2014). Cette diminution des lipides est également observée par Cheraiet (2014) qui indique que la diminution du taux de lipides serait due à la peroxydation des lipides membranaires. Les ROS peuvent interagir avec les protéines, les lipides, les glucides et l'ADN et causer des dommages (Livingstone, 2003 ; Marnett 2000). Par ailleurs, plusieurs travaux suggèrent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui semble être le mécanisme majeur de la toxicité des NPs (Sharifi *et al.*, 2012). Ceci est d'ailleurs conforté par les travaux de Cheraiet (2014) qui met également en évidence une augmentation des TBARS.

La diminution de la concentration en glucides (nutriment énergétique et de réserve de la levure) dans les cellules traitées montre bien que le ZnO touche les principaux métabolismes dont le métabolisme énergétique. En effet la diminution de ces molécules proviendrait d'une activation de leur dégradation par la glycolyse en vue d'une libération d'ATP nécessaire au métabolisme de détoxification cellulaire, que les mitochondries ne peuvent plus approvisionner suite à l'atteinte de la chaîne respiratoire (Djekoun 2012).

Evaluation du stress oxydatif généré par les ZnO-NPs :

Dans cette partie du travail, nous avons évalué l'activité des systèmes de défense de la cellule par le suivi de divers biomarqueurs cellulaires. Certains xénobiotiques peuvent pénétrer dans les cellules et interagissent avec diverses molécules biologiques. Les interactions moléculaires se traduisent par une (ou des) variation(s) de paramètres biochimiques, lesquels peuvent alors être utilisés comme biomarqueurs de l'exposition de la cellule aux toxiques (Cossu *et al.*, 1997 ; Lagadic *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2008).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le stress oxydatif qui en résulte sont responsables de graves perturbations cellulaires ciblant particulièrement les macromolécules telles que l'ADN, les protéines, (Livingstone, 2001) et pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire par apoptose.

Les systèmes antioxydants sont en mesure d'éliminer les ROS induits par les polluants pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Ils comprennent des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, comme par exemple, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST), et le glutathion réduit (GSH) (Liu *et al.* 2010; McFarland *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1990; Zhou *et al.* 2004).

Les biomarqueurs qui ont été évalués dans cette étude sont impliqués dans les systèmes de métabolisation et de détoxification et sont fréquemment utilisés dans l'évaluation du stress oxydatif (Zheng *et al.*, 2013).

La concentration de Glutathion réduit (GSH) et de Malondialdéhyde (MDA) ainsi que l'activité enzymatique de la Glutathion S-Transférase (GST), de la Catalase (CAT), de la Superoxydedismutase (SOD) et des peroxydases (GPx et APx) ont ainsi été évaluées chez des levures témoins et traitées à des concentrations croissantes de ZnO-NPs.

Le GSH, un tripeptide antioxydant, représente 90% des thiols non protéiques intracellulaires (Sen *et al.*, 1992; Kidd 1997) et neutralise l' H_2O_2 cellulaire, l' $\text{O}_2^{\bullet-}$, et les hydroperoxydes lipidiques par son groupement fonctionnel -SH (Reed et Beatty 1980).

Les GST sont une famille d'enzymes de la phase II de biotransformation qui détoxifient les substrats xénobiotiques par voie de conjugaison avec le GSH pour produire des composés solubles moins toxiques (Wu *et al.*, 2006), et ils jouent un rôle vital dans la protection contre le stress oxydatif (Zheng *et al.*, 2013).

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la peroxydase (APx et GPx) sont des enzymes qui permettent de contrôler les niveaux cellulaires des ROS (Weckx et Clijsters 1996). La peroxydase joue un rôle essentiel dans la neutralisation des ROS, alors que la SOD et la CAT agissent ensemble pour convertir l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 en H_2O et O_2 , ce qui entraîne la diminution du contenu en radicaux libres de la cellule.

Plus précisément, la SOD catalyse la réaction de dismutation du radical anion superoxyde, l' $\text{O}_2^{\bullet-}$, pour former de l'oxygène moléculaire moins réactif, et la CAT convertit H_2O_2 en H_2O et O_2 pour empêcher le stress oxydatif et maintenir l'homéostasie de la cellule (Zheng *et al.*, 2013). Ainsi, les activités accrues de SOD et CAT indiquent que l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 ont été formés au cours de l'exposition des levures au ZnO.

La concentration en GSH cellulaire diminue d'une manière dose dépendante chez les levures traitées indiquant ainsi l'implication du GSH dans les mécanismes de détoxification enclenchés par la cellule. Ceci est d'ailleurs confirmé par la mesure de l'activité GST qui augmente considérablement dans les cellules traitées. Wang *et al.*, (2009) ont également montré une augmentation de l'activité enzymatique GST sur des cellules de l'intestin grêle de porcelet traitées au ZnO et une diminution simultanée du taux de GSH, qui est également un cofacteur pour le système enzymatique à glutathion confirmant ainsi son importance dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif.

Plus récemment, Fernández (2013) a démontré que le ZnO induisait une toxicité sur des lignées cellulaires de poisson par la mesure de la fonction mitochondriale, de la croissance cellulaire, du stress cellulaire (test à la β -galactosidase), des espèces réactives

de l'oxygène (ROS), du contenu en glutathion cellulaire total et de l'activité de la GST et Mwaanga (2014) a mis en évidence une augmentation de l'activité GST chez *Daphnia magna* traitée au ZnO.

La catalase (CAT) est une enzyme de détoxification présente dans toutes les cellules aérobies. Son principal rôle est d'agir contre les concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est généré soit par l'acétyl-CoA oxydase au cours de la bêta-oxydation soit par la présence d'un stress oxydatif du à un xénobiotique. Le peroxyde d'hydrogène est ainsi dégradé en eau et en oxygène (Hiltuten *et al.*, 2003).

Nos résultats montrent que l'activité de la CAT augmente d'une manière dose dépendante chez les levures traitées. Ce résultat est conforté par les travaux de Daoud (2012) qui a montré une augmentation concomitante du niveau de malondialdéhyde (MDA) et de l'activité de la catalase dans la glande digestive de *L. luteola* traitée au ZnO.

Cette augmentation du MDA est d'ailleurs retrouvée dans notre travail chez les levures traitées à toutes les concentrations de ZnO et ce d'une manière dose dépendante. Cette augmentation traduit une peroxydation lipidique par une atteinte de l'intégrité des membranes par les ZnO-NPs.

L'évaluation des activités SOD et peroxydases (APx et GPx) montre des résultats qui vont dans le même sens que celles de la GST et de la CAT, c'est-à-dire, une augmentation dose dépendante de ces activités enzymatiques indiquant la production de peroxyde d'hydrogène ainsi que la mise en place des mécanismes de défense contre le stress oxydatif (Mouithys-Mickalad *et al.*, 2004).

Nos résultats montrent clairement que le traitement de *S. cerevisiae* par des nanoparticules de ZnO induit un stress oxydatif.

Cette toxicité ainsi mise en évidence, nous a incité à nous pencher sur ses conséquences sur le génome et ce à travers l'évaluation de la génotoxicité du ZnO sur la levure *S. cerevisiae*.

ETUDE
GENOTOXIQUE

Chapitre 2 : Etude génotoxique : Effet du ZnO sur l'ADN des levures

1. Introduction :

Mesurer la génotoxicité au niveau de l'ADN présente plusieurs avantages (sensibilité et temps de réponse courts). Les récents développements dans la technologie de marqueurs moléculaires ont fourni de nouveaux outils pour la topographie de l'ADN génomique afin de mettre en évidence divers types de dommages et de mutations de l'ADN des bactéries, des plantes, des animaux et des cellules humaines en culture (Atienzar *et al.*, 1999).

La technique de la RAPD est une réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) plus simple et plus rapide que les outils classiques de l'analyse génotoxique, car elle est capable de détecter non seulement des mutations ponctuelles, mais aussi des modifications temporaires dans l'ADN (Labra *et al.*, 2003; Wolf *et al.*, 2004).

Malheureusement cette technique est impossible à réaliser pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* car son génome est trop court. Mais on peut sélectionner des gènes de réponse au stress oxydant qui sont d'excellents biomarqueurs, et donc on peut vérifier si les NPs génèrent un stress oxydant.

Pour cela, nous utilisons des couples d'amorces bien spécifiques à des gènes précis par la PCR quantitative (qPCR ou PCR en temps réel) qui est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN.

En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicon (portion d'ADN définie par un couple d'amorces) (Poitras et Houde 2002).

2. Matériels et méthodes :

2.1. Traitement et préparation des levures pour la qPCR :

Les mêmes concentrations de ZnO-NPs sont utilisées pour l'étude génotoxique de la levure à savoir 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml plus un témoin positif qui est le chlorure de cadmium, CdCl₂ à 1 mM (112,4 mg/L) car sa toxicité élevée a été démontrée au sein même du Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université de Bordeaux où nous avons effectué cette analyse génotoxique (Achard-Joris, 2005).

Les tubes de levures témoin, témoin positif et traités sont directement centrifugés à 3000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et les culots sont immédiatement stockés à -80°C (fragilité des ARN) en vue de l'extraction des ARN.

2.2. Choix des couples d'amorces :

En 1996, *Saccharomyces cerevisiae* a été le premier eucaryote dont le génome a été séquencé. Entreprise considérable pour l'époque, le séquençage du génome de la levure nécessita la collaboration de 641 scientifiques répartis dans 96 laboratoires dans le monde.

Leur travail fut coordonné par seize généticiens sous la supervision d'André Goffeau, alors Professeur à la Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale de l'université Catholique de Louvain.

Son génome de 16 chromosomes est composé de 13 millions de paires de bases et de 6 275 gènes. L'ensemble des données génomiques concernant *Saccharomyces cerevisiae* est donc connu (Goffeau *et al.*, 1996).

Nous avons sélectionné 6 gènes (couples d'amorces) pour cette étude:

- **18S** : gène référence : responsable du contrôle du message génétique en protéine.

F-1422 : ATAACAGGTCTGTGATGC

R-1631 : TACAAAGGGCAGGGACG

Remarque : Un gène de référence (ou « standard ») est un gène dont l'expression ne varie pas quel que soit le stade de développement ou le traitement réalisé sur le tissu

étudié. Il permet de normaliser les éventuels biais pouvant provenir des variations dans les erreurs de pipetage et des variations d'efficacité lors de la transcription inverse. On choisit généralement des gènes codant des protéines ayant des fonctions indispensables au bon fonctionnement cellulaire (structure du cytosquelette, protéine de la sous-unité ribosomale, protéine du métabolisme...)

- **RNR** : gène responsable de la production et réparation des désoxyribonucléotides.

ATATGGCTGCTGATCG : 2090-2105

TCGGTAAGCGCAGATG : 2390-2375

- **ACT** : gène responsable de l'actine.

ACTATGTTACGTCGCCT : 645-661

CAAAGCGGTGATTCCT : 960-944

- **PRX** : gène de la respiration.

TTGCCACAGCACCTAT : 92-107

CGTGGGACTCAACATCT : 249-267

- **KAR** : gène caryogamie entre en jeu dans la reproduction.

CAGCCAAATGTCCACC : 960-975

CTGCACCGTATGCAAC : 1255-1240

- **GSH** : gène responsable du glutathion.

CGCCACTGGACTATGA : 1199-1214

GAATACGCAGCGTTCT : 1460-1445



Figure 18 : différents couples d'amorces utilisés.

Test d'efficacité des amorces :

Les différents couples d'amorces utilisés sont testés en qPCR afin de vérifier leur efficacité.

La vérification de l'efficacité des couples d'amorces est un test indispensable à réaliser en qPCR car sa connaissance est essentielle pour une interprétation exacte des données. La vérification se fait à chaque réception de nouveaux couples d'amorces.

Idéalement, l'efficacité de l'essai doit être de 100%. Cela signifie que pendant la phase logarithmique de la réaction, le produit issu de la PCR est doublé à chaque cycle.

Cependant, il arrive que le rendement soit inférieur à 100% et parfois même on observe des lectures de l'efficacité PCR au dessus de 100.

L'efficacité des amorces est démontrée par un changement de 3,32 cycles entre 10 dilutions de modèle (Kennedy 2010).

