



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La
Recherche Scientifique



N° d'ordre: ***Université Martyr Hamma Lakhdar d'El Oued***

N° de série: ***Faculté Des Sciences de La Nature et de la Vie***

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire de fin d'étude

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

***Évaluation de la toxicité de l'acide
phosphorique sur *Paramecium* sp : Analyse
de quelques biomarqueurs de stress oxydatif
(GSH, l'activité GST et CAT)***

Présenté par:

- **Mansouri Rayan**
- **Kholladi Aya**

Devant le jury composé de :

Président : Dr.

M.C. . Université d'El Oued

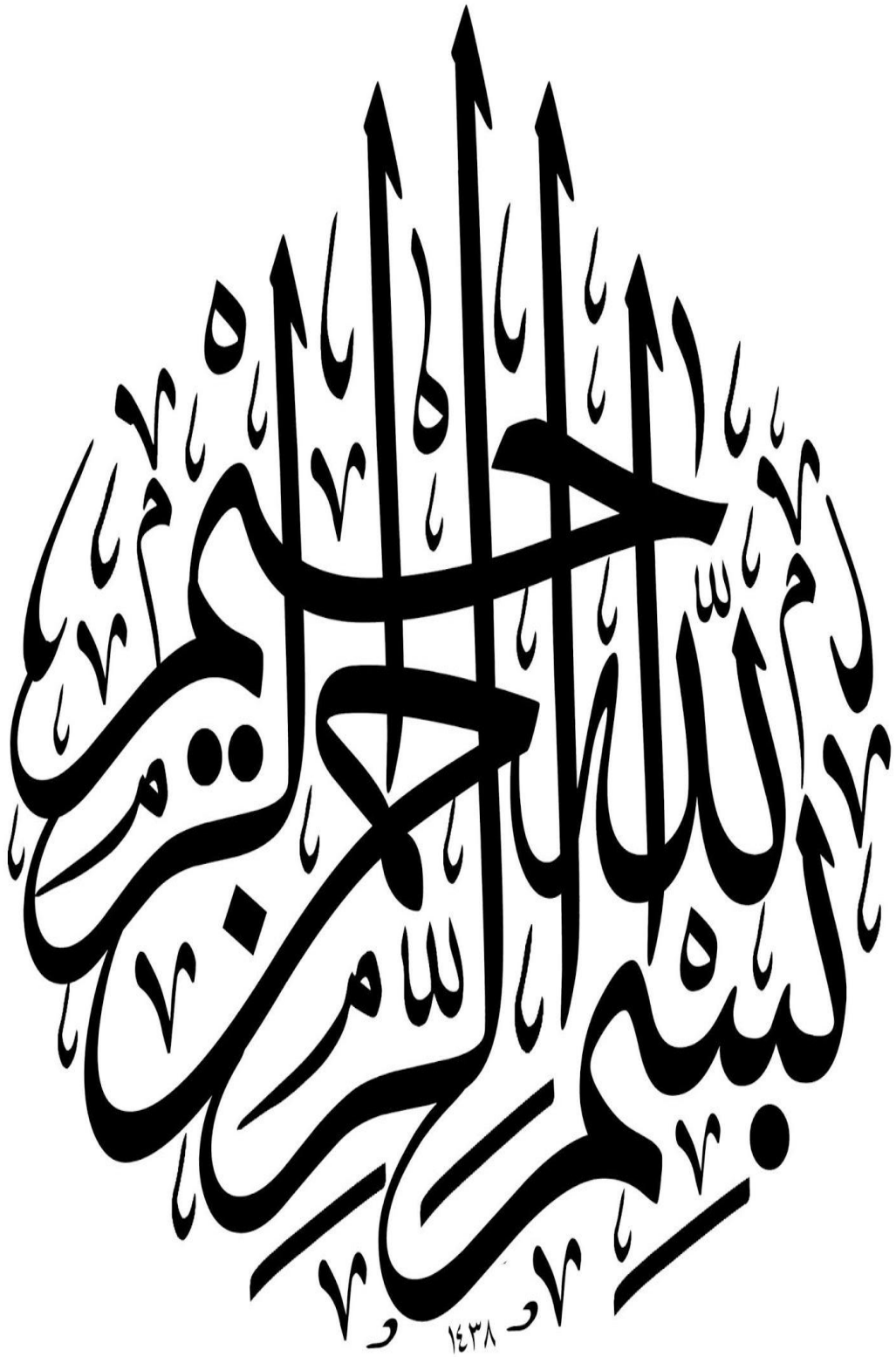
Examineur : Dr.

M.C. . Université d'El Oued

Rapporteur : Dr. OTMANI Hadjer

M.C.A. Université d'El Oued

Année universitaire : 2024-2025



Remerciements

Louange à Dieu, Seigneur des mondes. Nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir accordé la force, la patience et le succès dans l'aboutissement de ce travail.

Nous exprimons nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à notre encadrant, **Dr. Otmani Hadjer**, pour sa supervision rigoureuse, ses conseils avisés, son accompagnement constant et la confiance qu'elle nous a accordée tout au long de ce travail de recherche.

Nos remerciements s'adressent également aux **membres du jury**, pour avoir accepté de juger ce travail, pour le temps qu'ils y consacrent et pour leurs remarques constructives.

Nous tenons enfin à remercier l'ensemble des **enseignants** qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours, ainsi que toutes les personnes — de près ou de loin — ayant apporté leur aide ou leur soutien dans la réalisation de ce mémoire, en particulier le **Dr. Bouras Yassine**.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie Dieu de m'avoir offert cette opportunité exceptionnelle, la cérémonie de remise des diplômes dont j'ai toujours rêvé. Ce fut un parcours semé d'embûches, mais grâce à Dieu et au soutien de mes proches, j'ai réussi cet exploit. Aujourd'hui, en présentant mon diplôme, je dédie ce succès à ceux qui m'ont soutenue à chaque étape, par un mot gentil, un soutien ou une prière. Je leur adresse mes sincères félicitations et mon profond respect. Ce succès est le fruit de leurs efforts, de leur diligence et de leur soutien constant, et je leur en suis profondément reconnaissante.

À mes chers parents, que Dieu leur accorde longue vie. À ma famille et à celle de mon époux.

À mon compagnon, mon cœur et mon soutien de toujours, qui m'a aidée à obtenir mon master, mon mari, djermoun Alaa Elddin. Et à mon fils, la prunelle de mes yeux, Muhammad, que Dieu le place parmi les justes

À mes frères et sœurs, à toute ma famille

Vous êtes mon soutien, mon sourire et mon refuge Vous êtes la joie infinie dans mon âme et l'amour infini dans mon cœur

À tous ceux qui ont contribué à ma réussite, à tous ceux qui ont contribué à ma réussite, à tous ceux qui ont contribué à ma réussite, à tous ceux qui ont contribué à ma réussite. À mes chers amis, mes compagnons de voyage et mes partenaires de rêve vous êtes plus que de simples amis dans ma vie ; vous êtes l'esprit qui remplit les espaces de mon existence.

À ma famille élargie

à ceux dont je suis fière d'appartenir vous êtes les racines qui m'apportent stabilité et le soutien sur lequel je compte à chaque étape de mon chemin

À tous ceux qui ont contribué par un mot, une idée ou une prière, j'adresse mes sincères remerciements et mes meilleurs vœux. Chaque mot et chaque instant ont été une étincelle qui a illuminé mon chemin, et je suis reconnaissant à chacun d'entre vous pour chaque pas que vous avez fait. J'espère que mon travail sera bénéfique aux générations futures.

Mansouri Rayan

Dédicaces

À tous ceux qui ont tout donné et m'ont appris que le succès ne vient qu'avec la patience et la persévérance. À la lumière qui a illuminé mon chemin, et à la lampe qui ne s'éteint jamais dans mon cœur... À celui qui a donné la chose la plus précieuse qu'il avait, et de qui j'ai tiré ma force et mon respect de moi-même... À... mon père (Si Mekki Kholladi)

À celle qui a créé le paradis sous ses pieds et qui est restée éveillée toute la nuit pour mon réconfort et mes prières, au grand être humain dans les yeux duquel j'ai toujours souhaité voir la joie un jour comme celui-ci... à... ma mère (Faiza djabali)

À ma forte côte et au soutien de mes jours, à celle qui a renforcé mon bras et a été mon soutien et mes yeux... mes sœurs Douaa et Shahd...

À tous ceux qui m'ont aidé et soutenu sur ce chemin, à mes amis et à mon compagnon de remise de diplôme Ryan.

Je te dédie ce succès et le fruit de mon succès que j'ai toujours désiré. Aujourd'hui, par la grâce de Dieu Tout-Puissant, j'ai obtenu mon diplôme de l'Université de Wadi.

Dieu merci

Kholladi aya

Sommaire

Remerciements	III
Dédicaces	IV
Dédicaces	V
Sommaire	VI
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Résumé	XII
Introduction	I

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I. Concepts généraux sur l'acide phosphorique

1. Définition de l'acide phosphorique.....	3
2. Propriétés chimiques.....	3
3. Propriétés physiques.....	4
4. Production d'acide phosphorique.....	4
4.1. Par Voie thermique.....	4
4.2. Par voie humide.....	5
5. Utilisations.....	5
6. Toxicité de l'acide phosphorique.....	7
6.1 Toxicité humaine.....	7
6.2. Toxicité chez les animaux	8
6.2.1. Toxicité aigüe.....	8
6.2.2 Effets génotoxiques.....	9
6.2.3 Effets cancérogènes.....	9
7. Importance biologique.....	9
8. Consignes de sécurité.....	10

9. Autres acides "phosphoriques"	12
--	----

Chapitre II : *Paramecium sp*

1. Définition de la paramécie.....	14
2. Classification.....	15
3. Structure de la paramécie.....	15
4. Le milieu de vie des Paramécies.....	16
5. Nutrition des paramécies.....	17
6. Reproduction de la paramécie.....	17
7. La respiration chez la Paramécie.....	19

Chapitre III : Les biomarqueurs et le stress oxydative

1) Les biomarqueurs.....	21
1.1. Le glutathion GSH.....	21
1.2. Activité catalase CAT	22
1.3. Les glutathion transférases (GST).....	22
2) Le stress oxydatif.....	23

PARTIE Expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes.....	26
1.1. Matériels.....	26
1.1.1 Matériel animal.....	26
1.1.2 Matériel chimique.....	27
1.1.3 Réactifs et produits utilisés.....	28
2.2. Méthodes.....	33
2.2.1 Préparation de la culture de paramécie.....	33

2.2.2.Préparation de milieu de culture.....	33
2..2.3Protocole de traitement de l'acide phosphorique.....	36
2.2.4.Matériels de laboratoires.....	44
2..2.5Étude statistique.....	45

Chapitre II : Résultats et Discussion

2.1.Résultats.....	47
2.1.1.L'effet de l'acide phosphorique sur les protéines totales chez les Paramécies.....	47
2.1.2.Effets sur l'activité de la glutathion (GSH).....	48
2.1.3.Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST).....	49
2.1.4.Effets sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	50
.2.2Discussion.....	51
Conclusion	56
Références	60
Annex	69

Liste des figures

Titre	Page
Figure 01: Structure spatiale de l'acide phosphorique.	3
Figure 02 : <i>Paramecium sp</i> cilié au microscope optique.	14
Figure 03 : Structure de la paramécie.	16
Figure 04 : Le cycle sexuel de <i>Paramecium</i> la conjugaison.	18
Figure 05 : Phases végétative et sexuelle du cycle de vie du <i>Paramecium sp</i> .	18
Figure 06 : <i>Paramecium sp</i> au microscope.	27
Figure 07: Préparation de la culture de paramécie.	33
Figure 08 : Un schéma expliquant la préparer de milieu de culture.	35
Figure 09 : Le schéma expliqué le protocole de traitement des paramécies avec de l'acide phosphorique.	36
Figure 10 : Préparation réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC).	38
Figure 11 : Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion (GSH)	40
Figure 12 : Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion S-transférase (GST)	41
Figure 13 : Un schéma expliquant le protocole de dosage de l'activité catalase CAT	44
Figure 14 : L'effet de l'acide phosphorique sur les protéines totales chez les Paramécies.	47
Figure 15: Effets sur l'activité de la glutathion (GSH)	48
Figure 16 : Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST)	49
Figure 17 : Effets sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT) .	50

Liste des tableaux

Titre	Page
Tableau 01 : Propriétés physiques de l'acide phosphorique	4
Tableau 02 : Dose letale DL50 d'acide phosphorique	9

Liste des abréviations

CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
GST	Glutathion S-Transférase
GSH	Glutathion réduit
CAT	Catalase
SSA	Acide sulfosalicylique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)
NaCl	Chlorure de sodium
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
CBB ou BBC	Bleu brillant de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue)
PBS	Phosphate Buffered Saline (tampon salin de phosphate)
TCA	Acide trichloroacétique
TRC	Tube de Récolte du Contenu (contexte spécifique à l'expérience)
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), utilisé dans les dosages de thiol (méthode de Ellman)
DOCX	Format de fichier Microsoft Word XML
ANOVA	Analyse de la variance
UV-Vis	Spectrophotométrie Ultraviolette-Visible

Résumé

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué les effets toxiques de l'acide phosphorique (H_3PO_4) sur le protozoaire cilié *Paramecium sp.*, utilisé comme organisme modèle en écotoxicologie et en biochimie cellulaire. L'objectif principal était de caractériser la réponse cellulaire à un stress chimique acide en suivant l'expression de biomarqueurs représentatifs du stress oxydatif : le glutathion réduit (GSH), l'activité de la glutathion S-transférase (GST), et l'activité catalasique (CAT), en parallèle avec la quantification des protéines totales. Les paramécies ont été exposées à différentes concentrations d'acide phosphorique (200, 400, 600 μM) et un lot témoin pendant une durée de 3 heures. À l'issue de cette exposition, des dosages biochimiques ont été réalisés : la teneur en protéines totales a été mesurée par la méthode de Bradford, le GSH par la méthode de Weckberker et Cory, et les activités enzymatiques de la GST et de la CAT ont été évaluées par des protocoles spectrophotométriques standards.