La courbe standard modèle doit être quantifiée et ensuite diluée en série. Il est recommandé d'effectuer au moins 6 dilutions et des dilutions au 1:10 (en double ou

Etude génotoxique

mieux en triple répétition) pour une plus large gamme de linéarité et pour une plus grande confiance dans les données, surtout si un point de données retombe pour une raison inconnue.(Tableau 1)

Tableau 1: Exemple d'une micro plaque qPCR pour le test d'efficacité des amorces.

	18S	GSH	RNR	PRX	ACT	KAR	H2O					
10^{-1}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-2}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-3}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-4}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-5}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-6}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-7}	*	*	*	*	*	*	*					
10^{-8}	*	*	*	*	*	*	*					



Figure 19 : micro plaque pour qPCR

Les résultats sont obtenus sous forme de Ct et une droite est tracée pour déterminer leur efficacité.

On détermine l'efficacité E à partir de la droite de régression qui est du type :

$$Y = aX + b$$

$$E = 10^{1/a}$$

2.3.Extraction de l'ARN :

La pureté et l'intégrité de l'ARN isolé à partir de cellules de tissus ou de culture est essentielle pour une utilisation efficace dans des applications telles que la transcription inverse et la qPCR quantitative.

Comme ces dernières années l'utilisation de l'amplification en tant qu'outil de recherche a augmenté, le besoin de méthodes permettant d'isoler rapidement l'ARN de haute qualité, sensiblement exempt de contamination d'ADN génomique, à partir de petites quantités de matériau (tissus et cellules en culture) de départ, a également fortement augmenté.

Le Système Promega d'isolation de l'ARN a été conçu pour répondre à ces besoins avec une technique rapide et simple pour la préparation de l'ARN total purifié et

intact à partir de tissus, cellules cultivées, en moins d'une heure, en fonction du nombre des échantillons à traiter (Van Keulen *et al.*, 2004).

2.3.1. Préparation des solutions du kit :

-50ml tampon de lyse + 1ml β -mercapto-éthanol (4°C)

-58,8ml RNA lavage solution + 100ml Ethanol 95% (RT)

-5,3ml DNase Stop solution + 8ml Ethanol 95% (RT)

- DNase Lyophilisé avec H₂O exempte de nucléase ; préparer des aliquotes de DNase à raison de 5x50 μ l à conserver à -20°C.

-préparer Ethanol 75%, RNase free dans de l'éthanol absolu et H₂O, exemple: (50ml Ethanol 75% +35,7ml Ethanol absolu + 12,5 H₂O)

2.3.2. Protocole expérimental:

Notre échantillon doit correspondre à une DO=1 pour 1ml.

On additionne 175 μ l de phényl-chloroforme (conservation à -80°C pour une courte durée) avec 175 μ l de tampon de Lyse ainsi que 100 μ l bille en verre de 0.5mm, puis passer au vortex pour un broyage complet 5x30s.

Remarque : cette opération doit se faire sous une hotte aspirante car le phényl-chloroforme est très dangereux et libère une très forte odeur même en toute petite quantité.

Une centrifugation à 13500 tours/min pendant 5min (RT) est effectuée puis le surnageant est récupéré dans un tube de 1,5 ml. Le surnageant est additionné de 450 μ l d'éthanol à 75% puis agité au vortex.

Préparer les tubes + colonnes spécifiques au kit Proméga et verser le contenu du tube dans le nouveau tube + colonne Proméga pour être centrifugé pendant 1min.

Un lavage est nécessaire avec 600 μ l de solution de lavage (pour éliminer la guanidine contenue dans le tube de lyse).

Une première centrifugation est effectuée pendant 1 min puis une deuxième pendant 2 min (pour séchage des colonnes).

Etude génotoxique

Rajouter 50 μ l du mix précédemment préparé et mettre en incubation à 37°C pendant 15 min puis ajouter rapidement 200 μ l DNase Stope solution.

NB : à cette étape, les tubes peuvent être laissés à 4°C pendant maximum 1 heure.

Effectuer un lavage en rajoutant 600 μ l RNA lavage solution puis centrifuger pendant 1 min, éliminer tout le contenu du tube, refaire un second lavage en rajoutant 250 μ l de RNA lavage solution et centrifuger pendant 2 min.

Placer les colonnes dans de nouveaux tubes de 1,5 ml stériles du kit Promega et rajouter 50 μ l nucléase free water et centrifuger pendant 1 min.

Jeter la colonne, les tubes contenant l'ARN pur sont stockés à -80°C.

2.3.3. Vérification de l'ARN :

L'électrophorèse à travers des gels d'agarose ou de polyacrylamide est la méthode standard pour séparer, purifier et identifier les fragments d'acide nucléique.

L'emplacement de l'acide nucléique à l'intérieur dans le gel peut être déterminé en utilisant le colorant fluorescent intercalant bromure d'éthidium.



Figure 20: Matériel pour l'Electrophorèse sur gel d'agarose

Les gels d'agarose ont une puissance et une plus grande gamme de séparation, de 200 pb à > 50 kb, en utilisant des gels et équipements standard d'électrophorèse. Les ARN peuvent être séparés dans des gels d'agarose par électrophorèse en champ pulsé.

Remarque : L'agarose est un polysaccharide obtenu à partir d'algues qui sont souvent contaminées par d'autres polysaccharides, des sels et des protéines, ainsi, différents fabricants peuvent modifier le niveau de contaminants et donc différents lots peuvent présenter des performances de l'agarose différentes. L'agarose peut être modifié chimiquement pour faire fondre le gel à faible température par addition de groupes hydroxyéthyle dans la chaîne du polysaccharide.

Des gels d'agarose sont coulés en faisant fondre complètement l'agarose dans le tampon désiré, puis coulés dans un moule pour durcir. L'ARN est chargé négativement à un pH neutre et lorsqu'un champ électrique est appliqué, il migre vers l'anode.

L'ARN conserve beaucoup de sa structure secondaire pendant l'électrophorèse que s'il est d'abord dénaturé. L'ajout de formaldéhyde pour le gel d'agarose maintient l'ARN dans sa forme linéaire (dénaturé).

Le taux de migration est déterminé par la taille moléculaire de l'ARN. L'ARN linéaire devient orienté dans un champ électrique dans une position "en bout" et migre à travers la matrice du gel à une vitesse qui est inversement proportionnelle au log décimal du nombre de paires de bases.

Les grandes molécules migrent plus lentement en raison d'une plus grande friction quand ils essayent de passer à travers la matrice du gel (Sambrook *et al.*, 1989).

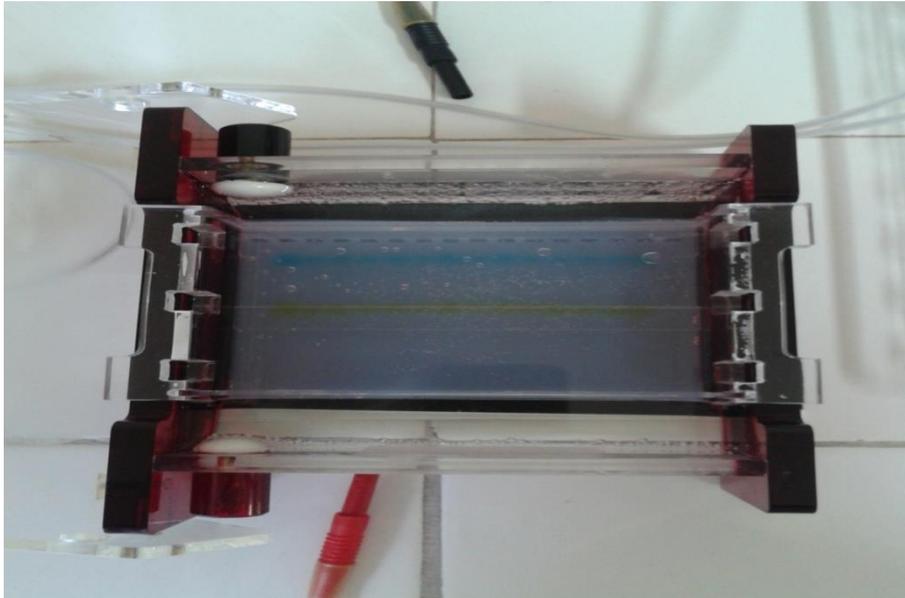


Figure 21 : migration des ARN par électrophorèse

La vérification se fait via un lecteur spécifique BioRAD (Fig. 22)



Figure 22 : Vérification sur le lecteur BioRad

2.3.3.1. Préparation du gel d'agarose à 1,5% :

0,75g d'agarose sont mélangés avec 50 ml T.A.E puis chauffés jusqu'à ébullition. Ajouter 2,5 µl de Bromure d'éthyle et mélanger.

Poser un barrage sur le socle de l'électrophorèse à l'aide d'un ruban adhésif, verser le gel, placer le peigne et laisser refroidir quelque instant à 4°C puis couvrir.

2.3.3.2. Echantillon :

Mettre dans des micros tubes 5 µl d'ARN extrait et rajouter 3 µl EAU DEPC ainsi que 2µl de tampon de charge.

2.3.3.3. Application :

10 µl de l'échantillon sont mis dans chaque puits sans oublier de mettre 5 µl de marqueur ou traceur dans le premier puits.

Electrophorèse : 80V pendant 40min

Lecture : BioRad UV à 80V pendant 40/min en Trans UV

2.4. Transcription inverse de l'ARN vers L'ADNc :

Cette étape permet d'obtenir des ADN complémentaires à partir des ARN.

Le système de transcription inverse est un procédé qui comprend une transcriptase inverse et un ensemble optimisé de réactifs conçus pour une synthèse efficace d'ADNc en vue d'une amplification par PCR en utilisant un appareil spécifique eppendorf flexlid. (Fig. 23)



Figure 23 : Amplificateur PCR « eppendorf flexlid »

Les composants du système de transcription inverse peuvent être utilisés pour la transcription inverse de l'ARN à partir des modèles de l'ARN total, la poly (A) + ARNm ou ARN transcrit synthétique synthétise de l'ADNc complet pour l'analyse reproductible de rare ou longue messages (Myers and Gelfand, 1991).

Ces conditions ont été développées pour la synthèse d'ADNc ou pour la transition facile à spécifique du gène cible d'amplification. Jusqu'à 5 μ l de la réaction de transcription inverse peut être directement amplifié en utilisant l'ADN polymérase (Bustin, 2000).

2.4.1. Protocole expérimental:

Préparation de micro tube de 100 μ l :

Additionner 1 μ l digodt avec 1 μ l RP Et rajouter 10 μ l RNA purifié.

Thermocycler :

-5' à 70°C

-5' à 4°C

Placer les tubes dans de la glace

Préparation du mix : (sample+1)

4 µl Grb sont additionnés de 1,5 µl MgCl₂ 25mM, 1 µl PCR Nucleotide Mix, 0,5 µl recombinant et 1µl Grt.

Rajouter 8 µl du mix dans les micros tubes de 100 µl (Total volume 20 µl)

Bien mélanger et placer dans le thermocycler.

Thermocycler :

-5' à 25°C

-1h à 42°C

Les micros tubes contenant notre cDNA sont stockés à -20°C.

2.4.2. qPCR: (Polymerase Chain Reaction) quantitative

2.4.2.1. Principe :

La PCR quantitative a été utilisée au cours de nos travaux pour évaluer l'effet d'une contamination aux nanoparticules de ZnO sur le niveau d'expression de certains gènes,

La qPCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps (« n temps réel») le processus de PCR à l'aide de la fluorescence.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant.

Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle.

Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

Etude génotoxique

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

L'appareillage utilisé pour cette expérience est le « stratagène Mx3000 professionnel » (Fig. 24).

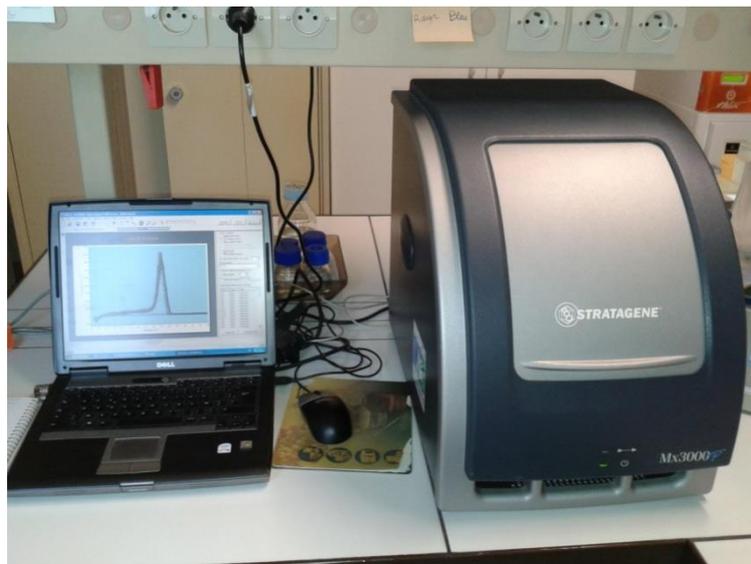


Figure 24 : Stratagene Mx 3000 pro

2.4.2.2. Préparation des couples d'amorces :

Les couples sont préalablement préparés avec 2 μ l forward et 2 μ l reverse amorces auxquels on rajoute 96 μ l H₂O RNA libre.

2.4.2.3. Préparation du total reactive mix:

On additionne 10µl de Tp2 avec 7µl H₂O RNA libre.

Récupérer le cDNA du stockage -20°C.

Allumer le stratagene MxPro 20mn pour chauffage de la lampe.

Dans chaque puit on rajoute 17µl du reactive mix, 2µl Primer mix (20µM) préparé préalablement et 1µl de notre cDNA.

Une plaque de 96 puits est utilisée pour chaque gène à raison de 10 répétitions par analyse (pour la précision et la fiabilité de nos résultats) (tableau 2)

Tableau 2: Exemple d'une micro plaque qPCR pour le test d'efficacité des amorces.

	18S	18S	18S	18S	18S		18S	18S	18S	18S	18S	
T	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
T+	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
5µg/ml	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
10µg/ml	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
20µg/ml	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
50µg/ml	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
100µg/ml	1	2	3	4	5	*	6	7	8	9	10	*
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	H2O

Bien mélanger (aller retour) et centrifuger la plaque à 3000 rpm pendant 10s

Placer la plaque dans le MxPro et régler les paramètres :

-cyber green avec courbe.

-importer ou créer un profil thermal.

-lancer.

L'expression différentielle des gènes nous indique la différence qu'il ya entre les gènes témoin et traités en question de gain ou de perte de sites d'hybridation.

- RP : Random Primer.
- GRB : Goscript reaction buffer.
- GRT : Goscript reverse transcription.

2.5.Analyse statistique :

La distribution des résultats n'adhérant pas à la loi de normalité, l'analyse statistique relative aux nombres de sites d'hybridations est réalisée en utilisant le test non paramétrique *U* Mann-Whitney ($P \leq 0.05$) qui repose sur la comparaison des médianes. La comparaison statistique des proportions est effectuée en utilisant un test binomial ($n = 10$) avec le logiciel R (The R Project for Statistical Computing).

3. Résultats :

3.1. Vérification des ARN :

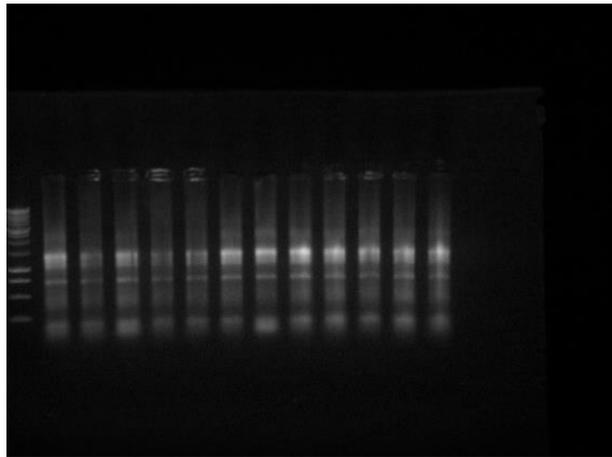


Figure 25: Vérification des ARN sur gel d'agarose

La figure (25) correspond à la lecture du gel d'agarose par UV, l'intensité de la couleur des gènes est proportionnelle à leur abondance et le traceur est un marqueur spécifique de gènes qui nous indique les type de gènes.

3.2. Efficacité des couples d'amorces :

L'efficacité des couples d'amorces est représentée sur les figures (26 et 27) :

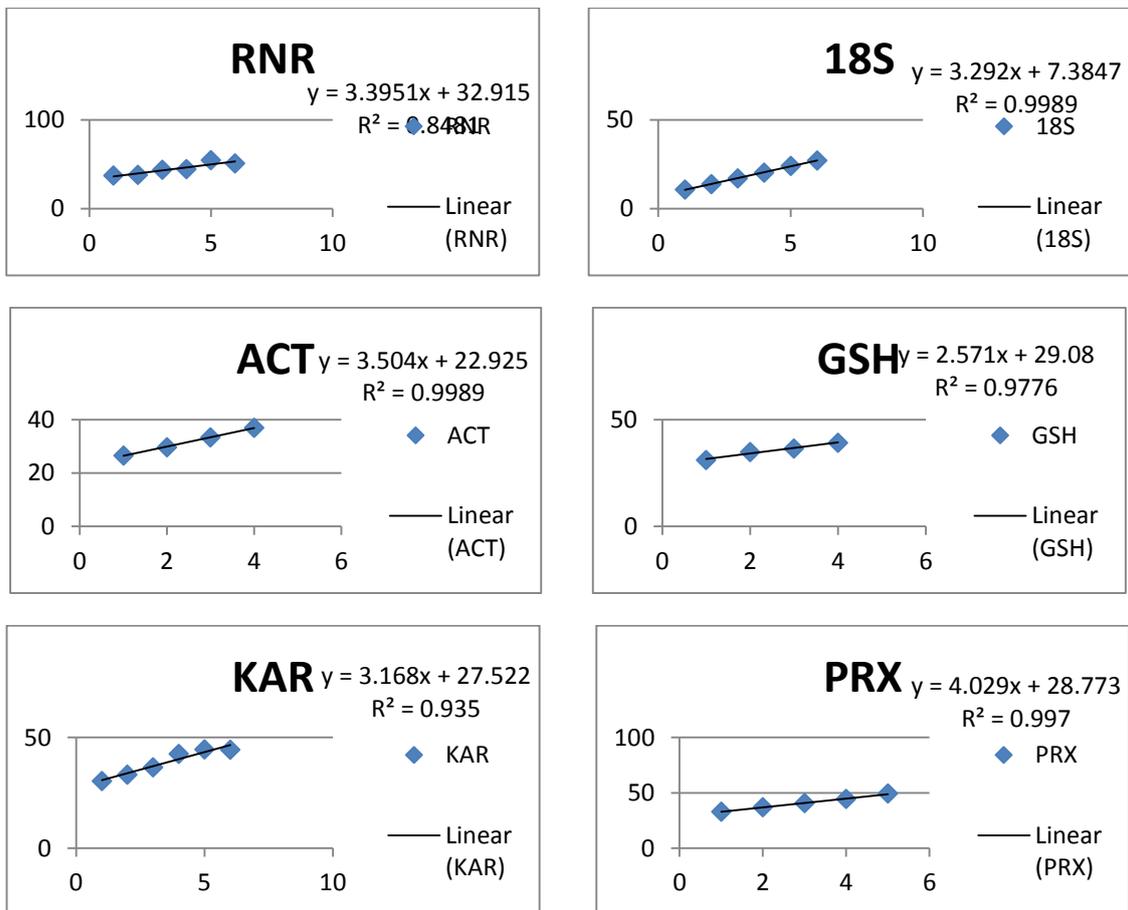


Figure 26 : Courbes d'évaluation de l'efficacité des amorces.

La figure (26) représente les droites de régression pour chaque gène ce qui nous permet de calculer l'équation de la droite de régression et ainsi pouvoir calculer l'efficacité E selon la formule : $E = 10^{1/a}$.

Efficiency	$E=10^{(1/a)}$	R^2
18S	2,0	0,998
ACT	1,9	0,998
GSH	2,4	0,977
KAR	2,1	0,935
RNR	2,0	0,848
PRX	1,8	0,997

Figure 27 : Efficacité des couples d'amorces

La figure (27) représente l'efficacité calculée pour chaque gène. Le gène de référence (18S) montre une efficacité de 2 équivalente à 100%. Lorsque l'efficacité des amorces n'est pas égale à 2, cela doit impérativement être pris en compte lors des calculs.

Etude génotoxique

Les résultats de la PCR quantitative sont représentés dans le tableau (3) :

Tableau 3: Expression relative des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* témoins et traités au ZnO-NPs (Le gène référence est le 18S ARN ribosomal).

	ACT	GSH	KAR	RNR	PRX
Témoin	7,62E-05 ± 3,40E-05	4,23E-09 ± 2,33E-09	0,89E-06 ± 0,43E-06	2,54E-08 ± 1,31E-08	0,93E-05 ± 0,42E-05
Cd Cl ₂	6,56E-05 ± 2,87E-05	33,70E-09 ± 1,40E-09 *	1,93E-06 ± 0,62E-06 *	10,60E-08 ± 3,89E-08 *	3,33E-05 ± 0,83E-05 *
5µg/ml	7,77E-05 ± 2,28E-05	3,62E-09 ± 1,31E-09	0,60E-06 ± 0,28E-06	1,39E-08 ± 0,478E-08	0,82E-05 ± 0,25E-05
10µg/ml	8,59E-05 ± 4,77E-05	4,75E-09 ± 3,75E-09	0,71E-06 ± 0,47E-06	2,00E-08 ± 2,09E-08	1,24E-05 ± 0,69E-05
20µg/ml	13,70E-05 ± 1,30E-05 *	10,20E-09 ± 1,07E-09 *	1,07E-06 ± 5,04E-06	2,32E-08 ± 1,01E-08	1,07E-05 ± 0,28E-05 *
50µg/ml	22,20E-05 ± 7,07E-05 *	7,98E-09 ± 4,16E-09 *	1,30E-06 ± 0,55E-06	2,09E-08 ± 0,46E-08	2,16E-05 ± 0,37E-05 *
100µg/ml	30,80E-05 ± 6,40E-05 *	15,00E-09 ± 7,48E-09 *	1,61E-06 ± 0,67E-06 *	5,41E-08 ± 0,54E-08 *	3,56E-05 ± 0,79E-05 *

Les résultats du tableau (3) représentent l'expression relative des différents gènes des levures témoins, témoin positif et levures traitées à différentes concentrations de ZnO-NPs. L'évaluation s'effectue par la comparaison du nombre de sites d'hybridation entre un gène provenant d'une cellule témoin et un gène issu d'une cellule traitée au ZnO. Les variations du nombre de sites d'hybridation (supérieur ou inférieur au témoin) indiquent des dommages causés à l'ADN comme des mutations ou des délétions ou même des recombinaisons.

Ainsi, il apparaît que les gènes GSH, ACT et PRX (glutathion, actine et respiration respectivement) montrent pour la concentration de 100µg/ml de ZnO, les plus importants gains de sites d'hybridations (respectivement de 4, 4 et 3,5 fois plus que l'expression des témoins).

Cependant, des différences non significatives avec le témoin ne signifient pas qu'il n'y a pas d'effets car il se pourrait que le nombre de gains et de pertes de sites d'hybridation soit le même.

4. **Discussion**

Précédemment, nous avons montré que le ZnO-NPs induisait un stress oxydatif sur les levures grâce à l'évaluation de divers biomarqueurs cellulaires.

Pour que ce travail soit aussi complet que possible, nous nous sommes intéressés dans cette partie aux éventuels dommages causés par le ZnO-NPs sur l'ADN des levures par une étude génotoxique.

En effet, le ZnO est connu pour être génotoxique chez deux invertébrés marins endobenthiques, le bivalve *Scrobicularia plana* et le ver *Hediste diversicolor* (Buffet, 2012) et sur les cellules humaines (Lu *et al.*, 2004 ; Sharma *et al.*, 2009 ; Baert *et al.*, 2013 ; Kozmus et Potočnik, 2015).

Les travaux portant sur la toxicité des NPs ont montré que ceux-ci induisaient une modification du profil génétique, comme l'apparition de nouvelles bandes en PCR, qui seraient dues à des mutations, des délétions ou des recombinaisons au niveau de l'ADN (Conte *et al.* 1998; Atienzar *et al.* 1999; Gupta and Sarin 2009).

Les polymorphismes ainsi générés pourraient être dus aux fortes concentrations de ZnO-NPs qui induiraient les effets génotoxiques observés.