Les résultats obtenus ont montré une évolution du taux de la principale molécule biologique (les protéines totales). Nous observons une diminution très hautement significative du taux des protéines totales dans les deux dernières concentrations (400, 600 μmol) avec un taux (8.151 et 2.517 $\mu\text{mol/mg}$ de PF) par rapport aux témoins 14.964 $\mu\text{g/mg}$ de PF chez les paramécies. D'après nos résultats nous constatons aussi une diminution en fonction des concentrations croissantes de manière non significatives du taux de GSH dans toutes les concentrations par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, l'activité de la glutathion S-transférase a augmenté avec l'augmentation des concentrations croissantes d'acide phosphorique, cette augmentations étaient non statistiquement significatives à toutes les concentrations par rapport au groupe témoin. En fin l'activité catalase a diminué avec l'augmentation des concentrations de solution d'acide phosphorique, avec une diminution très hautement significatives ($p < 0,001$) à toutes les concentrations (200, 400 et 600 μmol) étaient respectivement d'environ (167,744, 75,561 et 39,007 $\mu\text{mol/mg}$), par rapport au témoin (668,52 $\mu\text{mol/mg}$).

En fin, les résultats de cette étude démontrent que *Paramecium sp.* Répond de manière sensible et mesurable à l'exposition à l'acide phosphorique, et constitue ainsi un modèle biologique pertinent pour l'évaluation des effets toxiques de composés chimiques sur la cellule eucaryote. Ce modèle offre également un potentiel intéressant pour les essais de criblage toxicologique rapide dans un contexte environnemental ou biomédical.

Mots clés: Acide phosphorique, *Paramecium sp.*, Stress oxydatif, Protéines totales, GSH, Activité GST, Activité CAT.

Abstract

In this study, we evaluated the toxic effects of phosphoric acid (H_3PO_4) on the ciliated protozoan *Paramecium sp.*, used as a model organism in ecotoxicology and cellular biochemistry. The main objective was to characterize the cellular response to acidic chemical stress by monitoring the expression of biomarkers representative of oxidative stress: reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) activity, and catalase activity (CAT), in parallel with the quantification of total proteins. Paramecia were exposed to different concentrations of phosphoric acid for 3 hours. Following this exposure, biochemical assays were performed: total protein content was measured by the Bradford method, GSH by the Weckberker and Cory method, and GST and CAT enzymatic activities were assessed by standard spectrophotometric protocols.

The results obtained showed a change in the rate of the main biological molecule (total proteins). We observe a very highly significant decrease in the rate of total proteins in the last two concentrations (400, 600 μmol) with a (8.151 and 2.517 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ PF) compared to controls 14.964 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PF in the paramecies. Our results also show a decrease in non-significantly increasing concentrations of GSH at all concentrations relative to the control group. In addition, the activity of glutathione S-transferase increased with increasing concentrations of phosphoric acid; these increases were not statistically significant at all concentrations compared to control. At the end catalase activity decreased with increasing concentrations of phosphoric acid solution, with a very highly significant decrease ($p < 0.001$) at all concentrations (200, 400 and 600 u.mol) were respectively about (167,744, 75,561 and 39,007 $\mu\text{mol}/\text{mg}$), relative to the control (668,52 $\mu\text{mol}/\text{mg}$).

Finally, the results of this study show that *Paramecium sp.* Responds sensitively and measurably to exposure to phosphoric acid, thus providing a relevant biological model for the evaluation of toxic effects of chemical compounds on eukaryotic cells. This model also offers interesting potential for rapid toxicological screening tests in an environmental or biomedical context.

Keywords: phosphoric acid, *Paramecium sp.*, oxidative stress, Total proteins, GSH, GST, CAT.

الملخص:

في هذه الدراسة، قمنا بتقييم التأثيرات السامة لحمض الفوسفوريك (H_3PO_4) على الكائن الأولي الهديبي *Paramecium sp*، والذي يُستخدم ككائن نموذجي في علم السموم البيئية والكيمياء الحيوية الخلوية. كان الهدف الرئيسي هو توصيف الاستجابة الخلوية للإجهاد الكيميائي الحمضي من خلال مراقبة التعبير عن المؤشرات الحيوية التي تُمثل الإجهاد التأكسدي: الجلوتاثيون المختزل (GSH)، ونشاط الجلوتاثيون-S ترانسفيراز (GST)، ونشاط الكاتالاز (CAT)، بالتوازي مع تحديد كمية البروتينات الكلية. عُرضت الباراميسيا لتركيزات مختلفة من حمض الفوسفوريك لمدة 3 ساعات. بعد هذا التعرض، أُجريت فحوصات كيميائية حيوية: قُيس محتوى البروتين الكلي بطريقة برادفورد، و GSH بطريقة ويكبركر وكوري، وقُيَّم النشاط الأنزيمي لـ GST و CAT باستخدام بروتوكولات قياس الطيف الضوئي القياسية. أظهرت النتائج استجابة ملحوظة تعتمد على الجرعة.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها تغيراً في معدل الجزيء البيولوجي الرئيسي (إجمالي البروتينات)، نلاحظ انخفاضاً ملحوظاً جداً في معدل إجمالي البروتينات في التركيزين الأخيرين (400، 600 أومول) مع (8.151 و 2.517 ميكرومول/ملغ PF) مقارنة بالصواب 14.964 ميكروغرام/ملغ PF في المعلمات. وتظهر نتائجنا أيضاً انخفاضاً في تركيزات GSH المتزايدة بشكل غير ملحوظ في جميع التركيزات مقارنةً بمجموعة التحكم. بالإضافة إلى ذلك، زاد نشاط الجلوتاثيون-S ترانسفيراز مع زيادة تركيزات حمض الفوسفوريك؛ ولم تكن هذه الزيادات ذات دلالة إحصائية في جميع التركيزات مقارنة بالمجموعة الضابطة. وفي النهاية انخفض نشاط الكاتالاز مع زيادة تركيزات محلول حمض الفوسفوريك، مع انخفاض كبير للغاية ($p < 0.001$) في جميع التركيزات (200 و 400 و 600 ميكرومول) على التوالي حوالي (744، 167 و 561، 75 و 007، 39 ميكرومول/ملغ)، مقارنة بالمجموعة الضابطة (52، 668 ميكرومول/ملغ).

وأخيراً، أظهرت نتائج هذه الدراسة أن *Paramecium sp*. يستجيب بشكل حساس وقابل للقياس للتعرض لحمض الفوسفوريك، وبالتالي يوفر نموذجاً بيولوجياً مناسباً لتقييم التأثيرات السامة للمركبات.

الكلمات المفتاحية: حمض الفوسفوريك - *Paramecium sp* - الإجهاد الأكسدة - CAT - GST - GSH - pro

Introduction

Introduction

Tous les organismes vivants sont exposés à de nombreux changements internes et externes, et la capacité des organismes vivants à résister aux risques posés par ces composés constitue une adaptation physiologique nécessaire à la survie. Les micro-organismes mettent en œuvre diverses stratégies pour contrer les effets de ces composés. Par conséquent, les mécanismes de défense sont généralement généraux et non spécifiques à un produit chimique ou à un organisme particulier. Les mécanismes de défense contre les toxines de ces produits chimiques incluent l'interface de la méthode d'isolement pour développer des transformations catalytiques comme moyen de protection contre les espèces chimiques toxiques (**Sheehan, D et al., 2001**). L'étude de l'utilisation d'organismes non ciblés en toxicologie biologique nécessite des connaissances claires pour comprendre ce vaste domaine et les effets nocifs causés par produits chimiques sur différents organismes.

L'un des produits chimiques toxique et dangereux pour l'environnement en particulier pour les organismes vivants est l'acide phosphorique, considéré comme l'un des acides les plus importants sur le marché mondial et la deuxième plus grande production d'acide, il est utilisé dans des domaines variés tels que la médecine, l'agriculture et les produits alimentaires.

Les cellules disposent de défenses enzymatiques non enzymatique endogène pour lutter contre le stress oxydatif, Ce système de défense peut être classé en antioxydants de première, deuxième, troisième et même quatrième ligne Selon leur réaction à l'invasion générale des radicaux libres, les antioxydants de défense de première ligne, tels que l'activité catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GSH) et l'activité glutathion s-transférase (GST) jouent un rôle crucial et sont essentiels dans toute la stratégie de défense des antioxydants (**Akinloye et al., 2018**).

Actuellement, en toxicologie, l'utilisation de modèles alternatifs permet de comprendre les mécanismes des actions toxiques à différents niveaux de l'organisation cellulaire. Ainsi, la paramécie, en tant que modèle alternatif. (**Ibtissem.S et al., 2021**).

La paramécie est aujourd'hui considérée comme un organisme modèle contemporain qui a apporté des contributions particulières à la biologie cellulaire et moléculaire ainsi qu'au développement, se caractérisent par un cycle de vie court, une reproduction rapide, un comportement naturel dans leur environnement et un faible coût par rapport aux autres modèles. Les paramécies présentent des caractères physiologiques comparables à celle des cellules épithéliales des êtres humains, facilement accessibles à un plus grand nombre

Introduction

d'observateurs (**Arnaiz *et al.*, 2019**), des grandes cultures pour la biochimie et la protonique, une manipulation génétique et moléculaire, une visualisation des structures intracellulaires et pour la modélisation des tests de cytotoxicité (**Van Houten, 2023**). Toutes ces observations nous ont incité à mener notre expérimentation sur l'espèce *Paramecium sp*, qui se révèle être un excellent modèle d'étude de choix.

L'objectif de ce travail est axé sur l'effet de l'exposition des paramécies à l'acide phosphorique par le dosage des biomarqueurs de stress (GSH, Activité GST, et Activité CAT).

Partie Théorique

Chapitre I : Concepts généraux sur l'acide phosphorique

Chapitre II : *Paramecium sp*

Chapitre I :

**Concepts généraux sur l'acide
phosphorique**

Chapitre I. Concepts généraux sur l'acide phosphorique

1. Définition de l'acide phosphorique

L'acide phosphorique est le principal acide oxygéné du phosphore et l'un des acides inorganiques les plus importants. C'est un acide tribasique qui réagit comme un acide assez fort par rapport à la première déprotonation. Ses sels et esters sont appelés phosphates. L'acide phosphorique est déclaré comme additif alimentaire sous le numéro **E 338**. Il est également utilisé en agriculture. Cet acide chimique (ou plutôt un composé ternaire appartenant à la classe des acides oxygénés) a pour formule **H₃PO₄** et se trouve dans les laboratoires de chimie scientifique sous sa forme diluée à 85% (Greenwood, et *al.*, 1997).

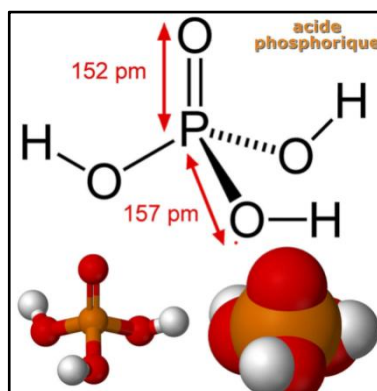
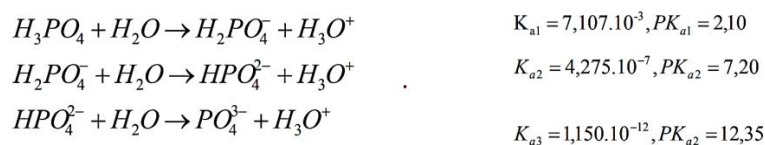


Figure 01: Structure spatiale de l'acide phosphorique H₃PO₄ (Christensen, et *al.*, 1955).

2. Propriétés chimiques

L'acide phosphorique est une substance minérale. La première fonction est celle d'un acide fort, la deuxième celle d'un acide faible et la troisième celle d'un acide très faible. Les trois bases cultivées sont le dihydrogénophosphate (H₂PO₄⁻), le méthylhydrogénophosphate (HPO₄²⁻) et le fortophosphate (PO₄³⁻) (Diallo, 2013).



L'acide phosphorique réagit énergiquement avec les bases. Il réagit également violemment avec les nitrates, les chlorates et le carbonate de calcium, provoquant un incendie et une explosion Sous l'action de la chaleur.

3. Propriétés physiques

L'acide phosphorique se présente à l'état pur et anhydre comme une substance cristalline incolore et hygroscopique. À concentration égale, les propriétés physiques de cet acide varient en fonction des impuretés résiduelles présentes dans celui-ci, qui dépendent du procédé de fabrication et de l'origine du phosphate naturel utilisé. Ainsi, en comparaison, l'acide phosphorique produit par voie humide (acide vert) a une densité et une viscosité légèrement plus élevées, ainsi qu'un point d'ébullition et un point de cristallisation plus bas (Orenga, et *al.*, 1985).

À température ambiante, l'acide phosphorique pur anhydre est un solide cristallisé incolore, très déliquescent. Il est très soluble dans l'eau et l'éthanol.

L'acide phosphorique étant extrêmement hygroscopique, il est généralement commercialisé sous forme de solutions aqueuses de diverses concentrations dont les

plus courantes sont 75, 80 et 85 % en poids de H_3PO_4 . Une solution à 85 % se présente sous forme d'un liquide visqueux incolore (Orenga, et *al.*, 1985).