La qPCR à partir de gènes spécifiques pour la mesure des dommages de l'ADN en utilisant une amplification ciblée, est un test largement utilisé pour mesurer l'intégrité des deux génomes nucléaires (Santos *et al.*, 2006). L'utilisation de cette technique s'est révélée efficace pour l'étude de la réponse à court terme des différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* au stress hyperosmotique causée par l'inoculation dans les moûts de raisins (Noti *et al.*, 2015).

Cette technique a également permis la sélection et la validation de gènes de référence au cours de la fermentation alcoolique de *Saccharomyces cerevisiae* pour une étude génotoxique des levures en présence de sulfites (Nadai *et al.*, 2015).

Plus récemment, le gène de référence pour le suivi des altérations au niveau de l'ADN dans les leucocytes de patients asthmatiques avant et après la prise de traitement anti-asthme a été identifié et validé grâce à la qPCR (Kozmus et Potočnik, 2015) par la comparaison du nombre de sites d'hybridation de plusieurs gènes.

Cette technique s'avère donc efficace dans la détection d'effets génotoxiques des xénobiotiques sur des organismes de tous types en allant de la levure *S. cerevisiae* jusqu'aux cellules humaines avec la possibilité de cibler des gènes précis pour bien comprendre leur rôle et les effets induits par les xénobiotiques.

Dans notre travail, lors de l'exposition des levures au ZnO-NPs, nous avons le choix entre le gène 18S ainsi que le gène de l'actine ACT pour leur utilisation comme gènes de référence, car les deux gènes sont connus pour être très résistants notamment au CdCl₂.

Cependant, lors de nos essais avec le ZnO, nous avons enregistré des altérations sur le gène de l'actine (par gain de sites d'hybridation) contrairement à ce qui a été observé avec le CdCl₂, alors que le gène 18S s'est montré résistant au ZnO-NPs (probablement grâce à l'abondance du gène 18S chez la levure).

Les résultats que nous avons obtenus à partir de la comparaison entre la création ou la perte du nombre de sites d'hybridation ont montré qu'il existait des dommages causés par le ZnO-NPs sur l'ADN.

Le gène le plus touché, après le gène ACT, est le gène PRX qui est responsable de la respiration, ce qui explique l'arrêt presque total de la respiration à la concentration de 100 µg de ZnO/ml. L'effet du ZnO a été plus important sur le gène PRX que celui du CdCl₂ qui est pourtant connu pour son effet génotoxique (Achard-Joris, 2005).

Concernant le gène KAR, nous n'avons pas noté de différence significative au niveau des gains et des pertes des sites d'hybridation. Cependant, ce résultat ne signifie pas l'absence de génotoxicité car il se pourrait que le nombre de sites d'hybridation perdus soit égal au nombre de sites d'hybridation réparés.

En effet, pour le mécanisme de réparation de l'ADN, le traitement au ZnO-NPs n'a pas eu d'effet génotoxique sur le gène responsable qui est le RNR3 sauf pour la plus forte concentration (100µg/ml) qui, au même titre que le CdCl₂, induit un nombre de sites d'hybridation significativement plus élevé, ce qui indique probablement une mutation au niveau de l'ADN par gain de sites d'hybridation au niveau de ce gène.

Enfin, pour les gènes GSH, nous avons enregistré un gain de 66,66% du nombre de sites d'hybridation, ce qui confirme la toxicité du ZnO. Cet effet sur le gène GSH est d'ailleurs retrouvé dans les travaux de Daoud *et al.*, (2012) suite au traitement des escargots d'eau douce *Lymnaea luteola* par les ZnO-NPs.

Etude génotoxique

Ainsi, nos résultats montrent qu'au niveau moléculaire, les ZnO-NPs induisent une modification significative sur 80% des gènes choisis, ce qui confirme son effet génotoxique sur la levure *S. cerevisiae*.

La qPCR est effectivement un outil adéquat pour l'étude d'impacts génotoxiques (adduits à l'ADN, cassures de l'ADN et mutations) sur divers organismes (Savva, 1996) par sa capacité de déceler des modifications au niveau de l'ADN génomique.

EFFET DU ZnO

Sur

Paramecium sp.

Chapitre 3 : Effets du ZnO sur la paramécie

Paramecium sp.

(Etude comparative entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Paramecium sp*)

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé au microscope et qui présente plusieurs avantages à son utilisation comme modèle alternatif.

En effet, sa facilité de culture et d'observation de ses fonctions cellulaires ainsi que sa grande taille font de cette espèce un modèle d'étude privilégié pour la biologie cellulaire.

1. Matériel et méthodes :

1.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est une souche sauvage de *Paramecium sp*

La Classification systématique de *Paramecium sp* est la suivante :

Domaine : **Eucaryotes**

Règne : **Protista**

Embranchement : **Ciliophora**

Classe : **Oligohymenophorea**

Ordre : **Peniculida**

Famille : **Parameciidae**

Genre : **Paramecium**

Espèce : **paramecium sp.**

1.2.Culture des Paramécies :

Pour suivre pendant plusieurs semaines la descendance d'une paramécie et réaliser sa courbe de croissance, il est nécessaire de réaliser des cultures pures et de procéder à des repiquages périodiques avec un milieu de culture optimisé pour la croissance de *Paramecium sp.* (Azzouz *et al.*, 2011).

1.3.Traitement au ZnO :

Afin de comparer les effets du ZnO sur les paramécies avec ceux obtenus sur les levures, nous utilisons les mêmes concentrations de ZnO-NPs (5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml).

1.4.Cinétique de croissance cellulaire

La technique retenue dans ce travail est une méthode de comptage des cellules vivantes présentes dans chaque échantillon sous microscope photonique (grossissement x4 et 10).

Dès la mise en contact du ZnO aux différentes concentrations avec le milieu cellulaire, une cinétique de croissance est suivie en fonction du temps: (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 et 72 heures).

Pour cela, 10 µl de chaque échantillon (témoin et traités) sont disposés sur lame puis 2 µl de solution de Lugol sont additionnés pour l'observation microscopique (Leica DL 1000) à l'aide d'un compteur manuel. Le nombre de cellules vivantes correspond à la moyenne obtenue sur trois répétitions.

1.5.Pourcentage de réponse :

C'est un calcul qui évalue le nombre de cellules non viables, il est basé sur l'équation suivante:

$$\% \text{ de réponse} = [(N_C - N_E) / N_C] \times 100$$

Où :

N_C : Nombre de cellules témoins

N_E : Nombre de cellules traitées.

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

1.6. Etude polarographique :

La consommation d'oxygène des paramécies est mesurée selon la méthode de (Djebar et Djebar, 2000) précédemment décrite dans la 1^{ère} partie.

1.7. Dosages biochimiques :

*Les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford, (1976).

*Les extraits enzymatiques sont préparés de la même manière que pour les levures.

Ainsi, les paramécies sont homogénéisées aux ultra sons dans du tampon phosphate pH 6,8. L'homogénat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 9000 g et le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la GST selon Habig *et al.*, (1974), du Glutathion réduit selon Weckberker & Cory (1988) et du Malondialdéhyde (MDA) selon Draper et Hadley (1990).

1.8. Analyses statistiques :

L'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés est utilisée pour estimer les différences signalées entre les paramètres étudiés.

Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins la déviation standard ($m \pm s$). Les différences sont considérées comme significatives ($P \leq 0,05$); très significatives ($P \leq 0,01$) et hautement significatives ($P \leq 0,001$).

Ce test est effectué en utilisant le logiciel d'analyse de traitement statistique des données: R i386. La différence entre les groupes témoins et traités est analysée en utilisant le test « t » de Student après contrôle de la normalité de la distribution des résultats.

2. Résultats :

2.1. Cinétique de croissance des paramécies :

La cinétique de croissance des paramécies est représentée sur la figure(28). Nous constatons une croissance normale avec une phase exponentielle et un plateau chez les paramécies témoins. Cependant le traitement par le ZnO-NPs induit une inhibition dose-dépendante de la croissance. Ainsi, au temps 6h le nombre de cellules est de l'ordre de 900 cellules /ml et il n'est que de 500 à la plus forte concentration (100µg/ml).

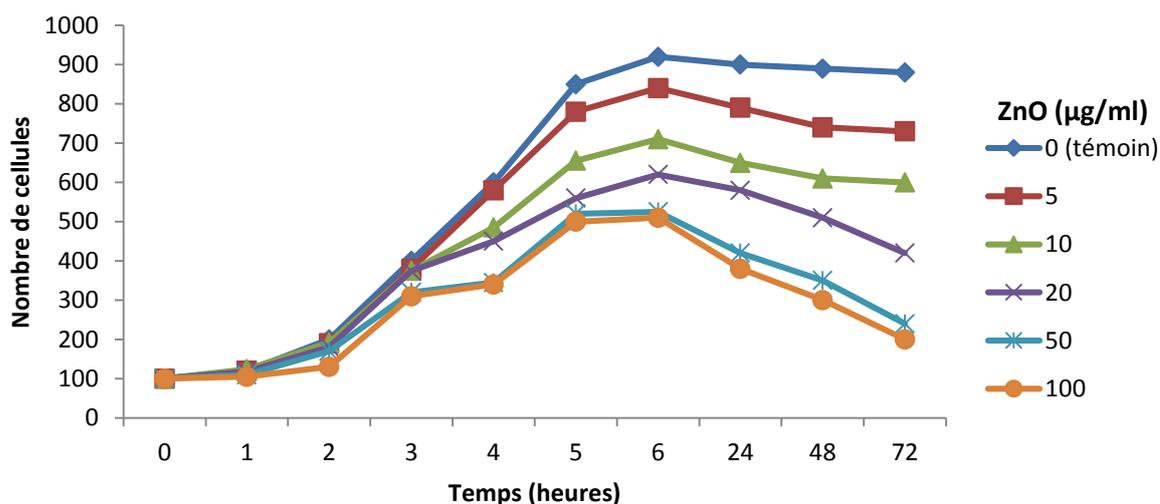


Figure 28 : Cinétique de croissance de paramécies témoin et traitées au ZnO.

2.2. Pourcentage de réponse :

La figure (29) met en évidence les valeurs du pourcentage de réponse des paramécies suite au traitement par des concentrations croissantes de ZnO-NPs. Nous constatons que les valeurs du pourcentage de réponse sont toutes positives avec un maximum pour les plus fortes concentrations du xénobiotique. Ainsi ce paramètre varie de 10% pour la plus faible concentration à environ 91% pour la plus forte concentration de ZnO.

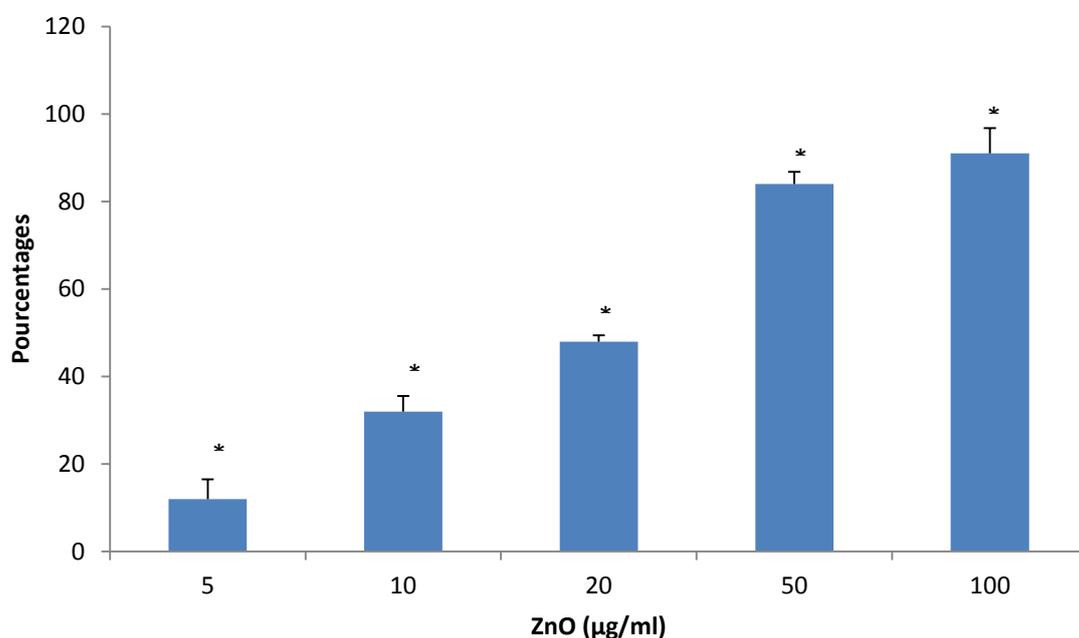


Figure 29. Effet des concentrations croissantes de ZnO sur le pourcentage de réponse de *Paramecium* sp. (m±s, n=3)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

2.3. Etude du métabolisme respiratoire :

La figure (30) représente les concentrations d'O₂ consommé dans le milieu par les paramécies. Ainsi, constatons une augmentation de la consommation d'O₂ chez les cellules traitées avec la plus faible concentration de ZnO NPs (5 µg/ml) par rapport aux cellules témoins avec respectivement (70 nmoles/ml et 85 nmoles/ml) après 10 mn. Parallèlement nous constatons une diminution dose-dépendante de la consommation d'O₂ chez les traités dès la concentration 10 µg/ml et à la concentration de 100 µg/ml de ZnO la consommation d'O₂ est quasiment nulle.