Tableau 01 : Propriétés physiques de l'acide phosphorique (NLM, 2009)

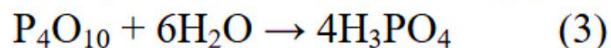
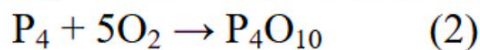
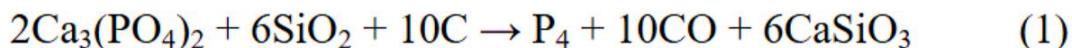
Nom Substance	Détails
Acide phosphorique	Formule H_3PO_4
	N° CAS 7664-38-2
	Etat Physique Solide
	Masse molaire 98,00
	Point de fusion 42,35 °C (pur) 21 °C (à 85%) -17,5 °C (à 75 %)
	Point d'ébullition 213 °C (pur) 158 °C (à 85 %) 135 °C (à 75 %)
	Densité 1,874 (pur) 1,685 (à 85 %) 1,574 (à 75 %)
	Pression de vapeur 4 Pa à 20 °C (pur) 200 Pa à 20 °C (à 85%) 75 Pa à 20 °C (à 75 %)

4. Production d'acide phosphorique

4.1. Par Voie thermique

L'acide phosphorique destiné à la fabrication de phosphates alimentaires ou techniques peut être élaboré par voie thermique par réduction de phosphate naturel, en présence de coke ou de silice, au four électrique à 2000°C. Le phosphore obtenu est oxydé en P_2O_5 , qui est ensuite hydraté pour obtenir de l'acide phosphorique (Habashi et *al.*, 1985).

❖ Réaction principale

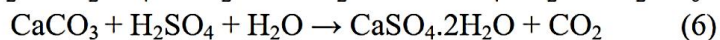
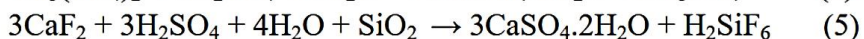
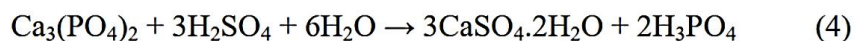


4.2. Par voie humide

L'acide phosphorique est produit par l'attaque d'un acide fort, généralement l'acide sulfurique. L'acide nitrique et le chlorhydrate peuvent être utilisés sur les phosphates naturels.

Ce procédé consiste à attaquer le phosphate naturel (souvent l'apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) (Habashi et *al.*, 1985).

❖ Réaction principale



5. Utilisations

L'acide n'est pas très utile en laboratoire du fait de sa résistance à l'oxydation, à la réduction et à l'évaporation. Entre autres l'acide phosphorique est utilisé comme ingrédient dans les boissons non alcoolisées; comme catalyseur, dans les métaux inoxydables et pour phosphates qui sont utilisés comme adoucisseurs d'eau. Largement utilisé dans les laboratoires de chimie dans la préparation de solutions tampons ou de régulateurs de pH.

La majeure partie de l'acide phosphorique produit est utilisée dans la production d'engrais phosphatés ; C'est également une matière première pour la production de tripolyphosphate de sodium pour la production de détergents ; La neutralisation de l'acide phosphorique avec de l'ammoniac produit du phosphate de monoammonium (MAP), un engrais complexe hautement concentré qui contient de l'azote et du phosphore utilisables. Également utilisé pour mélanger de l'urée, de la poix, du bitume, de la pierre avec du sable et de l'huile pour créer de l'asphalte pour le revêtement des sols des routes et pour réparer les ruptures dans le sol simplement en ajoutant de l'eau pour activer, faire fondre l'asphalte et compacter avec un rouleau compresseur ;

Chapitre I. Concepts généraux sur l'acide phosphorique

Dans l'alimentation : Il est utilisé comme additif dans l'industrie alimentaire, notamment dans les boissons gazeuses (le cola notamment) comme régulateur d'acidité. Également connu sous le nom de code **UE E 338**, L'additif, en fait, étant un composé chimique produit en masse, est disponible à des prix très bas et en grandes quantités. C'est pourquoi il se substitue souvent à l'acide citrique produit par le citron et le citron vert;

En Médecine : L'acide phosphorique est utilisé en dentisterie comme solution pour nettoyer et rendre rugueuse la surface des dents et comme élément de conditionnement de la surface de l'émail dentaire, car en déminéralisant la surface de l'émail dentaire, il crée une micro-rétention dans sa structure qui facilite l'adhésion des matériaux de restauration dentaire, il est également utilisé dans de nombreux dentifrices ou traitements d'éclaircissement des dents. Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé pour produire certains désinfectants et des médicaments à base de phosphate. C'est également un ingrédient des médicaments anti-nauséux (**Memento degremont., 2025**)

Comme antirouille : L'acide phosphorique tel quel, peut être utilisé pour éliminer la rouille (laissant le métal vierge). Les produits contenant de l'acide phosphorique peuvent être utilisés comme "convertisseur de rouille", par application directe sur la rouille, des objets ou des surfaces métalliques. L'acide phosphorique convertit l'oxyde de fer (III) (rouille) en phosphate de fer (III), FePO_4 , de couleur noire. Le "convertisseur de rouille" est souvent un liquide verdâtre adapté à l'immersion des matériaux à traiter, mais il est plus fréquemment formulé sous forme de gel. Après le traitement, le phosphate ferrique (noir) peut être rayé, laissant une surface claire. Plusieurs applications d'acide phosphorique peuvent être nécessaires pour éliminer toute rouille. Le noir de phosphate ferrique peut être laissé, où il peut prolonger la durée de l'effet antirouille.

Autres utilisations, dans l'industrie textile et papetière, traitement de surface métallique tel que décapage, polissage et protection contre la rouille, traitement des eaux usées Il est également utilisé dans les industries cosmétiques.

Il est vendu sous forme de solution aqueuse concentrée jusqu'à 80 %, car il est difficile de l'obtenir pur. Il se solubilise assez bien également dans l'éthanol (**Memento degremont., 2025**).

6. Toxicité de l'acide phosphorique

L'acide phosphorique est corrosif pour les yeux, la peau et les voies respiratoires et corrosif par ingestion. Les risques pour l'homme et l'environnement sont donc surtout dus au caractère corrosif de l'acide phosphorique en cas de contact. Les solutions concentrées d'acide phosphorique sont responsables de lésions sévères des tissus. Les solutions diluées ne sont que modérément irritantes, un contact répété ou prolongé avec la peau peut causer une dermatite. Lors d'une combustion, il se forme des fumées toxiques comprenant des oxydes phosphoreux. La substance se décompose au contact d'alcools, d'aldéhydes, de cyanures, de cétones, de phénols, d'esters, de sulfures, de substances organiques halogénées, produisant des fumées toxiques (Bertheleme., 2008).

Risque d'incendie et d'explosion l'acide phosphorique est non inflammable et non explosible. Par contre, son action sur les métaux s'accompagne d'un dégagement d'hydrogène qui est lui très inflammable et donne avec l'oxygène de l'air un mélange explosif entre 4 et 75 % en volume dans l'air. Il peut également donner des mélanges inflammables pouvant causer des explosions avec les nitrates, les chlorates et le carbure de calcium (Bertheleme., 2008).

6.1. Toxicité humaine

L'acide phosphorique est un acide inorganique fort, et ses aérosols sont caustiques et peuvent provoquer des brûlures chimiques de la peau, des yeux et des muqueuses respiratoires et digestives, il est classé dans le groupe 1 des substances cancérogènes pour l'homme.

- la projection à des solutions d'acide phosphorique cause des contaminations cutanée ou oculaire.
- L'ingestion provoque des brûlures locales chimiques où la gravité est en fonction de la concentration de la solution, de l'importance de la contamination et de la durée du contact.
- troubles gastro-intestinaux : Douleur dans la bouche, le pharynx et les dents....
- on peut observer une miction chaude et douloureuse.
- une hyperémie conjonctivale et un blépharospasme.
- Des symptômes séquentiels sont possibles : conjonctivite, opacités cornéennes, cataracte.
- d'irritation respiratoire : rhinorrhée, gonflement, brûlures nasales et pharyngées, toux, dyspnée et douleurs thoraciques.

-de cas hyperphosphatémie et d'une hypocalcémie associée à une acidose métabolique suite à l'ingestion d'une quantité importante d'une solution contenant 20% d'acide phosphorique. Des complications peuvent survenir à court terme: perforation œsophagienne ou gastrique, hémorragie digestive, détresse respiratoire, coagulation intra-vasculaire disséminée. L'évolution à long terme est dominée par le risque de constitution de stérnes digestives, en particulier œsophagiennes, il existe également un risque de cancérisation des lésions cicatricielles du tractus.

Chez un enfant en croissance, la quantité absorbée n'est pas totalement excessive, la concentration plasmatique de phosphates est plus élevée que chez un adulte (NLM,2009) .

6.2. Toxicité chez les animaux

L'acide phosphorique, au contact de l'humidité du tractus gastro-intestinal, est transformé en ions phosphate. L'absorption et en quantités limitées, la réabsorption des ions phosphate dans le tractus gastro-intestinal sont influencées par différents facteurs. Le transport de la lumière intestinale vers le sang est un phénomène actif qui est stimulé par la vitamine D chez l'adulte, en moyenne, deux tiers de la quantité ingérée sont absorbés et excrétés dans l'urine (NLM,2009) .

6.2.1. Toxicité aigüe

Les fumées de combustion d'un mélange contenant 95% de phosphore rouge renferment une forte concentration en acide phosphorique et une petite quantité d'acide diphosphorique. (NLM,2009).

A. Exposition des souris

Une exposition des rats pendant 1 heure à ces fumées induit une légère déformation de l'épiglotte (à 3150 mg/m³).

un œdème du larynx (à 5400 mg/m³) ,et des lésions trachéales et laryngées (à 8500 mg/m³). Une exposition pendant 4 heures à 1500 mg/m³ provoque un œdème laryngé sévère et quelques points hémorragiques (NLM,2009) .

B. Exposition des lapins

Des lapins exposés pendant 30 minutes à ces fumées présentent une nécrose épithéliale des alvéoles et une inflammation du larynx.

Chapitre I. Concepts généraux sur l'acide phosphorique

Sur la peau du lapin, il provoque une irritation à mesure que la concentration augmente à partir d'une concentration de 75% pendant 4 heures; à 80%, l'irritation est sévère, et à 85% il est corrosif.

6.2.2. Effets génotoxiques

In vivo, un résultat négatif est obtenu, chez la drosophile, dans le test de recombinaison génique. Un test de létalité dominante, pratiqué chez le rat (0-589-1161 mg/m³, 15 mn/j, 5j/sem, 10 semaines), montre une augmentation du nombre de femelles présentant des résorptions après accouplement avec des mâles exposés à la plus faible concentration uniquement.

Le petit nombre de tests disponibles ne permet pas de conclure sur l'effet génotoxique de l'acide phosphorique.

6.2.3. Effets cancérogènes

Il n'y a pas de test d'effet cancérogène de l'acide phosphorique rapporté dans la littérature.

Tableau 02 : Dose letale DL50 d'acide phosphorique (NLM, 2009).

Voie	Espèce	DL50/CL50
Orale	Rat	1530 mg/kg
Cutanée	Lapin	2740 mg/kg
Inhalatoire	Rat	213 mg/m ³ /4 h
	Lapin	1689 mg/m ³ /1 h

7. Importance biologique

Les esters d'acide phosphorique et les polyphosphates jouent un rôle central dans le métabolisme, en particulier en tant que porteurs d'énergie (composés dérivant de sucres phosphorylés) et de groupe (voir par exemple ATP ou GTP). Entre autres, ils font partie intégrante de l'ADN, de l'ARN et de nombreuses coenzymes.

En médecine, l'enrichissement des aliments en acide phosphorique (**E 338**) est contre-indiqué dans certains tableaux cliniques. Des maladies telles que l'insuffisance rénale chronique (également avec un traitement de dialyse), l'ostéoporose et la lithiase urinaire (calculs de phosphate de calcium) nécessitent un régime pauvre en phosphate (hyperphosphatémie).

En raison de sa circulation dans l'environnement et dans l'organisme, la teneur en phosphate ne change pas de manière significative. Lorsque l'acide phosphorique est dissous dans l'eau à pH neutre, la solution contient principalement l'anion dihydrogénophosphate et le dianion hydrogénophosphate. Cependant, lorsqu'il est incorporé dans diverses fonctions biologiques, il se présente généralement sous la forme de l'ion phosphate lui-même, sans atomes d'hydrogène et sans trois charges négatives. Avec les ions calcium, il forme de l'hydroxyapatite dans le corps, à partir des os et dents existent. La partie inorganique des os est constituée d'environ 40 % de calcium et de près de 60 % de phosphate.

L'acide de l'ADN est en fait de l'acide phosphorique, mais il a remplacé deux protons par des atomes de carbone provenant de deux sucres différents, la partie ribose. C'est le squelette de l'ADN qui maintient la longue chaîne avec des liaisons covalentes, mais ne transmet aucune information génétique (**Kosmala, M., et al., 1999**).

L'adénosine triphosphate se compose d'adénine, de ribose et de trois phosphates. Cette molécule est la monnaie énergétique universelle du monde biologique. Lorsqu'il réagit avec l'eau et perd un ion phosphate (hydrolyse), de l'énergie est libérée. Grâce à des mécanismes complexes dans nos enzymes, cette énergie peut être utilisée pour conduire d'innombrables processus chez tous les êtres vivants. La plupart des graisses, des sucres et des glucides sont utilisés pour fabriquer de l'adénosine triphosphate s'ils ne sont pas stockés sous une forme ou une autre (**Kosmala, M., et al., 1999**).

L'acide phosphorique et les phosphates solubles peuvent être détectés par précipitation avec de l'heptamolybdate d'ammonium en phosphate de molybdate d'ammonium jaune, ou par précipitation avec des ions magnésium en solution ammoniacale en MgNH_4PO_4 (**Kosmala, M., et al., 1999**)

8. Consignes de sécurité

- Porter un équipement de protection (gants en néoprène, lunettes de protection et combinaison de protection en cas de transfert de grandes quantités). Éloignez les personnes non protégées. En cas de vapeurs / poussières / aérosols adopter une protection respiratoire.
- Empêcher l'infiltration dans les égouts / eaux de surface / eaux souterraines. Fournir des sols résistants aux solutions acides. Fournir un lavabo au sol sans drain. Gardez les contenants bien fermés.

Chapitre I. Concepts généraux sur l'acide phosphorique

- Évitez la formation d'aérosols. Tenir à l'écart de la nourriture, des boissons et du fourrage. Retirer immédiatement les vêtements contaminés. Lavez-vous les mains avant la pause ou après le travail. Éviter le contact avec les yeux et la peau.
- Corrosif pour la peau et les muqueuses. Fortement corrosif pour les yeux. Aucun effet sensibilisant connu. Sur la base de la méthode de calcul de la directive communautaire générale sur la classification des préparations dans sa dernière version valide, le produit provoque une corrosion sévère de la cavité buccale et du pharynx avec risque de perforation de l'oesophage et de l'estomac.

Retirer immédiatement les vêtements contaminés par le produit. Si le sujet est inconscient, maintenez-le dans une position stable sur le côté pendant le transport :

- Contact avec la peau : laver immédiatement à l'eau et au savon et rincer abondamment.
- Contact avec les yeux : laver à l'eau courante pendant plusieurs minutes en gardant les paupières grandes ouvertes et consulter un médecin.
- ingestion : ne pas faire vomir, appeler immédiatement un médecin. Boire beaucoup d'eau et se tenir dans un endroit bien ventilé.

L'acide phosphorique n'est pas inflammable, les moyens d'extinction appropriés sont : CO₂, poudre ou eau pulvérisée. Éteignez les grands incendies avec de l'eau pulvérisée ou de la mousse résistant à l'alcool.

Ne jetez pas le produit avec les ordures ménagères et ne le laissez pas pénétrer dans les égouts. Recyclez si possible sinon contactez une entreprise autorisée pour l'élimination des déchets industriels. Laver les emballages non nettoyés avec de l'eau, à envoyer pour purification et élimination. Élimination conformément aux dispositions administratives.

Il peut provoquer des changements de pH et endommager la vie aquatique. Ne laissez pas le produit non dilué ou de grandes quantités de celui-ci atteindre les eaux souterraines, les cours d'eau ou les égouts. Ne pas mettre le produit non dilué ou neutralisé dans les eaux usées et dans les canaux de collecte (Giesy, J. P, et al., 1989) .

9. Autres acides "phosphoriques"

Après chauffage de l'**acide orthophosphorique**, la condensation des molécules peut être induite par élimination de l'eau. En chauffant à 213 °C, une molécule d'eau est extraite de deux molécules d'acide phosphorique; le résultat est l'**acide pyrophosphorique** ($\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$) : $2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Dziezak, J. D et *al.*,2016).

En chauffant à nouveau, en maintenant l'acide à ébullition et en l'amenant à 316 °C, la déshydratation maximale de l'acide pouvant être obtenue par voie thermique a lieu et le produit résultant est un solide vitreux appelé **acide métaphosphorique** (HPO_3), qui existe sous forme trimère, c'est-à-dire acide cyclotrimétaphosphorique (HPO_3)₃ : $3\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow 3\text{H}_2\text{O} + 2(\text{HPO}_3)_3$.

Il se solidifie en dessous de 316 °C pour former une masse solide de consistance vitreuse qui bout seulement à 600 °C.

L'**acide métaphosphorique** est une version anhydre de l'acide orthophosphorique et est parfois utilisé comme absorbant pour l'eau ou l'humidité. Cependant, la déshydratation est très difficile et s'accompagne souvent d'éléments fortement desséchants (pas seulement par chauffage). Ce procédé produit également de l'anhydride phosphorique (P_2O_5 ou P_4O_{10}), solide et habituellement utilisé comme dessiccateur (Dziezak, J. D et *al.*,2016).

Chapitre II :

Paramecium sp

Chapitre II : *Paramecium sp*

1. Définition de la paramécie

La paramécie (*Parameciumsp*) est un genre bien connu de protozoaire cilié, et est couramment étudié comme représentant type de ce groupe (en particulier *P. caudatum*). Elle est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé au microscope. La taille de la cellule varie de 100 à 300 um de long suivant les espèces. La paramécie utilise des cils pour se déplacer et se nourrir, Elle se nourrit essentiellement de bactéries par phagocytose. La paramécie vit isolée en eau douce, elle fait partie des infusoires des anciens auteurs elle apparaît en grand nombre dans les infusions de végétaux, rendant sa culture et son étude aisée.

Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique. Comme la plupart des ciliés, la paramécie présente la particularité d'avoir un appareil nucléaire en deux parties un (ou plusieurs) petit noyau, le micronucleus, et un gros noyau, le *macronucleus*. Le premier assure les fonctions sexuelles indispensables pour engendrer des variations génétiques alors que le second dirige les fonctions trophiques quotidiennes et la multiplication asexuée (**document d'université.,2020**).



Figure 02 : *Paramecium sp* cilié au microscope optique(Nehring, et *al.*,2008).

2. Classification

Selon (Cudmore,et *al.*, 1977). les Paramécie appartiennent à :

Domain: Eucaryote

Royaume : Protistes

Ramification : Ciliés

Classe : Oligomérans

Ordre : Peniculida

Famille : Paramecidae

Genre : *Paramecium*

Espèces courantes de paramécies :

Paramecium caudatum

Paramecium aurelia (Beaumont ,et *al.*,1998) .

3. Structure de la paramécie

Paramecium sp est un protozoaire unicellulaire, de forme allongée, ovale ou en pantoufle.

Taille : entre 100 et 300 micromètres selon les espèces.

Cils vibratoires: Toute la surface de la Paramécie est couverte de cils. Ces cils permettent à la cellule de se déplacer rapidement dans l'eau et de diriger la nourriture vers l'oral.

Vacuole contractile: cavité de la paramécie capable de se contracter.

Vacuole digestive: cavité de la paramécie responsable de la digestion .

Petit noyau: un des organites centraux moins importants de la paramécie .

Gouttière orale: canal de la paramécie responsable d'aspirer les nutriments .

Pharynx: cavité du pharynx.

Ectoplasme: partie superficielle vitreuse de la paramécie .

Endoplasme: partie centrale de paramécie .

Gros noyau: organite central le plus important de la paramécie .

Canal de la vacuole contractile: ramification de la cavité contractile de la paramécie .

Trichocyste: racine du cil vibratile de la paramécie (Sbartai I.,2023).

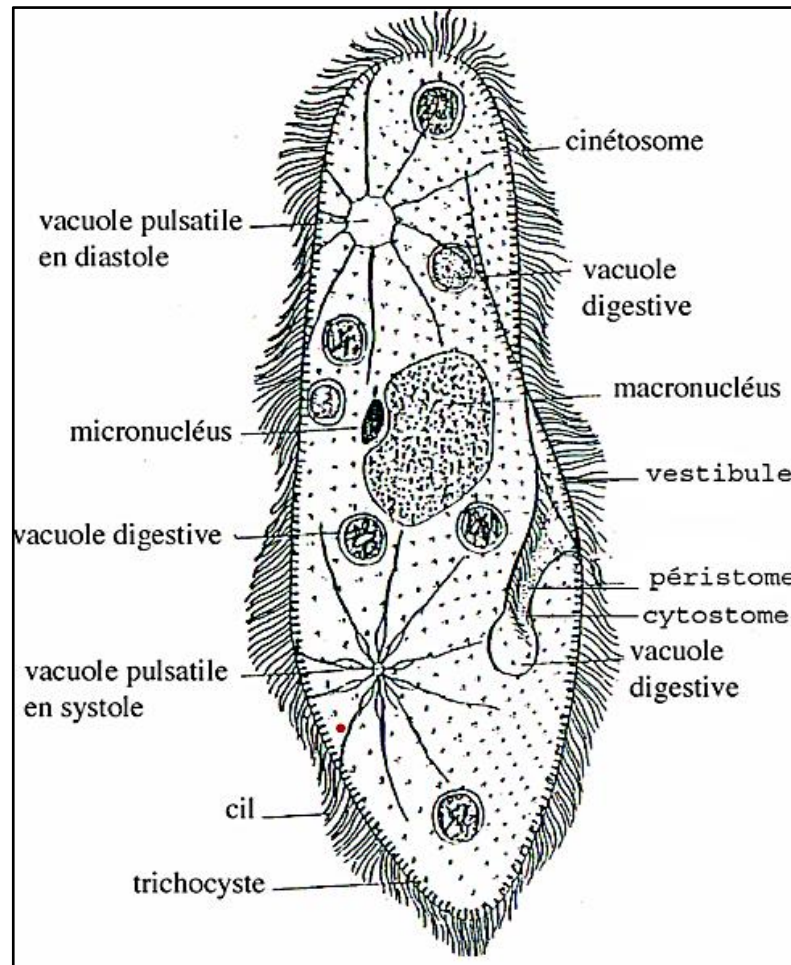


Figure 03 : Structure de la paramécie (Serge.,2021).

4. Le milieu de vie des Paramécies

Il vit dans des environnements aquatiques dans des zones d'eau douce telles que des étangs, des piscines et des ruisseaux. Il a tendance à se propager temporairement dans les zones qui contiennent beaucoup de feuilles mortes. Il ne vit pas en colonie mais préfère une vie solitaire. Cependant, lorsque leur habitat est suffisamment adapté (leur fournissant beaucoup de nutriments), ils sont capables de produire ce que l'on appelle des biofilms. Un biofilm est une communauté/assemblage multicellulaire (de type colonie) composé de divers types d'organismes tels que des bactéries, des champignons microscopiques, des microalgues ou d'autres protozoaires (Serge.,2021).

5. Nutrition des paramécies

La paramécie se nourrit principalement de micro-organismes tels que des bactéries, des levures et des microalgues.

5.1. Il utilise ces cils pour créer un flux d'eau et déplacer la nourriture vers le cytoplasme (cavité buccale primaire).

5.2. Les éléments nutritifs traversent le cytopharynx, sont phagocytés au niveau du péristome

5.3. Absorbés dans les phagosomes (vacuoles alimentaires).

5.4. Ils seront détruits grâce aux lysosomes présents dans ces phagosomes.

5.5. Lorsque la digestion est terminée, les nutriments sont dissous dans l'urine et expulsés dans l'endoplasme. Les gouttes sont transportées jusqu'au cytoplasme de la paramécie pour être éjectées (Serge., 2021).

6. Reproduction de la paramécie

La paramécie (genre *Paramecium sp*) est un protozoaire cilié vivant principalement dans les milieux aquatiques.

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

6.1. La division

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

6.2. La conjugaison

Il s'agit d'une méthode plus compliquée. Il s'agit de deux cellules se réunissant pour échanger des matières nucléaires. Les deux cellules se séparent alors et continuent de se reproduire par simple division (Samworth et Morgan., 2000).

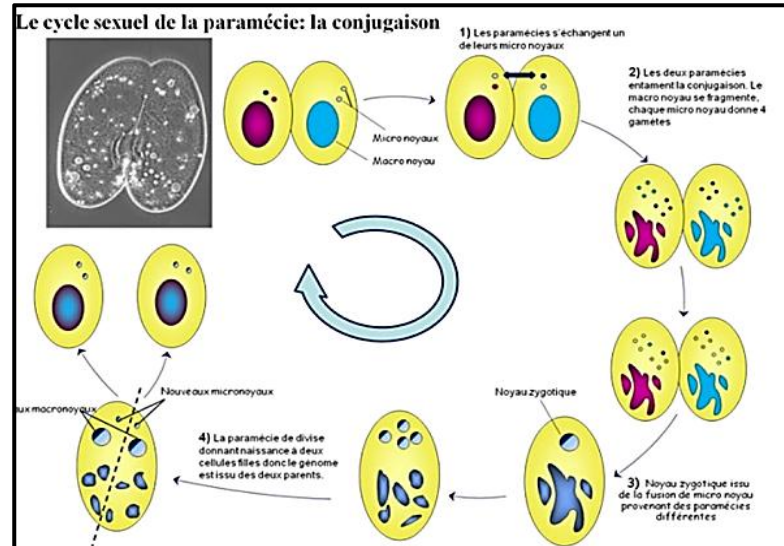


Figure 04 : Le cycle sexuel de *Paramecium* la conjugaison (Bétermier., 2010).

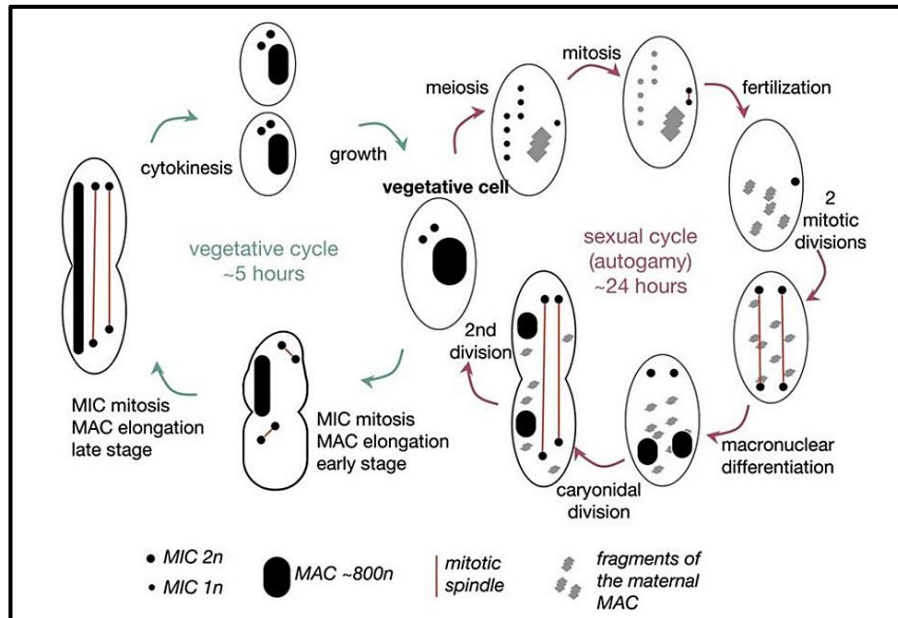


Figure 05 : Phases végétative et sexuelle du cycle de vie du *Paramecium sp*. Le cycle cellulaire

Végétatif (flèches vertes) se compose de la division mitotique des deux micronoyaux (MIC) et de la division non mitotique du macronoyau (MAC). Les événements de réorganisation nucléaire pendant l'autogamie (flèches violettes) comprennent la méiose des deux MIC diploides, la dégénérescence de sept des huit produits haploides avec une division supplémentaire du seul survivant, la caryogamie deux divisions mitotiques du noyau zygotique diploide et le développement de deux nouveaux MAC. Ces derniers se séparent

sans division vers les deux cellules filles lors de la première division cellulaire (**Beisson,J et al., 2010**).