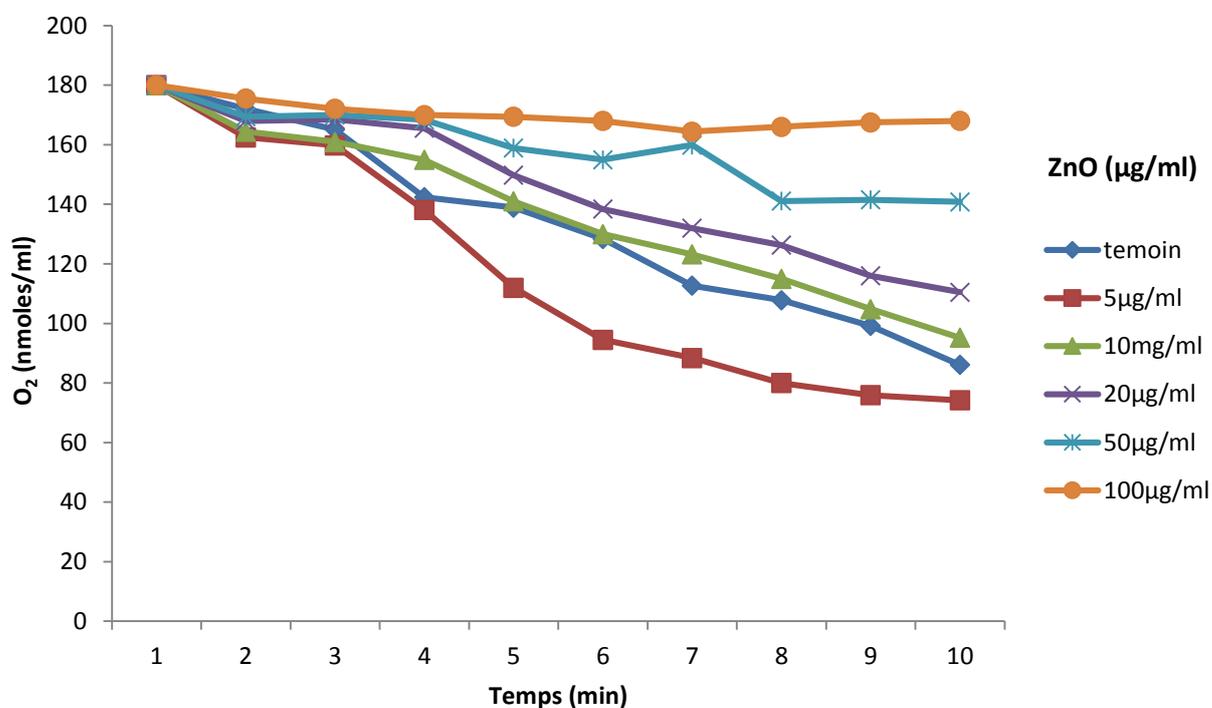


Figure 30 : Consommation d'oxygène (nmoles d'O₂/ml) chez *Paramecium* sp. Témoin et traités au ZnO.

2.4. Evolution du taux de Malondialdéhyde (MDA) :

La figure(31) illustre l'évolution du taux de MDA chez les paramécies témoins et traitées aux ZnO-NPs. Nous constatons une augmentation significative ($P \leq 0.05$) et dose dépendante du taux de MDA. En effet, nous notons une augmentation du taux de MDA 40 fois plus importante chez les traités par la plus forte concentration ZnO (100 $\mu\text{g/ml}$) par rapport aux témoins avec respectivement (6,8 et 0,2 $\mu\text{moles/mg}$ protéines).

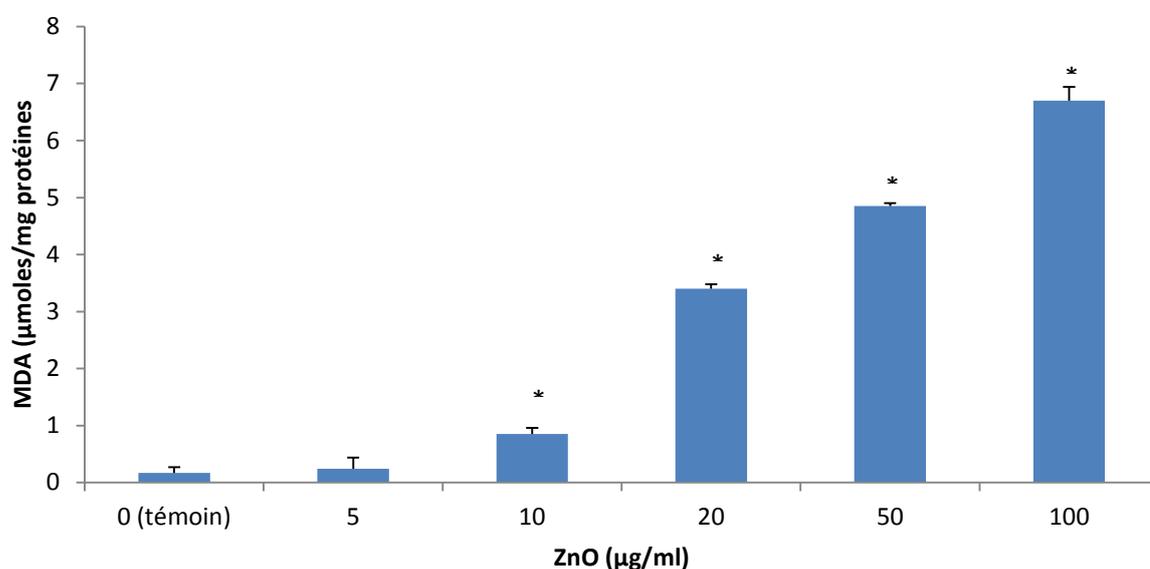


Figure 31 : Concentration en MDA ($\mu\text{mol/mg}$ de protéines) chez *Paramecium* sp. témoins et traités au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

2.5. Evolution du taux de Glutathion réduit (GSH) :

La figure (32) montre l'évolution du taux de GSH chez les paramécies témoins et traitées au ZnO. Nous constatons une diminution significative ($P \leq 0.05$) et dose-dépendante de ce paramètre. Ainsi, pour la plus forte concentration de ZnO, le taux de GSH est de l'ordre de 0,2 $\mu\text{moles/mg}$ protéines alors qu'il est de 6,8 $\mu\text{moles/mg}$ protéines chez les témoins.

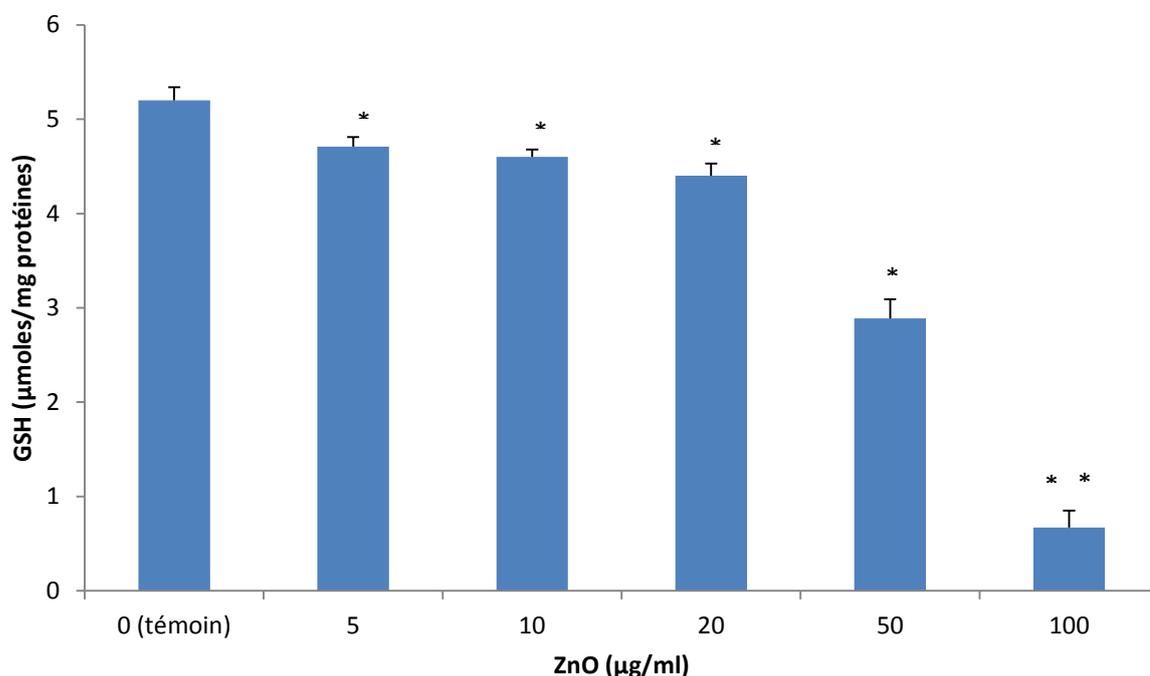


Figure 32 : Concentration en GSH ($\mu\text{mol/mg}$ de protéines) chez *Paramecium* sp. témoins et traitées au ZnO ($m \pm s$; $n=3$)

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

2.6. Suivi de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) :

L'activité de la GST évaluée chez les paramécies témoin et traitées (figure 33). Nos résultats révèlent une induction significative ($P \leq 0.05$) et dose-dépendante de l'activité GST chez les traités par des concentrations croissantes de ZnO et ce par rapport aux témoins. Ainsi l'activité GST est de l'ordre de 0,8 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protéines chez les témoins alors qu'elle atteint environ 6 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protéines pour la plus forte concentration de ZnO (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

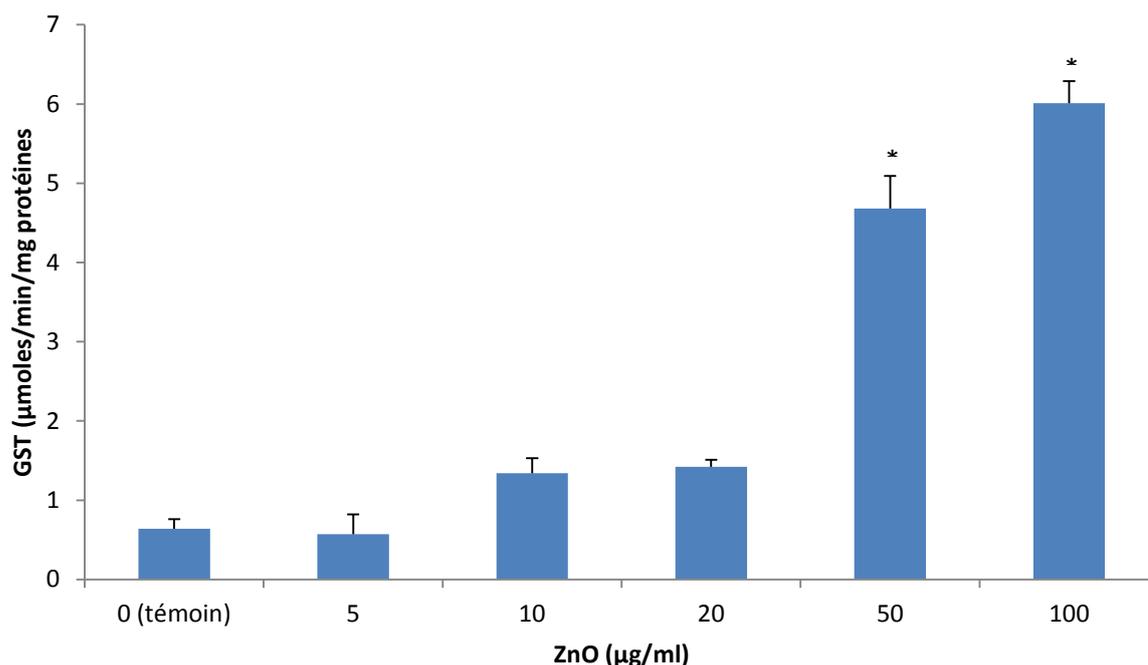


Figure 33 : Suivi de l'activité GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez *Paramecium* sp. témoins et traités au ZnO ($m \pm s$; $n=3$).

* : Significative ($P \leq 0.05$).

** : Très significative ($P \leq 0.01$).

*** : Hautement significative ($P \leq 0.001$).

3. **Discussion :**

Les principaux mécanismes décrits dans la littérature à propos du mode d'action des NPs sont principalement la dissolution des ZnO-NPs en ions zinc (Zn^{2+}), la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'interaction directe avec les cibles biologiques (Ma et Diamond, 2013).

Les trois mécanismes peuvent agir simultanément à des degrés divers selon les caractéristiques des cellules ou des organismes stressés par les NPs.

Dans cette partie de notre travail, nous avons évalué la toxicité des nanoparticules de zinc sur un modèle alternatif de choix, en l'occurrence la paramécie. Pour cela, les biomarqueurs évalués portent sur la concentration du GSH et du MDA ainsi que sur l'activité GST. Parallèlement, la cinétique de croissance, le pourcentage de réponse et la consommation d' O_2 ont également été mesurés.

Concernant les paramètres physiologiques (croissance, respiration), les résultats indiquent clairement que le traitement au ZnO-NPs a été particulièrement stressant chez la paramécie. Ce résultat est en accord avec les travaux de Saib et al., (2014) ou encore Benbouzid et al., (2012) qui ont mis en évidence une perturbation de la croissance de la paramécie traités par des xénobiotiques tels que les phosphoramidate. D'un autre côté, l'induction de l'activité GST vient conforter la toxicité des ZnO NPs, car la présence de ce xénobiotique dans le milieu intracellulaire enclenche chez la cellule un certain nombre de mécanismes de défense dont le plus important n'est autre que le système enzymatique GSH/GST Djekoun, M. (2015).

Nous avons également mis en évidence une augmentation du taux de MDA révélant ainsi une toxicité des ZnO-NPs à travers l'installation d'un stress radicalaire ayant pour conséquence une peroxydation lipidique dont le biomarqueur principal n'est autre que MDA. Ce résultat est en parfait accord avec celui de Saib *et al.*, (2014), qui a travaillé sur des paramécies traitées par 3 amidophosphonates de synthèse.

L'un des mécanismes proposés pour expliquer la toxicité des ZnO-NPs, est la dissolution des ions Zn^{2+} , qui selon Kahru *et al.*, (2008), peut expliquer leur cytotoxicité. En effet, la toxicité des nanoparticules de ZnO sur les bactéries *Vibrio fischeri* est causée par la libération d'ions Zn^{2+} dissous (Heinlaan *et al.*, 2008). Plus généralement, Brunner *et al.*, (2006) ont montré que la cytotoxicité de nanoparticules d'oxyde de métal (ZnO, CeO_2 , ZrO_2 , SiO_2 , Fe_2O_3) sur des cultures *in vitro* de cellules de mammifères est due à la solubilité de ces nanoparticules.

Dans le but de vérifier le degré de sensibilité des levures et des paramécies au traitement par les ZnO-NPs, nous avons effectué une comparaison de quelques biomarqueurs chez ces deux espèces.

Cependant, concernant les levures, qui possèdent une paroi rigide empêchant la pénétration massive des ions Zn^{2+} , la dissolution des ions Zn^{++} n'est pas le plus important (Kasemets *et al.*, 2009). Ce serait plutôt la génération des ROS qui serait la plus impliquée dans la toxicité (Ma et Diamond, 2013).

Le métabolisme respiratoire des paramécies, a été inhibé dès la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ alors que celle des levures ne l'a été qu'à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$ de ZnO laissant ainsi apparaître une plus grande sensibilité des paramécies.

Les résultats obtenus avec les biomarqueurs sont plus révélateurs de la sensibilité de la paramécie par rapport à la levure.

Ainsi, nous avons relevé que les modifications portant sur les taux de GSH sont plus accentuées chez la paramécie (diminution de 9 fois chez la paramécie contre seulement 6 fois chez la levure, à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$) par rapport à leurs témoins respectifs.

Le taux de MDA montre une différence encore plus marquée avec une augmentation de 40 fois chez la paramécie par rapport au témoin contre seulement 25 fois chez la levure, toujours à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.

L'évaluation de l'activité GST (biomarqueur d'exposition et d'effet) conforte ces résultats, car nous avons noté chez la paramécie une augmentation de 10 fois supérieure à celle du témoin contre seulement 4,5 fois chez *S. cerevisiae*.

Nos résultats montrent, d'une part, que la paramécie subit un stress oxydatif identique à celui observé chez la levure, et d'autre part que la toxicité est plus élevée chez la paramécie comparativement à la levure.

Il est évident que si l'on veut réellement démontrer la prédominance de l'un des mécanismes d'action sur l'autre, d'autres investigations plus approfondies sont nécessaires et seront proposées en perspectives de ce travail.

Il reste, cependant, que les résultats obtenus dans cette étude comparative laissent à penser que la dissolution des ions Zn^{2+} a une action plus importante chez la paramécie qui ne possède pas de paroi rigide comme de nombreuses cellules étudiées

telles les cellules de mammifères notamment (Brunner *et al.*, 2006; Limbach *et al.*, 2007; Karlsson *et al.*, 2008).

D'ailleurs, Kasemets *et al.*, (2009), ont montré que la levure *S. cerevisiae* est relativement résistante aux nanoparticules de CuO et de ZnO comme d'autres organismes unicellulaires (bactéries, algues), qui, à priori, ont la capacité de s'opposer à l'influx des particules par rapport aux organismes utilisés dans les tests écotoxicologiques (*Daphnia magna* et *T. platyurus*) qui ingèrent les nanoparticules.

Ces auteurs concluent que c'est la présence de la paroi cellulaire rigide des levures qui permet d'éviter l'absorption directe des nanoparticules.

Ainsi, l'absorption des nanoparticules dans des cellules de mammifère a été démontrée pour divers types de cellules avec différents processus, y compris la phagocytose et l'endocytose. Les nanoparticules d'oxyde de métal, par exemple, une fois dans la cellule, peuvent se dissoudre libérant des concentrations néfastes d'ions dans la cellule (Limbach *et al.*, 2007).

Néanmoins, même si les cellules ont une paroi cellulaire rigide, la rupture de cette paroi cellulaire et de la membrane par les ions dissous et / ou le stress oxydatif provoqué par les nanoparticules, peut modifier la perméabilité de la membrane et augmenter la probabilité d'entrée des nanoparticules dans la cellule comme cela a été montré sur les bactéries *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* traitées aux ZnO-NPs (Huang *et al.*, 2008).

Toujours selon ces auteurs, l'utilisation combinée de capteurs microbiens spécifiques aux métaux et des tests de toxicité permettront de différencier le rôle toxique des ions métalliques par rapport aux effets toxiques liés au stress oxydatif.

Conclusion générale :

Ce travail porte sur l'évaluation des effets des nanoparticules d'Oxyde de Zinc sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* et la paramécie *Paramecium sp.*

Dans une première partie, nous avons étudié le stress oxydatif généré par des concentrations croissantes de ZnO chez *S. cerevisiae*. sur certains paramètres physiologiques.

Dans une seconde partie, nous avons évalué la génotoxicité du ZnO chez la levure grâce à la technique de la PCR quantitative (qPCR).

Enfin, dans une troisième partie, nous avons évalué le stress oxydatif chez la paramécie afin de comparer le comportement de différents modèles cellulaires alternatifs visàvis du xénobiotique testé (ZnONPs).

Les paramètres physiologiques étudiés portent sur la croissance, le pourcentage de réponse et le métabolisme respiratoire aussi bien chez la levure que chez la paramécie.

Plusieurs biomarqueurs ont été évalués. Chez la levure, nous avons mesuré la concentration en glutathion réduit (GSH), en malondialdéhyde (MDA), en protéines, en glucides et en lipides, ainsi que les activités enzymatiques catalase (CAT), glutathion S-transférase (GST), superoxyde dismutase (SOD) et peroxydases (APx et GPx).

Chez la paramécie, en plus des paramètres physiologiques, nous nous sommes limités à trois biomarqueurs, à savoir les concentrations de GSH et de MDA ainsi que l'activité GST.

La génotoxicité a été mise en évidence par l'évaluation du nombre de sites d'hybridation acquis ou perdus de l'ADN des levures traitées aux ZnO-NPs par la qPCR.

Les principaux résultats obtenus montrent clairement une toxicité des ZnO-NPs aussi bien chez la levure que chez la paramécie ainsi qu'un effet génotoxique du ZnO sur les levures.

Le ZnO a significativement affecté les paramètres physiologiques chez la levure et la paramécie : ainsi, la croissance et le pourcentage de réponse sont significativement inhibés par les nanoparticules et ce d'une manière dose dépendante.

Conclusion générale

La consommation d'O₂ est inhibée dès la concentration de 10 µg/ml chez la paramécie alors que celle de la levure n'est inhibée qu'à partir de 20 µg/ml. De plus, aux fortes concentrations, la respiration est inhibée aussi bien chez la levure que chez la paramécie. Ce résultat montre la sensibilité des paramécies par rapport aux levures vis-à-vis des nanoparticules de ZnO.

Cette sensibilité se retrouve également lors de l'évaluation des biomarqueurs du stress oxydatif. En effet, tous les biomarqueurs mesurés sont affectés par le traitement au ZnO et ce d'une manière dose dépendante.

Les principaux résultats obtenus chez la levure montrent :

- Une diminution de la concentration du GSH et une augmentation de la production de MDA traduisant la mise en place des systèmes de défense de la cellule et une peroxydation lipidique.
- Une augmentation dose dépendante des activités enzymatiques anti oxydantes GST, CAT, SOD et peroxydases (APx et GPx) confirmant ainsi l'effet oxydant du ZnO sur les levures.

Les mêmes résultats sont obtenus chez les paramécies traitées aux ZnO-NPs, à savoir :

- Une diminution de la concentration du GSH
- Une augmentation de la concentration du MDA
- Une augmentation de l'activité GST.

Cependant, les effets observés chez la paramécie sont sensiblement plus importants que ceux observés chez la levure, ce qui dénote d'une plus grande sensibilité de la paramécie vis-à-vis aux nanoparticules.

Par ailleurs, après avoir mis en évidence un stress oxydatif chez les levures traitées au ZnO, nous nous sommes intéressés à un éventuel effet génotoxique en évaluant le nombre de sites d'hybridation au niveau de quelques gènes chez la levure par qPCR et nos résultats révèlent des dommages causés au niveau de quatre gènes sur les cinq évalués.

Les deux principaux gènes qui ont été le plus affectés sont le gène de la respiration et le gène du glutathion. Ces deux gènes ont subi une forte augmentation du nombre de sites d'hybridation ce qui est synonyme soit de mutations soit de dommages génétiques.

Conclusion générale

Au final, il ressort de notre travail que les nanoparticules de ZnO génèrent, d'une part, un stress oxydatif chez deux modèles cellulaires alternatifs différents (les levures et d'une manière plus prononcée les paramécies), et d'autre part, un effet génotoxique touchant particulièrement les gènes responsables de la respiration et de la production de GSH.

En perspectives :

Les perspectives qui ressortent suite à ce travail s'orientent principalement sur l'étude du mécanisme d'action des NPs en général et du ZnO en particulier. Il nous semble intéressant, en effet, d'explorer la piste de la dissolution des ZnO-NPs en ions Zn^{2+} et leurs effets sur d'autres modèles cellulaires (bactéries, cellules végétales) afin de confirmer le rôle « protecteur » de la paroi rigide.

Pour cela, il nous semble que la même approche sera effectuée avec non pas des NPs mais avec des ions Zn^{2+} sur les mêmes paramètres.

De plus, une observation de la membrane cellulaire en microscopie électronique pourrait également être fructueuse pour comparer les effets du ZnO et des ions Zn^{2+} .

Enfin, l'aspect génotoxique pourrait être développé sur d'autres gènes, notamment les gènes responsables des enzymes anti oxydantes.