7. La respiration chez la Paramécie

Est un processus aérobie se produisant au niveau cellulaire. Elle ne possède pas d'organes respiratoires spécialisés ; les échanges gazeux (absorption d'oxygène et rejet du dioxyde de carbone) se font par diffusion simple à travers la membrane plasmique.

- ✓ Oxygène Dissous dans l'eau environnante, il diffuse à travers la membrane plasmique vers le cytoplasme, où il est utilisé pour produire de l'ATP via la respiration cellulaire (dans les mitochondries).
- ✓ CO₂Produit comme déchet métabolique, il est expulsé par diffusion à travers la membrane vers l'extérieur(**Alberts, B. et al. 2015**).

Chapitre III

Les biomarqueurs et le stress oxydative

Chapitre III : Les biomarqueurs et le stress oxydative

1) Les biomarqueurs

Un biomarqueur conçu avec un caractère objectivement mesuré (c'est-à-dire avec précision et reproductibilité suffisante), Les biomarqueurs correspondent à des paramètres biologiques (génétique, protéines, métabolisme).

Il est un indicateur Processus physiologiques et Processus pathologique et Diagnostic (caractérisation d'une maladie chez un individu) et Action du médicament (dosage plasmatique du médicament) : la réponse à un traitement médical, la réponse après traitement ou la toxicité d'une molécule.

Un biomarqueur peut être défini comme un caractère mesuré et valorisé de manière objective, servant d'indicateur de processus biologiques normaux, ou de réponses pharmacologiques aux interventions thérapeutiques ou de processus pathogene(**Groupe B.D.W. 2001**).

1.1. Le glutathion GSH

Est un composant endogène du métabolisme cellulaire. C'est un tripeptide composé d' α -glutamine, de cystéine et de glycine. Les précurseurs du glutathion comprennent la cystéine, la N-acétylcystéine, l'ester monoéthylique de glutathion et l'oxothiazolidine 4-carboxylate (OTC). De ce fait, il n'est pas un nutriment essentiel, car il peut être synthétisé à partir de ces acides aminés. Le glutathion est le thiol non protéique de faible poids moléculaire le plus abondant dans la plupart des cellules. Le terme thiol désigne les composés contenant du soufre, et les acides aminés soufrés (SAAS) sont la méthionine, la cystéine, la cystine (forme disulfure de la cystéine), l'homocystéine, l'homocystine et la taurine. Le GSH ne présente pas la toxicité associée à la cystéine, ce qui lui permet d'être un bon « tampon redox » cellulaire.

À l'intérieur des cellules, le GSH existe à l'état réduit (GSH), représentant environ 90 % du total, et à l'état oxydé (disulfure de glutathion, GSSG), composé de deux glutathions réduits liés aux atomes de soufre. Le GSH peut être oxydé directement par des oxydants, tels que le radical hydroxyle (HO) ou le peroxynitrite. (ONOO~).

Le GSH exporté par le foie est une source d'approvisionnement pour d'autres organes, comme les reins, par exemple. Autrement dit, le GSH (et le GSSG) peuvent également être présents à l'extérieur des cellules, par exemple dans la fine couche de liquide recouvrant les espaces

Chapitre III : Les biomarqueurs et le stress oxydative

aériens, où se produisent les échanges gazeux, sécrétée par les cellules épithéliales. De plus, les macrophages constituent une source supplémentaire d'espèces réactives dans l'épithélium pulmonaire, et il est utile d'avoir des niveaux élevés de GSH également dans les poumons. Le GSH joue également un rôle important dans les cellules épithéliales intestinales qui sont en contact avec l'extérieur, et sa fonction principale est ici la détoxification des agents externes nocifs pour prévenir les dommages à l'organisme(Basil, R.,2023).

1.2. Activité catalase CAT

La catalase étant l'enzyme antioxydante la plus abondante dans les peroxysomes de mammifères, elle constitue une cible intéressante pour moduler le système de stress antioxydant de l'organe dans les cellules intacte (Marcus,N.,2011).

Présente dans tous les organismes aérobies. Elle est connue pour catalyser l'eau en eau et en oxygène de manière économe en énergie dans les cellules exposées au stress environnemental (Amara,B.,2020)

Donc il joue un rôle crucial dans la détoxification des ROS lors du stress (Sharma.et al., 2012).

Catalase-Fe (III) + H₂O₂ composé 1

Composé I+H₂O₂ Catalase-Fe (III) + 2H₂O+O₂

Cet enzyme se trouve dans tous les organismes vivants, des procaryotes unicellulaires aux eucaryotes multicellulaires (Lenton., 2003).

1.3. Les glutathion transférases (GST)

Les glutathion transférases (GST), également appelées glutathion S-transférases, appartiennent à la famille des supergènes des enzymes de détoxification de phase II, omniprésentes dans presque toutes les formes de vie cellulaire. Sur la base de leur distribution subcellulaire, les GST sont classées en trois grandes familles de protéines : cytosoliques, mitochondriales ou kappa et microsomaux.

Les GST fonctionnent dans la protection cellulaire en catalysant la conjugaison du GSH avec de nombreux intermédiaires hydrophobes et électrophiles, y compris de nombreux cancérogènes, agents thérapeutiques et produits du stress oxydatif, les rendant moins toxiques (John.et al.,2005).

2) Le stress oxydatif

L'oxygène est un élément vital mais qui présente, dans certaines conditions, une toxicité potentielle. Son utilisation au cœur de la cellule, dans la mitochondrie, génère de l'énergie à partir des nutriments apportés par l'alimentation. Ce processus, dit de *phosphorylation oxydative*, est physiologique, nécessaire à de nombreuses fonctions cellulaires : régulation du cycle cellulaire, immunité anti-tumorale, immunité non spécifique, contraction musculaire, Mais pour éviter tout emballement, il doit être régulé par des systèmes dits anti-oxydants (Halliwell, et *al.*,2015).

Ainsi, le bon fonctionnement de l'organisme dépend de l'équilibre de la balance entre la quantité de radicaux produits et la capacité de contrôle des systèmes anti-oxydants apportés par l'alimentation ou produits par les cellules. Tout déséquilibre entraîne la production d'une quantité trop importante de radicaux libres : c'est le stress oxydatif ou stress oxydant (Sies *H.*,1991).

La définition du stress oxydatif est donc un excès de radicaux libres et cet excès est délétère, cause et/ou conséquence d'un grand nombre de maladies chroniques, dont les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies inflammatoires chroniques ou certaines maladies neurodégénératives (valko.et *al.*,2007).

En cas de rupture d'adaptation anti-oxydante, c'est-à-dire de déséquilibre entre la quantité de radicaux produits et nos systèmes anti-oxydants, les effets du stress oxydant s'exercent sur trois cibles principales, les lipides, les protéines et l'ADN, entraînant des dégâts cellulaires et tissulaires importants (valko.et *al.*,2007).

Ces perturbations métaboliques diffèrent selon l'organe ou le type cellulaire atteint, le taux et le type de radicaux libres formés et selon des facteurs génétiques spécifiques des individus, leur hygiène de vie, le contexte physiopathologique, des facteurs environnementaux (Halliwell.et *al.*,2015).

Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

Chapitre II : Résultats et Discussion

Chapitre I :

Matériels et méthodes

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Matériels et méthodes

Nous avons mené une étude au Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Martyr Hama Lakhdar à El Oued en janvier 2025 et février 2025 sur les paramécies traitées à l'acide phosphorique et étudié son effet sur plusieurs biomarqueurs de stress (activité GST, GSH et activité CAT).

1.1. Matériels

1.1.1. Matériel animal

- ✓ Le matériel animal utilisé dans notre étude est un micro-organisme unicellulaire d'eau douce, le protiste cœliaque : *Paramecium sp*.
- ✓ La paramécie est un grand protozoaire à cellules vibrantes qui permet le mouvement et le transport des nutriments. Il vit généralement dans les milieux aquatiques et se nourrit essentiellement de bactéries.
- **Sélection de *Paramecium sp* comme modèle biologique**

-L'espèce est facile à identifier et est abondante dans la nature (**Marchese. et al., 1996**).

-Sa répartition géographique est large (**Bennett. et al., 1992**).

-Étant donné leur large utilisation, les tests de toxicité doivent être rapides, simples, faciles, reproductibles et assez difficiles à réaliser (**Giesy. et al., 1989**).

-Il a de l'importance dans le fonctionnement de l'écosystème (**Kosmala et al., 1999**).

-Sa culture et sa manipulation sont simples (**Taylor et al., 1991**).

-Il est sensible au produit testé (**McPherson et al., 2000**).

Les paramètres présentent des caractéristiques physiologiques comparables à celles des cellules épithéliales humaines. Pour la modélisation des tests de cytotoxicité, ils constituent un excellent modèle moderne (**Van Houten., 2023**).

Certains des avantages sont que ces cellules, sont des organismes dans leur intégralité. Ils sont divisés pour produire de nombreuses pratiques pour des études diverses, être examinés pour l'hérédité des traits «ils effectuent des processus similaires à ceux de la majorité multicellulaire (**Görtz., 1988**).

Chapitre I : Matériels et méthodes

La paramécie étudie l'évolution des mécanismes cellulaires dans les protéines, souvent considérées comme des précurseurs de cellules eucaryotes complexes (lynn.,2008).

Il montre des réponses comportementales simples à la stimulation (par exemple, la chimie, la galvanotaxie), ce qui permet de rechercher les bases moléculaires du comportement cellulaire (naitoh. et *al.*,1973).

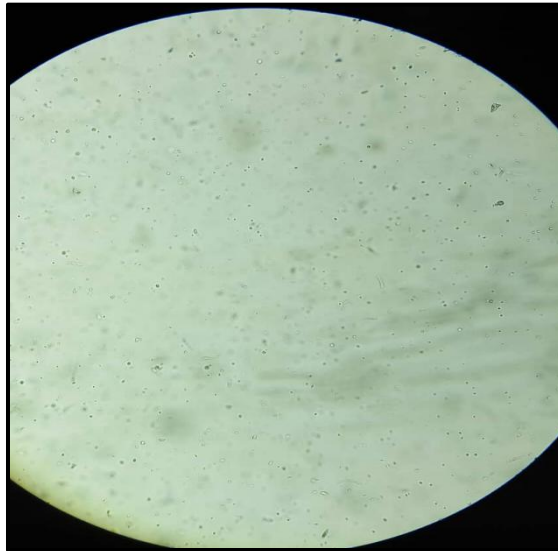


Figure 06 : *Paramecium sp* au microscope (Originale, 2025)

1.1.2. Matériel chimique

Dans cette étude, nous avons utilisé de l'acide phosphorique (H_3PO_4) (85 %), acheté sur le marché local d'El Oued. Ce produit chimique est vendu aux industriels et L'acide phosphorique est essentiellement utilisé dans les applications suivantes:

Fabrication de céréales. Traitement de surface avec des métaux ,Régulateur d'acidité/antioxydant/agent colorant dans l'industrie alimentaire E338, Nettoyage de surfaces (métal, tissu, porcelaine...), Liants pour produits de refacturation et produits céramiques ,Traitement de l'eau. Catalyseur pétrochimique, Coagulation du caoutchouc latex, Teinture pour l'industrie textile, Ciment dentaire (Dziezak,J.,2016).

-L'acide phosphorique présente des effets ant parasitaires notables, activité antimicrobienne en endontie :Une étude publiée dans le Journal of Applied Oral Science a évalué l'efficacité de l'acide phosphorique à 37 % comme irrigant endodontique, L'acide phosphorique a été suggéré comme irrigant en raison de son efficacité à éliminer la couche de boue dentinaire. Dans notre expérience, nous avons appliqué de l'acide phosphorique sur le *Paramecium sp*

Chapitre I : Matériels et méthodes

pour découvrir les effets sur les biomarqueurs de stress. Sur quelle base avons-nous choisi les concentrations suivantes 200.400.600 ?"Après avoir effectué des tests préliminaires sur le paramécie, nous avons déterminé les concentrations les plus appropriées d'acide phosphorique, qui provoquent un effet négatif sans entraîner sa mort. Une diminution de sa vitesse et un ralentissement de ses mouvements ont été observés."

1.1.3. Réactifs et produits utilisés

1.1.3.1. Définition de CDNB

Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (abrégé en CDNB) est un composé aromatique de formule chimique $C_6H_3Cl(NO_2)_2$. Il s'agit d'un dérivé du benzène dans lequel un atome de chlore est lié en position 1 et deux groupes nitro ($-NO_2$) sont liés en positions 2 et 4. Il se présente généralement sous forme de cristaux jaunes et est utilisé principalement en laboratoire pour tester l'activité enzymatique, notamment celle de la glutathion S-transférase (GST). (Boucelha, Lilya et *al.*, 2023).

A. Principales

Formule brute : $C_6H_3ClN_2O_4$.

Masse molaire : 202,55 g/mol.

Numéro CAS[7-00-97] .

Insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques.

B. Mode d'action L'action du CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) est souvent étudiée en biochimie et en enzymologie, notamment en tant que substrat modèle pour les enzymes de type glutathion S-transférase (GST).

C. Mode d'action du CDNB

1- CDNB agit comme un substrat électrophile :

C'est une molécule électrophile capable de réagir avec des nucléophiles comme le glutathion (GSH). (Boucelha, Lilya et *al.*, 2023).

2- Réaction catalysée par la Glutathion S-Transférase (GST):

L'enzyme GST catalyse la conjugaison du glutathion au CDNB.

Chapitre I : Matériels et méthodes

Le groupement thiol (-SH) du GSH attaque le carbone électrophile du CDNB, remplaçant l'atome de chlore.