Bibliographie :

- Acceituno, F.E.A., 2013. Systematic characterization of the oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* ec1118 in oenological conditions. Phd Thesis. Pontificia Universidad Catolica de Chile. Pp 124.
- Achard-Joris M. 2005. Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Université bordeaux1.
- Adams L K, Lyon D Y, Alvarez P J J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40(19): 3527–3532
- Amamra, R., Djebbar, M.R., Moumeni, O., Azzouz, Z., Zerriri, I., 2015. Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)*, 6(4), 115-123.
- Applerot G, Lipovsky A, Dror R, Perkas N, Nitzan Y, Lubart R, Gedanken. 2009. A. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. *Advanced Functional Materials*, 19(6): 842–852
- Arnaud, A., & Guiraud, J. 1993. Le métabolisme microbien. *Biotechnologie* Volume 49 Pp 124-129.
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment* 407, 1461–1468.
- Atha, D. H., Wang, H., Petersen, E. J., Cleveland, D., Holbrook, R. D., Jaruga, P., 2012. Copper oxide nanoparticles mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science and Technology*, 46, 1819–1827
- Atienzar, F. A., Conradi, M., Evenden, A. J., Jha, A., & Depledge, M. H. 1999. Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* to benzo[a]pyren. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2275–2282.
- Azzouz Z. Berrebah H., Djebbar M.R. 2011. Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (20) : 3243-3250.

- Bacha, A., 2008. Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur substrat a base de datte. Thèse de doctorat, université de Batna. Pp 14-23.
- Baert, C. Novack, L. Lison, D. (2013). Occupational exposure to nanoparticles and skin protection. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement. Volume 74. Issue 5. Pp : 488-498.
- Barillet, S., 2007. Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zébre (*Danio rerio*). Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine de Metz. France. Pp 184-186. Pp 476.
- Benbouzid H, Brrebah H, Berredjem M, Djebbar MR (2012) Toxic effects of phosphoramidate on paramecium sp. with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. Toxicological & Environmental Chemistry 1-9, iFirst.
- Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A (2009) Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environ Pollut 158:41-47
- Bocquet, J., 1993. Généralités sur les microorganismes, in biotechnologie, 4^{ème} Edition, Lavoisier, tec & Doc, Paris, 15-58
- Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M. and Kahru A. (2013) Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. Arch Toxicol 87:1181-1200
- Borm P, Klaessig F C, Landry T D, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. Toxicological Sciences, 90(1):23-32
- Botton, B. 1991. La physiologie des levures, in biotechnologie des levures, Masson, Paris, 97-170.
- Bouaricha, H., Berrebbeh, H., Grara, N., Djebbar, M.R., 2012. Response of *Paramecium* sp. With respect to insecticide (Proclaim): growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. Journal of Applied Science Research, 8 (8), 4172-4180.
- Bouix M., and Leveau, J.Y. 1993. Les levures, in Microbiologie industrielle, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 2-93.

- Boxall A, Chaudhry Q, Sinclair C, Jones A, Aitken R, Jefferson B, Watts C. 2007. Current and Future Predicted Environmental Exposure to Engineered Nanoparticles. Central Science Laboratory, York, UK.
- Bradford M.M.,1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*,72: 248-254.
- Bricheux G., Brugerolle G. (1986). The membrane cytoskeleton complex of euglenids biochemical and immunological characterization of the epiplasmic proteins of *Euglena acus*. *European journal of cell biology*; 40(2): 150-159.
- Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R.N., Limbach, L.K., Bruinink, A., Stark, W.J., 2006. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science and Technology* 40, 4374–4381.
- Buffet P.E. (2012). Évaluation du risque environnemental des nanoparticules métalliques : biodisponibilité et risque potentiel pour deux espèces clés des écosystèmes estuariens. Thèse de doctorat en Pharmacie. Écotoxicologie. Université de Nantes.
- Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis* 18, 25–36.
- Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25(2):169-93.
- Cabral, M.G., Viegas, C.A., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I., 2003. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere* 51, 47–54.
- Charpentier, S., Lubbers, B., Leger, M. et Feuillat.M. 1993. Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle C. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 27(1), 13-22.
- Cheng Y, Morshed RA, Auffinger B et al 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 66:42–57.
- Cherait, A. (2014). Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle expérimental

bioindicateur de stress. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba (Algérie).

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

Cohen, J., 2007. Génétique de la dynamique cellulaire chez la paramécie. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.).Département de Génétique des Fonctions Cellulaires.

Conte, C., Mutti, I., Pulish, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E., et al. (1998). DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution. Chemosphere, 37, 2739–2749.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.-C. & Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques, pp. 149-161. in Lagadic, L., T. Caquet, J.-C. Amiard & F. Ramade eds. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.

Daoud A., Saud A., Sudhir K., Maqsood A., Maqsood A.S. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. Aquatic Toxicologie. Volume 124-125 Pp: 83-90.

Dastjerdi R, Montazer M (2010) A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. Colloid Surf B 79(1):5–18

De Freitas, J.M., Wintz, H., Kim, J.H., Poynton, H., Fox, T., Vulpe, C., 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. BioMetals 16, 185– 197.

Depledge, M.H., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, *in* : Fossi, M.C., Leonzio, C., Eds. Lewis Publishers, p. 271-296.

Djebar, H and Djebar. M.R., 2000. Bioénergétique, les mitochondries végétales. Revue des sciences et technologie; Synthèse 2000. Publication de l'Université de Annaba (Algérie). Edition Végérol : 103.

Djekoun M., Berrebah H. and Djebar M.R. 2015. Growth kinetics, monitoring of biomarkers and respiratory metabolism to evaluate the combined effects of fludioxonil and difenoconazole in a freshwater ciliated protist: *Paramecium* sp. Der Pharma Chemica. 7(11): 197-204.

- Djekoun, M., 2012. Evaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le cadmium à l'échelle cellulaire: cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- Djekoun, M., Djebbar, M.R., Rouabhi, R., Zaoui, L., Bensoltane, S., Djebbar, H., (2010). Biochemical, enzymatic and energy Alterations Observed in *Saccharomyces cerevisiae* subjected to oxidative stress. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 2 (1), 36-42.
- Downs CA, Shigenaka G, Fauth JE, Robinson CE, Huang A (2002) Cellular physiological assessment of bivalves after chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil using a novel molecular diagnostic biotechnology. Environ Sci Technol 36:2987–2993
- Draper. H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth. Enzymol. 186, P.241-431.
- Duchateau A. & Florin P. ,1959. La tréhalosemie des insectes et sa signification. Arch. Insect. Physiol. Biochem,67(2): 306-314.
- Elyse Poitras et Alain Houde (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology. 2(2):2-11.
- Fernández , D. García-Gómez , C. Babín, M. (2013). *In vitro* evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells. Science of The Total Environment. Volumes 452–453. Pp : 262–274.
- Franklin, N., Rogers, N., Apte, S., Batley, G., Gadd, G., Casey, P., 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalgae (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. Environmental Science and Technology 41, 8484–8490.
- Fréchin, M., 2010. Identification et rôle des partenaires de la voie de transamination de la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'adaptation à la respiration. Thèse de doctorat, université de strasbourg.
- Freire-Picosa, Cornelis P. Hollenbergb, Karin D. Breunigb, M.Esperanza Cerdan 1995. Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. FEBS Letters Volume 360, Pp : 39–42.
- Fujita K and Takahashi Y. 1998 bioassay for chemical toxicity using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Water Science and Technology, vol 38 n7 269-267.

- Gajjar P, Pettee B, Britt D W, Huang W, Johnson W P, Anderson A J. 2009. Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(1): 9
- Galloway, T.S., Brown, R., Browne, M., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M., Jones, M., 2006, The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 53, p. 186-194.
- Garric, J. ; Morin, S.; Vincent-Hubert, F. 2010 Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences, eaux & territoires*, N°1 : 12-17.
- Goffeau, A. Barrell, B.G. Bussey, H. Davis, R.W. Dujon, B. Feldmann, H. Galibert, F. Hoheisel, J.D. Jacq, C. Johnston, M. Louis, E.J. Mewes, H.W. Murakami, Y. Philippsen, P. Tettelin et H. Oliver, S.G. 1996 « Life with 6000 genes », *Science*, vol. 274,p. 563- , .567
- 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 GJ, Mordue W, Guthkelch J.,1972. Studies on insect adipokinetic hormones. *Gener. Compar. Endocrinol* . 18: 545-551.
- Grioras, L (2005) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ABC-transporter Yor1p overexpressed in plasma membranes.
- Gupta, M., & Sarin, N. B. (2009). Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification. *Journal of Environmental Sciences*, 21, 686–690.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathion-s-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hagger, J., Jones, M., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T., 2008, Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 56, p. 1111-1118.**
- Hao L and Chen L (2012) Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf* 80:103–110
- Hardman R, 2006. A toxicological review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 114(2):165-72.

- Haubenstricker, M. E., Meier, P. G., Mancy K. H., et al 1990. Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, vol. 44, pp 669-674.
- Heinlaan, H., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus paltyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316.
- Hiltunen, J.K., Mursula, A.M., Rottensteiner, H., Wierenga, R.K., Kastaniotis, A.J., Gurvitz, A. (2003). The biochemistry of peroximasl beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.* 27. Pp: 35-64.
- Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., Hao, B., 2008. Toxicological effects of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 24, 4140–4144
- Hund-Rinke, K., Simon, M., 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research* 13, 225–232.
- Iwahashi, H., Kawai R. and al. 2000. Hsp104 expression and morphological changes associated with disinfectants in environmental bioassay using stress response. *Water Science and Technology*, vol42, N7 pp 237-243
- Jackson, R. S., 1994. *Wine science, principles and applications*, academic press, San Diego, California, 235-276.
- Jain S, Hirst DG, O’Sullivan JM. 2012. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol* 85:101–113.
- Jawich D., hilanC. SalibaR. Lteif R., Sterehaino P., (2005) effets de pesticides sur deux souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Metschnikowia pulcherrima*. *Journal international de la vigne du vin*, 39, 2, 67-74.
- Ji J, Long Z, Lin D (2011) Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chem Eng J* 170:525–530.
- Jin T, Sun D, Su J Y, Zhang H, Sue H J. 2009. Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 74(1): M46–M52
- Jones N, Ray B, Ranjit K T, Manna A C. 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1): 71–76

- Jones, C. F. and D. W. Grainger 2009. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 61, 56:438-456.
- Kahru A., Dubourguier HC. 2010. from ecotoxicologie to nanecotoxicologie. *Toxicology Mar* 10. 269(2-3):105-19.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L., 2008. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chemical Research in Toxicology.* 21, 1726–1732
- Kasemets K., Ivask, A., Dubourguier, H.C., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro.* 23: 1116–1122.
- Kasemets, K., Kahru, A., Laht, T.M., Paalme, T., 2006. Study of the toxic effect of the short- and medium-chain monocarboxylic acids on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* using CO₂-auxo-accelerostat fermentation system. *International Journal of Food Microbiology* 111, 206–215.
- Kennedy S. 2010. Important considerations for determining qPCR Efficiency.
- Kidd PM (1997) Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev* 2:155–176
- Kocharin, K., 2013. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for polyhydroxybutyrate production. Phd thesis. CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY; Goteborg Sweden.
- König H 2009. *Biology of Microorganisms on Grape in Must and in Wine.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp: 47-56.
- Kozmus, C. E.P. Potočnik, U. (2015). Reference genes for real-time qPCR in leukocytes from asthmatic patients before and after anti-asthma treatment. *Gene.* Volume 570. Pp: 71-77.
- Kungolos, A., Aoyama, I., Muramoto, S., 1999. Toxicity of organic and inorganic mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 43, 149–155.
- Kwon SJ, Bard AJ. 2012. DNA analysis by application of Pt nanoparticles electrochemical amplification with single label response. *J Am Chem Soc* 134:10777–10779.
- Labra, M., Di Fabio, T., Grassi, F., Regondi, S. M., Bracale, M., Vannini, C., et al. 2003. AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants. *Chemosphere,* 52, 1183–1188.