Le produit formé est un conjugué GSH-CDNB, qui est plus soluble et peut être excrété plus facilement.

Réaction:



3- Utilisation en laboratoire:

Ce substrat est utilisé pour mesurer l'activité des GST via une méthode spectrophotométrique.

Le produit formé absorbe à 340 nm, ce qui permet de suivre l'évolution de la réaction (Boucelha, Lilya et *al.*, 2023).

1.1.3.2. L'acide trichloracétique :

Est utilisé dans les produits suivants : produits chimiques de laboratoire, produits pharmaceutiques, régulateurs de pH et produits de traitement de l'eau et produits cosmétiques et de soins personnels.

L'acide trichloracétique est utilisé dans les produits suivants: produits chimiques de laboratoire, produits de revêtement, produits de traitement de surface non métalliques, produits de lavage et de nettoyage et produits pharmaceutiques.

Le rejet dans l'environnement d'acide trichloracétique peut se produire lors d'une utilisation industrielle : formulation de mélanges.

▪ Mode d'action en biochimie :

En biochimie, le TCA est utilisé pour la précipitation des macromolécules telles que les protéines, l'ADN et l'ARN. Il agit en dénaturant les protéines, rompant leurs liaisons hydrogène et interactions hydrophobes, ce qui provoque leur agrégation et précipitation.

Cette propriété est exploitée pour isoler et purifier des protéines ou des acides nucléiques à partir de mélanges complexes (Boucelha, Lilya et *al.*, 2023).

1.1.3.3. Définition du bleu brillant de coomassie (BBC)

Chapitre I : Matériels et méthodes

le bleu brillant de coomassie (ou coomassie brilliant blue souvent abrégé en CBB) est un colorant triphénylméthane utilisé pour colorer les protéines dans les gels de électrophorèse (comme les gels SDS-PAGE) ou dans les essais de quantification protéique, notamment le test de bradford (**Bradford, et al., 1976**).

- **Il ya 2 type:**

Coomassie brilliant blue R-250: utilisé pour la coloration des gels.

1. Coomassie brilliant blue G-250 : utilisé dans le test de Bradford, où il change de couleur en présence de protéines du brun au bleu (**Bradford,M.,1976**).

- **Mode d'action BBC:**

Une méthode de détermination des protéines, impliquant la liaison du bleu de Coomassie brillant G-250 aux protéines, est décrite. La liaison du colorant aux protéines entraîne un décalage du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm, et c'est l'augmentation de l'absorption à 595 nm qui est surveillée. Ce test est très reproductible et rapide : le processus de liaison du colorant est pratiquement terminé en 2 minutes environ, avec une bonne stabilité de la couleur pendant 1 heure. Il y a peu ou pas d'interférence avec des cations comme le sodium ou le potassium, ni avec des glucides comme le saccharose. Une faible quantité de couleur se développe en présence d'agents tampons fortement alcalins, mais le test peut être réalisé avec précision grâce à l'utilisation de tampons de contrôle appropriés. Les seuls composants provoquant une interférence excessive sont des détergents en quantités relativement importantes, tels que le dodécylsulfate de sodium, le Triton X-100 et les détergents commerciaux pour verrerie. L'interférence due à de faibles quantités de détergent peut être éliminée par l'utilisation de tampons de contrôle appropriés (**Maroin,M.,1972**).

1.1.3.4.Définition l'éthanol

Dans des conditions normales de pression et de température sous la forme d'un liquide incolore et inflammable ayant un point d'ébullition est l'alcool le plus connu, sous le nom d'alcool éthylique, qui se présente ion de 78,4 °C.

L'éthanol est miscible dans l'eau dans n'importe quelle proportion; à la concentration de 96 % en poids, un mélange azéotropique est formé.

Chapitre I : Matériels et méthodes

La molécule de l'éthanol est de formule topologique CH₃-CH₂-OH. La température critique est de 514 K (241 °C) (Dupont,M.,2022).

1.1.3.5.La définition Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est un composé chimique de formule H₂O₂, constitué de deux atomes d'hydrogène et deux atomes d'oxygène. C'est un liquide clair, incolore, légèrement plus visqueux que l'eau. Il est principalement utilisé comme agent oxydant, désinfectant, agent de blanchiment et dans certaines applications industrielles et médicales.

▪ Mode d'action du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène agit principalement par oxydation, Il libère de l'oxygène actif lorsqu'il se décompose (surtout en présence de catalyseurs comme la catalase ou la lumière), ce qui provoque la destruction des membranes cellulaires, des protéines et des acides nucléiques des microorganismes.

▪ Réaction chimique typique



Libération d'oxygène gazeux, qui est toxique pour de nombreux micro-organismes.

▪ Cette action oxydante permet

La désinfection (bactéries, virus, champignons, spores), et le nettoyage des plaies (à faible concentration), l'élimination des biofilms, L'éclaircissement (dans les cheveux ou les dents) via oxydation des pigments (Deregnacourt, et *al.*,1988).

1.1.3.6.Définition d'un tampon phosphate (avec référence fiable)

Un tampon phosphate est une solution tampon constituée d'un mélange d'acide phosphorique (H₃PO₄) et de ses sels conjugués (principalement le dihydrogénophosphate H₂PO₄⁻ et l'hydrogénophosphate HPO₄²⁻), utilisée pour maintenir un pH stable dans une solution, généralement autour de pH 6,8 à 7,4. Il est largement utilisé en biochimie, biologie

Chapitre I : Matériels et méthodes

cellulaire et en médecine, notamment pour les milieux de culture ou les analyses enzymatiques, car il mimique les conditions physiologiques. Le produit formé absorbe à 340 nm, ce qui permet de suivre l'évolution de la réaction. soluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques (Green, L et *al.*, 1982).

1.1.3.7.Définition L'acide sulfosalicylique (SSA)

Est un composé organique sulfoné dérivé de l'acide salicylique. En solution aqueuse à 0,25 %, il est utilisé comme agent précipitant des protéines. Son action repose sur une déstabilisation des forces hydrophiles maintenant les protéines en solution, ce qui conduit à leur précipitation visible (McPherson, et *al.*, 1982).

1.1.3.8.Définition scientifique de l'EDTA

Est un acide aminé polycarboxylique agissant comme un agent chélatant hexadenté, c'est-à-dire qu'il peut se lier à un ion métallique par six sites de coordination (quatre groupes carboxyles COO^- et deux atomes d'azote NH_2). (Arthur E, et *al.*, 1974).

Il forme ainsi des complexes très stables avec la plupart des cations métalliques divalents ou trivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , etc.) (Arthur E, et *al.*, 1974).

1.1.3.9.Définition L'albumine sérum bovin (BSA)

Egalement appelée sérum albumine bovine, est une protéine monomérique composée d'une seule chaîne d'acides aminés d'un poids moléculaire de 66,5 kDa que l'on trouve dans le sang des vaches. Composant majeur du plasma sanguin, la BSA est produite par le foie.

La BSA est couramment utilisée dans les laboratoires comme complément des milieux biochimiques et de culture tissulaire. La protéine stabilise le volume du liquide extracellulaire et sert de transporteur pour les petites molécules telles que les stéroïdes, les acides gras et les hormones thyroïdiennes. La BSA est également utilisée dans une variété d'applications industrielles et de recherche, y compris le développement de médicaments, la purification des protéines et la transformation des aliments. Elle est non toxique et non antigénique, et ne devrait donc pas provoquer de réaction immunitaire chez l'être humain ou chez d'autres animaux. Elle est donc généralement considérée comme sûre pour une utilisation en recherche et dans les applications industrielles (Peters, et *al.*, 1995).

Aussi Chlorure de sodium (NaCl), eau distillée. Chlorure de sodium (NaCl), eau distillée.

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation de la culture de paramécie

Suivant la méthode de Beaumont et Cassier (1998), comme:

- Nous avons récolté le foin dans l'espace vert de l'Université Martyr Hamma Lakhdar.
- Nous l'avons coupé et trempé dans de l'eau douce dans un récipient en verre transparent.
- Nous avons conservé le mélange dans un endroit chaud et bien ventilé pendant environ 10 jours.
- Un voile bactérien apparaît sur la solution, et les paramécies en prolifération sont observées pendant cette période au microscope optique sans coloration.
- Enfin, 10 ml de paramécies, 12 ml d'eau distillée et 8 ml de milieu de culture sont placés dans un tube à essai. Nous incubons les cultures à 25 °C pendant 2 à 3 jours.



Figure 07: un schéma expliqué préparation du milieu de culture (Originale.,2025).

2.2.2. Préparation de milieu de culture

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

- 2g de foin.
- 2g de blé.
- 2g de laitue.

Chapitre I : Matériels et méthodes

-1g de peau de pomme de terre.

1g de peau de concombre.

0.5g de cacahuètes.

-On ajoute 1,5 litre d'eau distillée et on laisse bouillir pendant 15min.

-Après le bouillon on ajoute 0.5g de levure.

-Le bouillon doit être filtré.

-Enfin, 10 ml de paramécies, 12 ml d'eau distillée et 8 ml de milieu de culture sont placés dans un bécher. Nous incubons les cultures à 25°C pendant 2 à 3 jours.

Il est nécessaire de réaliser des repiquages périodiques tous les trois jours, la meilleure croissance est 6 ml milieu de culture et 4 ml de l'eau distillée.

Chapitre I : Matériels et méthodes

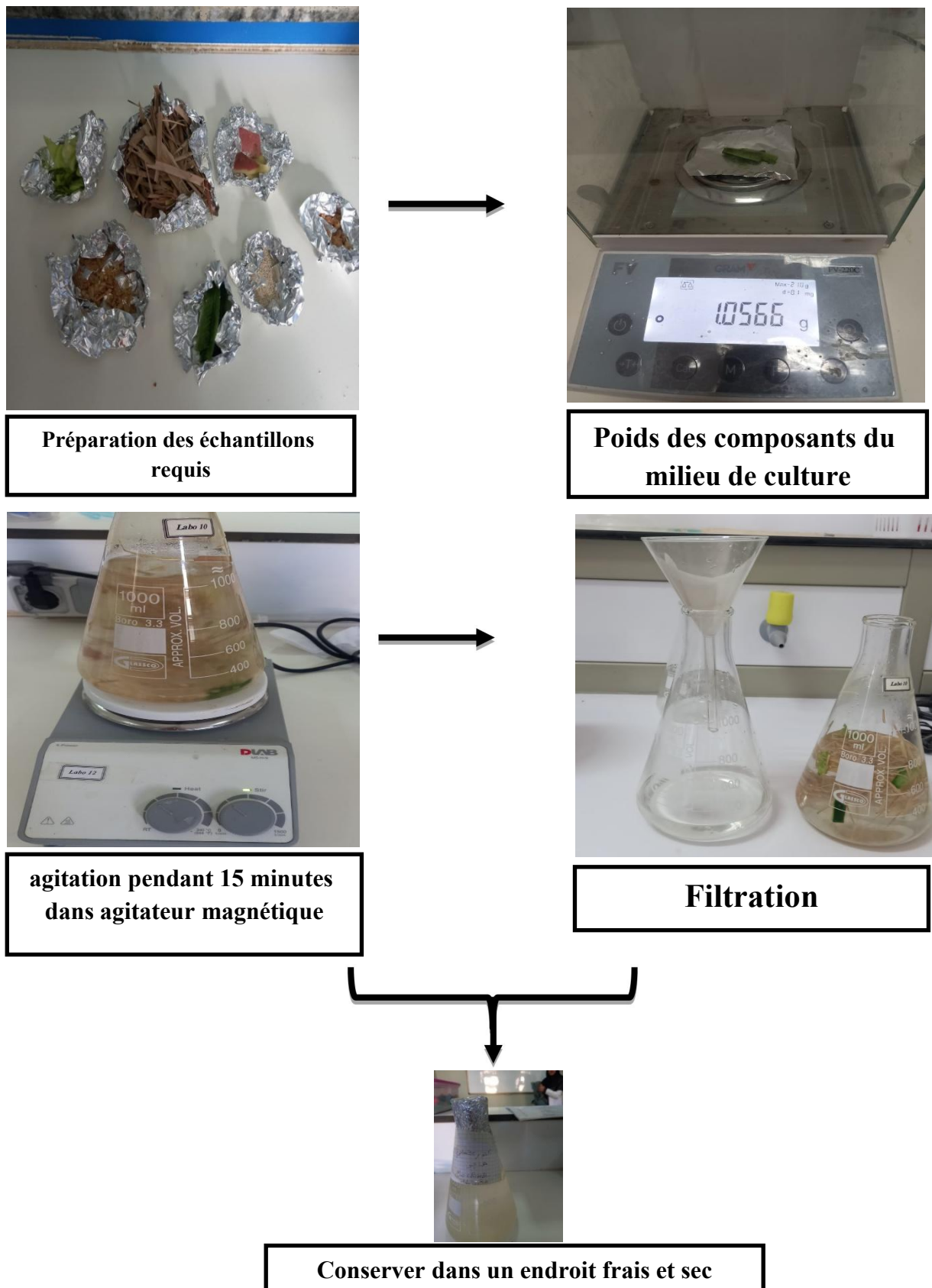


Figure 08 : Un schéma expliquant la préparer de milieu de culture (Originale., 2025).

2.2.3. Protocole de traitement de l'acide phosphorique

Nous avons placé l'eau contenant les paramécies et le milieu de culture dans un incubateur pendant 3 jours à une température de 25,5 °C pour augmenter le nombre avant le début du traitement. Nous avons préparé une solution mère contenant 1,5ml d'acide phosphorique complété avec l'eau distillée jusqu'à 500ml. Après avoir mené des essais préliminaires sur les Paramécies, nous avons choisi 4 concentrations différentes qui nous permettent d'obtenir une réponse biologique aux paramètres tels que T, C1, C2, C3 .

-Nous expliquerons le reste des étapes de l'expérience dans ce diagramme.

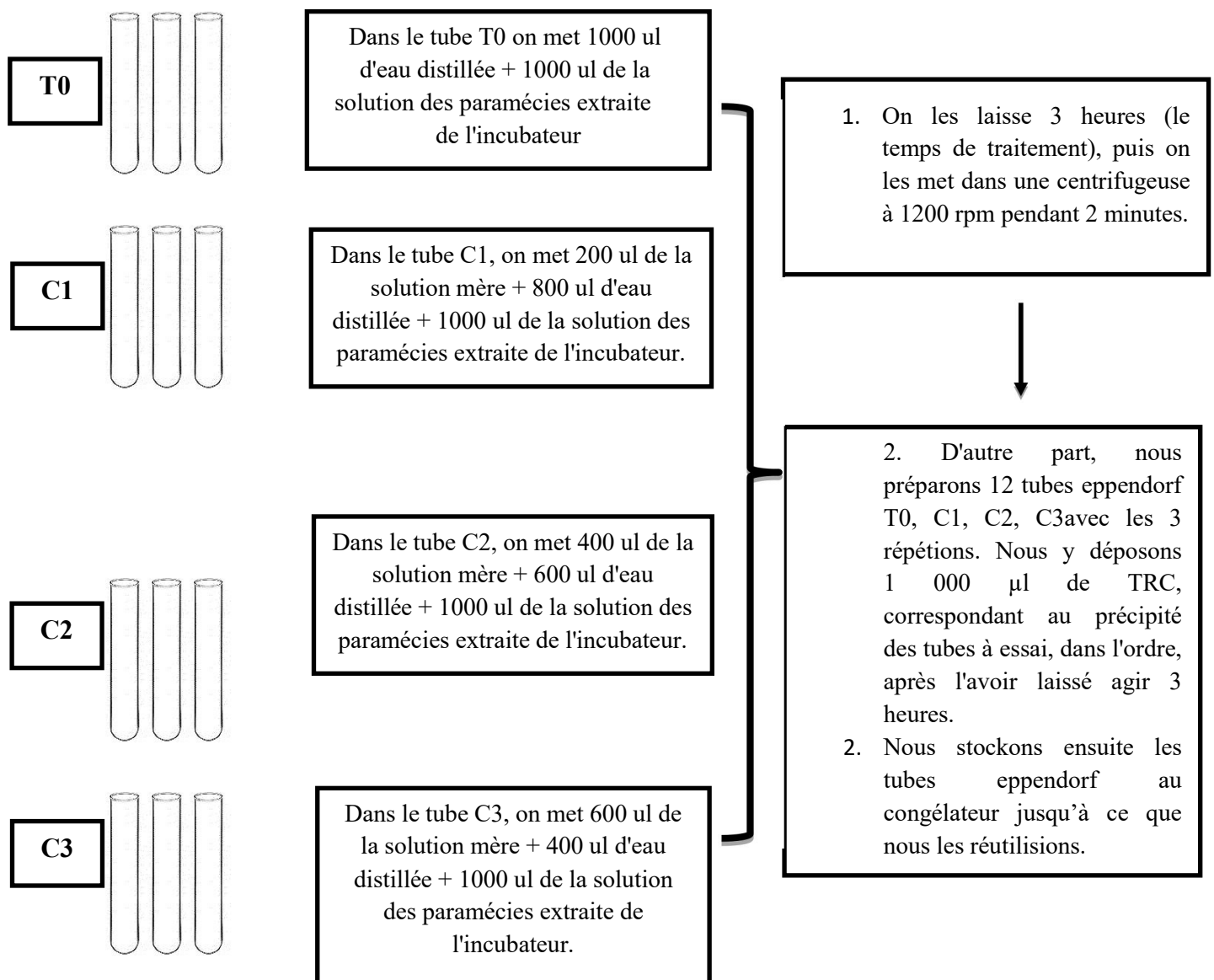


Figure 09 : Le schéma explique le protocole de traitement des paramécies avec de l'acide phosphorique (Originale., 2025).

Chapitre I : Matériels et méthodes

✓ Dosage des protéines totales

Après avoir sorti les tubes eppendorf du congélateur, nous les laissons décongeler un moment. Nous vidons les ingrédients des tubes eppendorf dans le mortier et les écrasons en mouvements circulaires. Le but de l'écrasement est de briser les tissus. A l'aide d'une micropipette, nous récupérons ensuite les ingrédients broyés et les plaçons dans des tubes stériles.

La méthode utilisée dans le dosage des protéines est celle de **Bradford (1976)**, ces protéines sont mesurées par colorimétrie.

La méthode de dosage des protéines la plus couramment utilisée est celle de **Bradford (1976)**, qui repose sur la liaison du colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 aux protéines.

Cette méthode est basée sur le changement d'absorbance à 595 nm qui correspond au changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et les résidus hydrophobes présents dans les protéines.

-Technique du dosage des protéines sont quantifiées selon la méthode de (**Bradford, 1976**), utilisant le Bleu Brillant de Coomassie G 250 (BBC) comme réactif et l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard.

-preparation réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC) G250:

-100 mg BBC.

-50 ml éthanol 95 °C.

-agitation pendant 2 heures.

-ajotée 100 ml acide orthophosphorique 85%.

-ajotée 1000 ml eau distillée.

-La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre UV-visible (JENWAY 6705).

-La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une protéine standard, l'albumine, sérum de bœuf (BSA), titrant 1 mg/ml [1 mg BSA, 1 ml eau distillée).



Figure 10 : Préparation réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC) (Originale., 2025).

✓ Dosage du glutathion (GSH)

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

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [17,448 g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion l'homogénéat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25% [0,25 g ASS, 100 ml eau distillée] où 0,2 ml du ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénéat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 min, puis centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 min.

Une aliquote de 500 µl du surnatant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris/ED/TA (0,02 M, pH 9,5) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [13,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl du surnatant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante:

$$X = \frac{DO}{13,2} \times \frac{Vd1}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

Chapitre I : Matériels et méthodes

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

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

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

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

Vh: volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris/EDTA + 0,025 ml DTNB].

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

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Mg de protéines

-Ajouter 4ml de BBC en tube à essai

-Puis nous y ajoutons 200 μl de surnageant

-Après, nous mélangeons le tout pendant 5 minutes.

-Un blanc où les 500 μl du surnageant sont remplacés par 500 μl d'eau distillée.

-La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible.

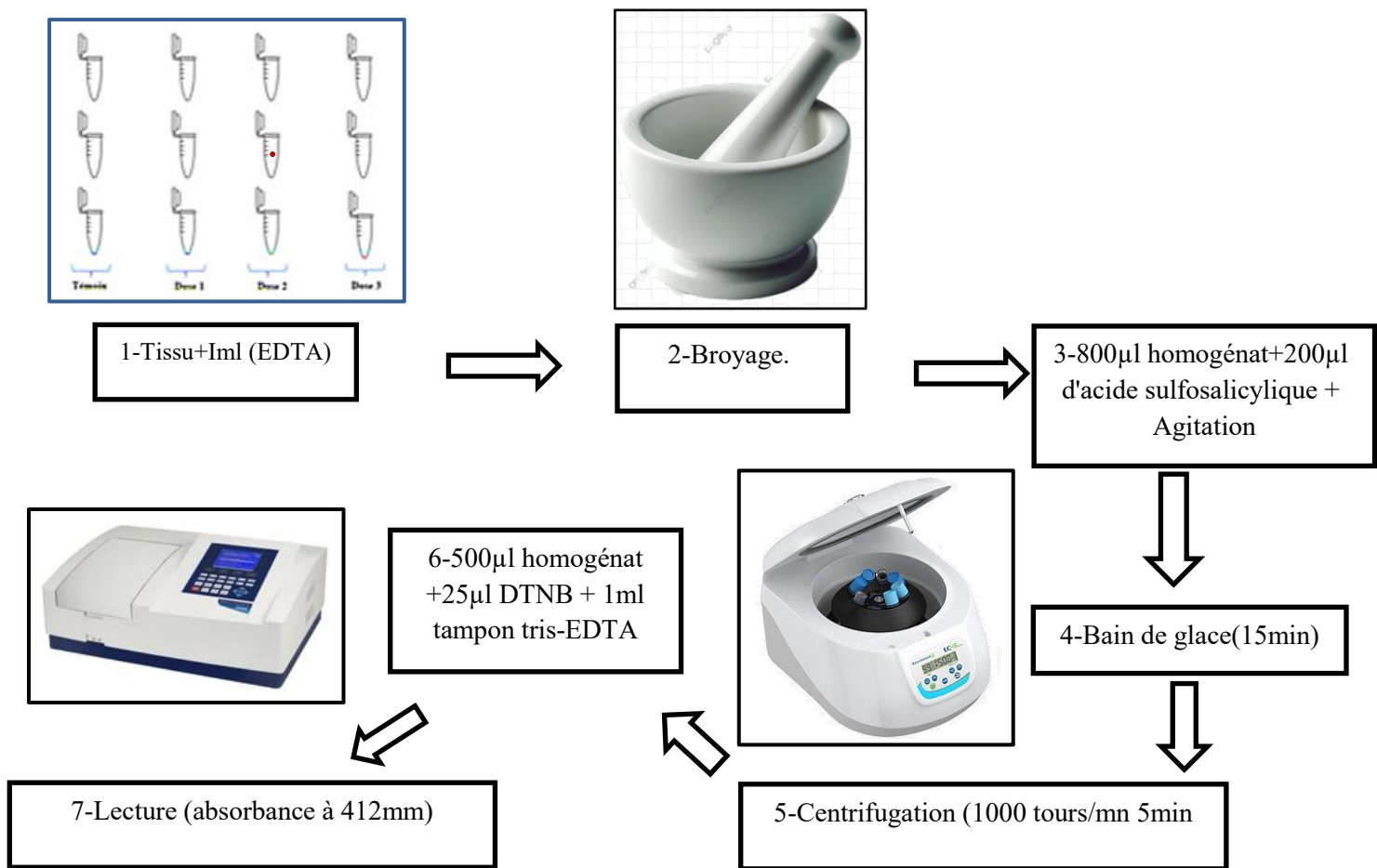


Figure 11 : Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion (GSH) (Original., 2025).

✓ Dosage activité enzymatique de la glutathion S-transferase (GST)

La mesure de l'activité de glutathion S-transferase (GST) est déterminée selon la méthode **Habig et al. (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzènes) en présence d'un enfacteur le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur fonde de 340 nm dans un spectrophotomètre visible/IV. Les

Echantillons sont homogénéisés dans 50ml de tampon phosphate (0.1 M. pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 trs/mn pendant 30 sum et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Le dosage comiste à faire réagir 200 µl du surmageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1 mM) GSH (5 mM) (20,26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 mi éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1 M. pH 6)] La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes à une longueur fonde de 340 am contre un blanc contenant 200 µl dean distillée remplaçant la quantité du surnageant.

Chapitre I : Matériels et méthodes

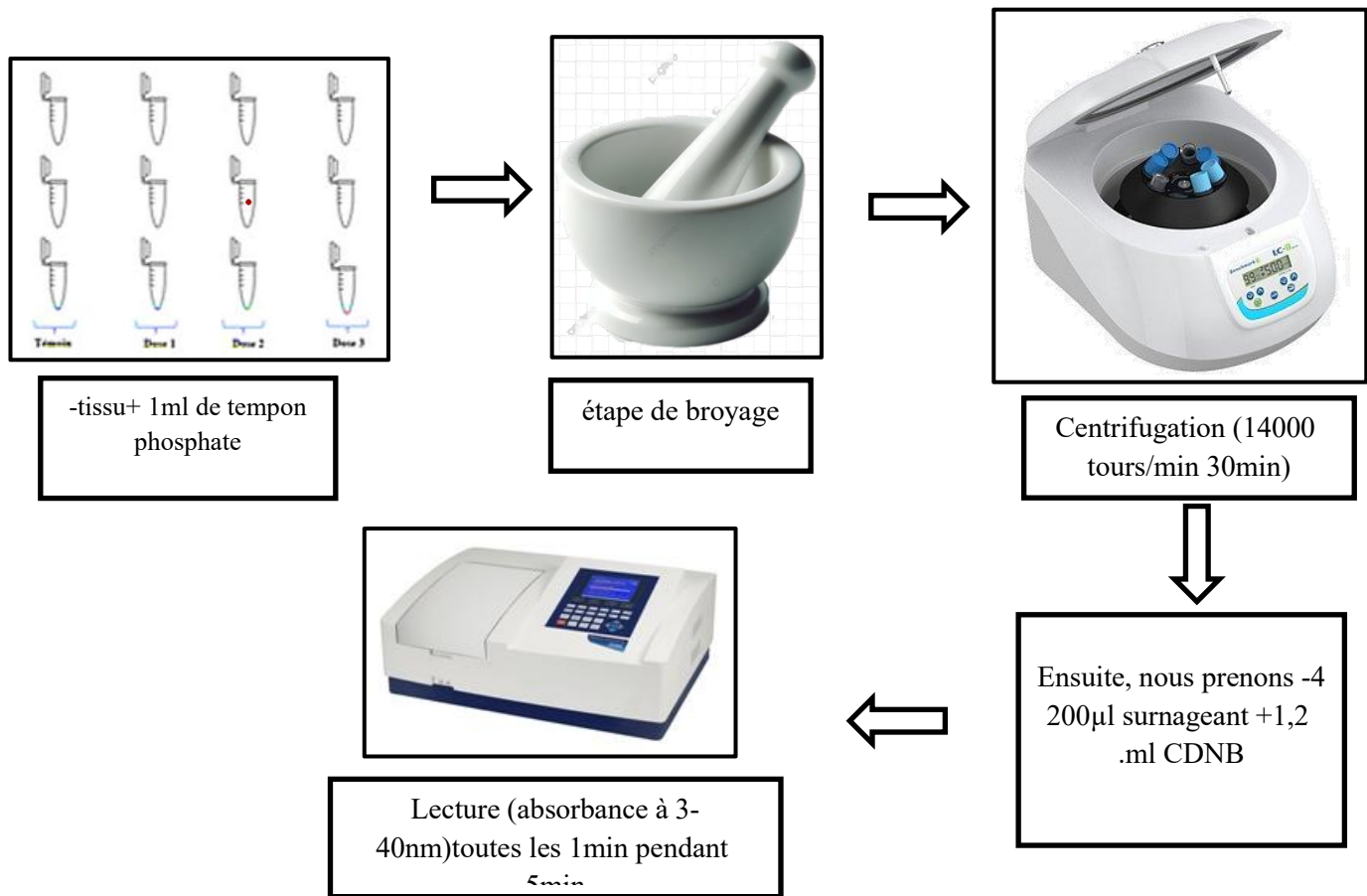


Figure 12 : Un schéma expliquant le protocole de dosage de l'activité glutathion S-transférase (GST) (Originale., 2025).