- Lagadic, L. Caquet, T. Amiard, J.C. et Ramade, F. , 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Collection Écologie, Paris, Masson, 419 pp.
- Lagadic, L. Caquet, T. Amiard, J.C. et Ramade, F.1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 57-76.
- Lee S. & Chung H. & Kim S. & Lee. I. 2013. The Genotoxic Effect of ZnO and CuO Nanoparticles on Early Growth of Buckwheat, *Fagopyrum Esculentum*. Water Air Soil Pollut. 224:1668.
- Leyral, G., vierling E., 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments. 4ème Ed- Doin. Bordeaux, Pp : 24-25.
- Li J H, Liu X R, Zhang Y, Tian F F, Zhao G Y, Yu Q L Y, Jiang F L, Liu Y. 2012. Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. Toxicological Reviews, 1(2): 137–144
- Li M, Zhu L, Lin D. 2011. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. Environmental Science & Technology , 45(5): 1977–1983
- Limbach, L.K., Wick, P., Manser, P., Grass, R.N., Bruinink, A., Stark, W.J., 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. Environmental Science and Technology 41, 4158–4163.
- Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu Z Q, Lin M. 2009. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. Journal of Applied Microbiology, 107(4): 1193–1201
- Liu Y, Zhou QX, Xie XJ, Lin DS, Dong LX (2010) Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. Ecotoxicology 19:1551–1559
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull 42:656–666
- Livingstone DR (2003) Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. Rev Med Vet 154:427–430
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcás, J. A., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., 2010. Evidence of differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. Environmental Science and Technology, 44, 7315–7320

- Lu, T. Pan, Y. Kao, SY. Li, C.K, Chan, J. & Yankner B.A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the aging human brain. *Nature* Volume 429. Pp : 883-891.
- Ma H, Williams PL, Diamond SA. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles—a review. *Environmental Pollution*, 172: 76–85
- Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361–370
- Martinez R Anthony, Lee Bardwell, Jeanette G. Cook¹, Deepak Voora, Daniel M. Baggott. 1998. Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes & Dev.* 12: 2887-2898
- McFarland VA, Inouye LS, Lutz CH, Jarvis AS, Clarke JU, McCant DD (1999) Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:236–241
- Migowski P, Dupont J. 2007. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. *Chemistry* 13:32–39. doi:10.1002/
- Mingsheng X, Li J, Hanagata N, Huanxing S, Chen H, Fujita D (2013) Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanomaterials for nanotoxicology—the case of ZnO nanoparticles. *Nanoscale* 5:4763–4769
- Mohammadkhani, S. Heibari, M. (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish journal of Biology*, 32, 23-30.
- Mortimer, M., Kasemets, K., Heinlaan, M., Kurvet, I., Kahru, A., 2008. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicology in Vitro* 22, 1412–1417.
- Mouithys-Mickalad A, Mareque Faez J, Christiaens L, Kohnen S, Deby C, Hoebeke M, Lamy M, Deby-Dupont G. 2004. *In vitro* evaluation of glutathione peroxidase (GPx)-like activity and antioxidant properties of some Ebselen analogues. *Redox Report*; 9: 81-7.
- Mwaanga, P. Carraway, E. R. Van Den Hurka, P. (2014). The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology*. Volume 150. Pp: 201-209.
- Myers, T.W. and Gelfand, D.H. (1991) Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 30, 7661–6.
- Nadai, C. Campanaro, S. Giacomini, A. Corich V. (2015). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR studies during *Saccharomyces cerevisiae*

alcoholic fermentation in the presence of sulfite. International Journal of Food Microbiology volume 215. Pp : 49-56.

Narayanan R, El-Sayed MA. 2005. Catalysis with transition metal nanoparticles in colloidal solution: nanoparticle shape dependence and stability. J Phys Chem B 109:12663–12676.

Nehem, N., 2008. Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *oenococcus oeni*, impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en culture séquentielles et mixtes. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Noti, O. Vaudano, E. Pessione, E. Garcia-Moruno E. (2015). Short-term response of different *Saccharomyces cerevisiae* strains to hyperosmotic stress caused by inoculation in grape must: RT-qPCR study and metabolite analysis. Food Microbiology. Volume 52. Pp : 49-58.

Oteng-Gyang, K., 1984. Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. Pp : 43-46.

Padmavathy N, Vijayaraghavan R (2008) Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater 9(3):035004

Panon, G. 1997. Culture mixtes et séquentielles de levures cidicoles: *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, *Hanseniaspora valdyensis* et *Metchnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. Science des aliments, 17, 193-217.

Patil MA, Parikh PA. 2014. Investigation on likely effects of Ag, TiO₂, and ZnO nanoparticles on sewage treatment. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 92:109–114.

Peralta-Videoa JR, Hernandez-Viezcas JA, Zhao L, Diaz BC, Ge Y, Priester JH, Holden PA, Gardea-Torresdey JL (2014) Cerium dioxide and Zn oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. Plant Physiol Biochem 80:128–135

Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. J Nanopart Res 14:1109–1120

Pineau, L. (2008). Impact de perturbation de l'homéostasie lipidique sur la fonctionnalité de la voie de secretion chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat, université de Poitiers. 2015 pages.

Pol, D. (1997). Travaux pratiques de biologie des levures, Ellipses, 59-107.

- Rao S, Shekhawat GS (2014) Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. J Environ Chem Eng 2: 105–114
- Reed DJ, Beatty PW (1980) Biosynthesis and regulation of glutathione: toxicological implications. Rev Biochem Toxicol 2:213–241
- Research and Markets (2012). <http://www.researchandmarkets.com> / reports /2116313 /the global market for zinc oxide nanopowders_2012.pdf
- Ricke SC, Hanning I. 2013. Nanotechnology safety. doi: 10.1016/B978-0-444-59438-9.00009-6
- Saib, A., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebbar, MR., 2014. Cytotoxicity study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. Toxicology Research, 3, 395-399.
- Sajid M., Ilyas M., Basheer C., Tariq M., Daud M., Baig N. & Shehzad F. 2015. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. Environ. Sci. Pollut. Res. 22:4122–4143
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Tan Lab Library 07-94.
- Santos, J.H. Meyer, J.N. Mandavilli, B. S. Van Houten B. (2006). Quantitative PCR-Based Measurement of Nuclear and Mitochondrial DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. Volume 314 of the series Methods in Molecular Biology. Pp: 183-199.
- Sarkar, T., Vijay Anand, K. G., & Reddy, M. P. 2010. Effect of nickel on regulation in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. BioMetals, 23, 1149–1158.
- Savva D (1996). DNA finger printing as a biomarker assay in ecotoxicology. Toxicol Ecotoxicol News Rev. Volume : 3. Pp : 110-114.
- Schmitt, M., Gellert, G., Ludwig, J., Lichtenberg-Fraté, H., 2004. Phenotypic yeast growth analysis for chronic toxicity testing. Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 142–150.
- Scriban, R., 1993. Biotechnologie. (4ème ED) technologie et documentation Lavoisier. Paris, 886 p.
- Sen CK, Marin E, Kretzschmar M, Hanninen O (1992) Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise and immobilization. J Appl Physiol 73:1265–1272

- Serpone N, Dondi D, Albini A (2007) Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorg Chim Acta* 360:794–802
- Servais, S., 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et une supplémentation d'oméga-3. Thèse de doctorat Claude Bernard- Lyon-1 Université. France. Pp48-49
- Setac**, 1992, Biomarkers, Huggett, R., Kimerle, R., Mehrle, P., Bergman, H. (eds.), *Proceedings of the Heighth Pellston Workshop*, Keystone Colorado, July 1989, Lewis Publishers.
- Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P, Mahmoudi M (2012) Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev* 41: 2323–2343
- Sharma, V. Shukla, R.K. Saxena, N. Parmar, D. Das, M.Dhawan A. (2009). DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology Letters*. Volume 185. Pp: 211-218.
- Shen, Z. Chen, Z. Hou, Z. Li, T. Lu, X. 2015. Ecotoxicological effect of zinc oxide nanoparticles on soil microorganisms. *Front. Environ. Sci. Eng.* DOI 10.1007/s11783-015-0789-7
- Shibko S. , Koivistoinen P. , Tratyneck C. , New hall A. Freidman L.,1966. A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction, *Analyt. Biochem*, 19:415-428.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., et al. 2009. Nanogenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891–3914.
- Song W, Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, Li L, Sun Z. 2010. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol Lett* 199(3):389-397
- Song Y, Zhu LS, Wang J, Wang JH, Liu W, Xie H (2008) DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Biochem* 41:905–909
- Sonneborn T.M. (1974). Ciliate morphogenesis and its bearing on general cellular morphogenesis. *Tsitologiia*;16(9): 1063-1088.
- Sönnichsen C, Reinhard BM, Liphardt J, Alivisatos AP. 2005. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nat Biotechnol* 23:741–745.

- Strehaiano, P, M.L. Delila & P; Taillandier. 1999. Numération des levures *Saccharomyces cerevisiae* et mesure de la viabilité en vinification. Laboratoire de génie chimique. Onologues N°91, Pp: 17-20.
- Thutiaux, P. 2004. Les organismes modèles, la levure. Edition Belin, Paris, 14-63.
- Tijana M. 2015. Dissipation of chlorpyrifos-methyl by *Saccharomyces cerevisiae* during wheat fermentation 516–523.
- Todorova, T., 2007. Glutathione S-transferase and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de doctorat. Université Louis pasteur, strasbourg1 et université de sofia St. Kliment Ohridski. Pp 155.
- Tomaska, L. 2000. Mitochondrial protein phosphorylation: lessons from yeasts. Gene. Vol 255, 59-64.
- Unlu, E.S., Koc, A., 2007. Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. Annals of the New York Academy of Sciences 1100, 505–509.
- Van Keulen G., Siebring J., Rembacz K.P., Hoogeveen M., Tomczynska M. and Dijkhuizen L. 2004. Improved method for the isolation of RNA from (standing liquid cultures of) *Streptomyces*.
- Van Maris, A.J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M. et al., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current statut. Antonie Leeuwenhoek, 90, 391-418.
- Vargas, F., aceituno, F.f., et al., 2010. Biochemistry and molecular biology of Yeas Alcoholic Fermentation. Comprehensive food fermentation and biotechnology. Pandey, A., Soccol, C.R., gnansounou E., et al. New Delhi, India, Asiatech Publishers. 2.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003, Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety, *Environment International*, vol. 28, p. 711-717.
- Waalewijn-Kool, P.L., Ortiz, M.D. Lofts. S., Van Gestel. C.A.M. 2013. The effect of pH on the toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Folsomia candida* in amended field Soil Environ. Toxicol. Chem., 32, pp. 2349–2355.
- Wang J, Xu D, Kawde A-N, Polsky R. 2001. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. Anal. Chem. 73:5576–5581.
- Wang, X. Ou, D. Yin, J. Wu, G. Wang, J. (2009). Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small

intestine of zinc oxide-supplemented piglets. *Amino acids* Volume 37, Issue 1, pp 209-218.

Weckberker, G., Cory, G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters*, 40, 257-264.

Weckx J, Clijsters H (1996) Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol Plantarum* 96:506–512

Wehner et Gehring., 1995. *Biologie et Physiologie Animales. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles : Orientation comparée et évolutive.* Deboeck Université.Thieme Verlag, p.286-287.

Wolf, H. D., Blust, R., & Backeljau, T. 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research*, 566, 249–262.

Wu B, Wang Y, Lee Y H, Horst A, Wang Z, Chen D R, Sureshkumar R, Tang Y J. 2010. Comparative eco-toxicities of nano-ZnO particles under aquatic and aerosol exposure modes. *Environmental Science & Technology*, 44(4): 1484–1489

Wu JF, Yu ZM, Song XX, Wang Y (2006) Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol Environ Saf* 65:230–236

Xiao X, Fan F-RF, Zhou J, Bard AJ. 2008. Current transients in single nanoparticle collision events. *J Am Chem Soc* 130:16669–16677

Xie Y, He Y, Irwin P L, Jin T, Shi X. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (7): 2325–2331

Yoon SJ, Kwak JI, Lee WM, Holden PA, An YJ (2014) Zn oxide nanoparticles delay soybean development: a standard soil microcosm study. *Ecotoxicol Environ Saf* 100:131–137

Zhang YS, Andersson T, Forlin L (1990) Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by β -naphthoflavone. Time-course studies. *Comp Biochem Physiol B* 95:247–253

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M., York, D., 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research* 9, 479–489.

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

Zhou QX, Kong FX, Zhu L (2004) Ecotoxicology. Science Press, Beijing [in Chinese]

Zhu X, Zhu L, Duan Z, Qi R, Li Y, Lang Y (2008) Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. J Environ Sci Health A 43:278–284