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

$$X = \frac{\Delta DO / mn}{9,6} \times \frac{V_t}{V_s} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

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

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

9.6: coefficient d'extinction molaire du CDNB

V_t : volume total dans la cuve : 1,4 ml (0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH)

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

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Chapitre I : Matériels et méthodes

.Mg de protéines

-Ajouter 4ml de BBC en tube à essai.

-Puis nous y ajoutons 100µl de surnageant.

-Dans le blanc, nous mettons 4 ml de BBC et 100 microlitres d'eau distillée.

Après, nous mélangeons le tout pendant 5 minutes.

-La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 595 nm au spectrophotomètre visible.

✓ Dosage de l'activité catalase

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

Les fragments des deux organes (glande digestive et rein) sont broyés aux ultrasons dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,5). L'homogénat est centrifugé à 15000g pendant 10 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme,

Pour un volume final de 1ml, le mélange réactionnel contient: 20µl de surnageant 200µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (500mM) et 780µl de tampon phosphate (0,1M, pH=7,5).

La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée et La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction molaire & 40 M⁻¹cm⁻¹ à 240nm à une température d'incubation de 25 °C. L'activité catalase (CAT) dans est exprimée en umol d' H_2O_2 , par minute et par ng de protéines

Les résultats sont exprimés en pmoles de H_2O_2 consommées par minute, ce qui correspond à 1 U de catalase selon la formule suivante:

$$X \left(\frac{\mu mol}{mn} \right) = \frac{(\Delta DO \times 10)}{(\epsilon \times L \times 0.05 \times mg \text{ de protéine})}$$

X: micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (M/mg de protéines).

Chapitre I : Matériels et méthodes

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

156: coefficient d'extinction molaire du TBA

Vt volume total dans la cuve: 1 ml [volume total du butanol récupéré renfermant les complexes TBA/MDAJ

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

mg de protéines quantité de protéines exprimée en mg

✓ Préparer mg de catalase

1/ Nous préparons 13 grands tubes à essai en verre et les recouvrons de papier aluminium. Elle est enceinte

2/ Préparer 4 ml de bleu BBC et y ajouter 100 ml de surnageant.

3/ Laisser agir la solution 5 minutes.

4/ Avant de lire, nous mettons d'abord l'appareil à zéro avec de l'eau distillée.

5/ Agiter la solution puis lire l'absorbance à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

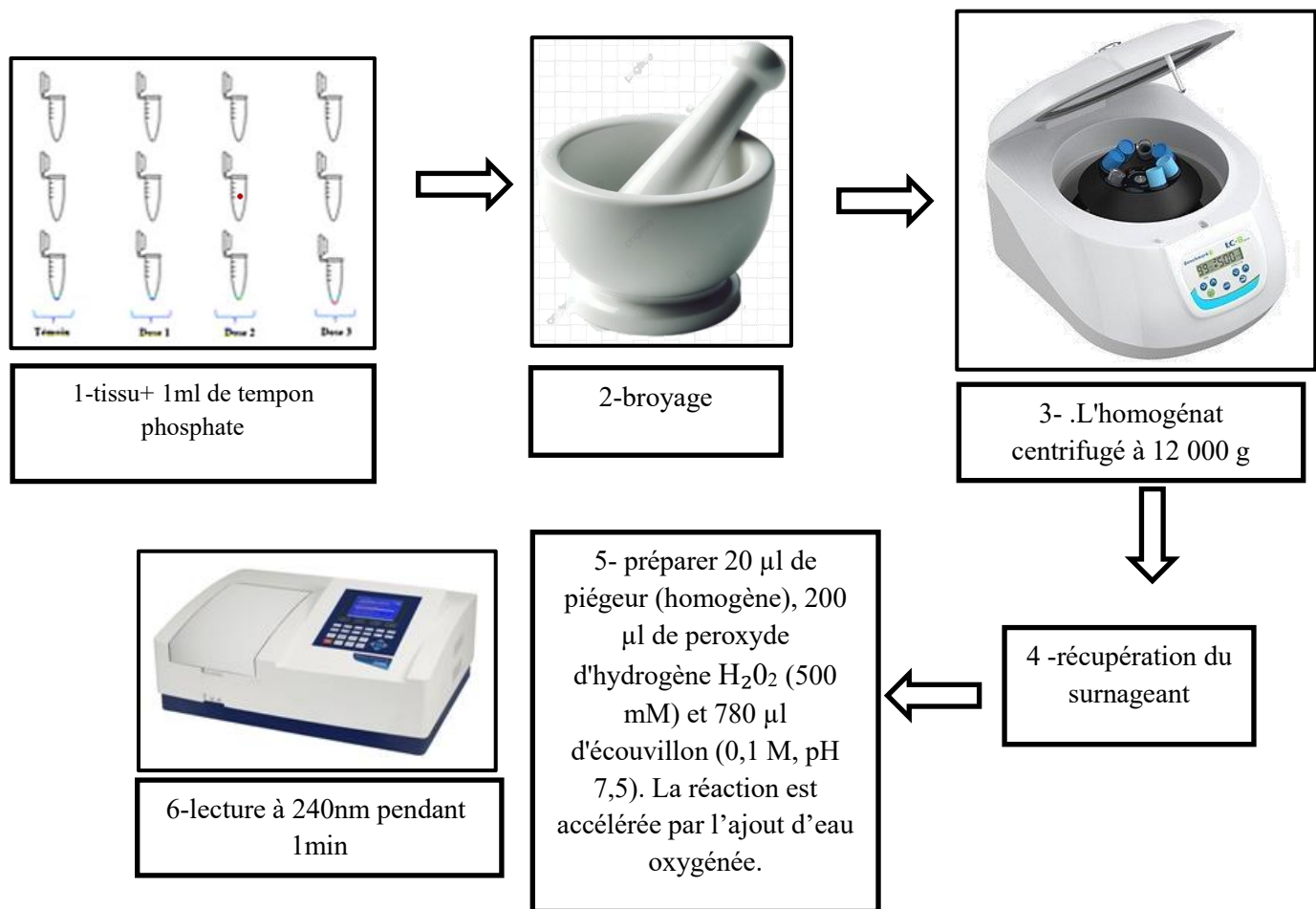


Figure 13 : Un schéma expliquant le protocole de dosage de l'activité catalase (Original., 2025).

2.2.4. Matériels de laboratoires

Agitateurs magnétiques à plaque chauffante de type COLE-PARMER.

- Bain-marie de type MEMMERT.
- Balance analytique de type GRAM FV-220C.
- Balance électrique de type KERN PCB.
- Barreau aimanté
- Centrifugeuse horizontale de type BENCHMARK LC-8 SERIES.
- Centrifugeuse horizontale de type DOMEL CENTRIC 350.
- Entonnoir.

Chapitre I : Matériels et méthodes

- Etuve de type MEMMERT.
- Micropipettes.
- Microscope optique de type OPTIKA lié à un appareil photo.
- Microtubes de centrifugation type Eppendorf.
- Mortier avec pilon.
- Nettoyeur à ultrasons CLE.
- Papier aluminium
- Papier filtre.
- PH-mètre de type CONSORT C3010.
- Pompe à membrane de type KNF.
- Portoir des tubes.
- Spatule en métallique.
- Spectrophotomètre de type JENWAY 6705 UV/Vis.
- Verreries (béchers, erlenmeyer, entonnoir en verre, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...etc).

2.2.5. Étude statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés comme la moyenne de trois répétitions pour chaque groupe (T. C1, C2, C3) plus ou moins l'écart type. Pour mieux visualiser les résultats, nous avons utilisé des graphiques à barres dans Excel 2016.

Ces résultats ont été analysés à l'aide de SPSS (version 20.0), basé sur une analyse de la variance à un facteur (ANOVA), qui permet de multiples tests de comparaison pour expliquer les différences entre les moyennes. Les différences sont les suivantes :

Statistiquement significatif lorsque la valeur $p \leq 0,05$ (*).

Statistiquement hautement significatif lorsque la valeur $p \leq 0,01$ (**).

Signification statistique très hautement significatifs lorsque la valeur $p \leq 0,001$ (***)

Chapitre II : Résultats et Discussion

Chapitre II : Résultats et Discussion

2.1. Résultats

2.1.1. L'effet de l'acide phosphorique sur les protéines totales chez les Paramécies

La figure (14) représente l'évolution du taux de protéines totales chez *Paramecium sp* traité avec des concentrations croissantes de l'acide phosphorique.

On constate que le taux de protéines totales diminue en fonction des concentrations croissantes de manière très hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au témoin aux deux plus fortes concentrations (400, 600 $\mu\text{mol/mg}$).

Le taux de protéines totales pour toutes les concentrations (200, 400, 600 μmol) respectivement (15.186, 8.151 et 2.517 $\mu\text{mol/mg}$) de PF, par rapport aux témoins 14.964 $\mu\text{g/mg}$ de PF.

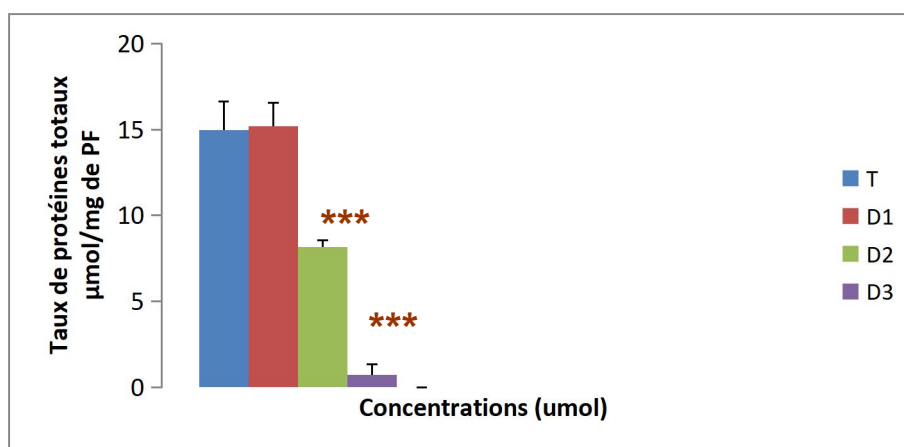


Figure 14 : L'effet de l'acide phosphorique sur les protéines totales chez les Paramécies.

2.1.2. Effets sur le taux de la glutathion (GSH)

La figure (15) représente l'évolution du taux de glutathion chez *Paramecium sp* traité avec des concentrations croissantes de l'acide phosphorique. Les variations du taux de glutathion sont obtenues après 3 heures d'exposition. Les données sont la moyenne SD de trois réplicats. On constate que le taux de GSH diminue en fonction des concentrations croissantes de manière non significatives par rapport au témoin. **Ces diminutions étaient non statistiquement significatives à toutes les concentrations (200, 400 et 600 μmol).**

Le taux de GSH pour toutes les concentrations (200, 400, 600 μmol), respectivement (0.065, 0.045, 0.035 $\mu\text{mol}/\text{mg}$) de PF, par rapport aux témoins 0.072 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF.

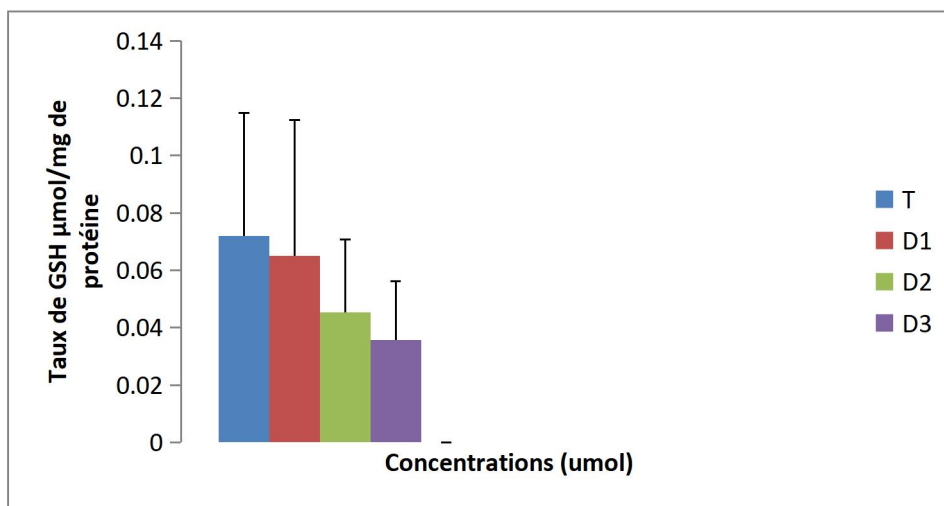


Figure 15: Effets de l'acide phosphorique sur le taux de glutathion (GSH)

2.1.3. Effets sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

La figure (16) montre l'évolution des taux de glutathion S-transférase chez des *Paramecium sp* traités par des concentrations croissantes d'acide phosphorique. Les variations des taux de glutathion S-transférase ont été obtenues après 3 heures d'exposition. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart type de trois réplicats.

L'activité de la glutathion S-transférase a augmenté avec l'augmentation des concentrations croissantes d'acide phosphorique. **Cette augmentations étaient non statistiquement significatives à toutes les concentrations** (200, 400 et 600 μmol), respectivement, d'environ 0,313, 0,373 et 0,529 $\mu\text{mol/mg}$, par rapport au groupe témoin (0,158 $\mu\text{mol/mg}$).

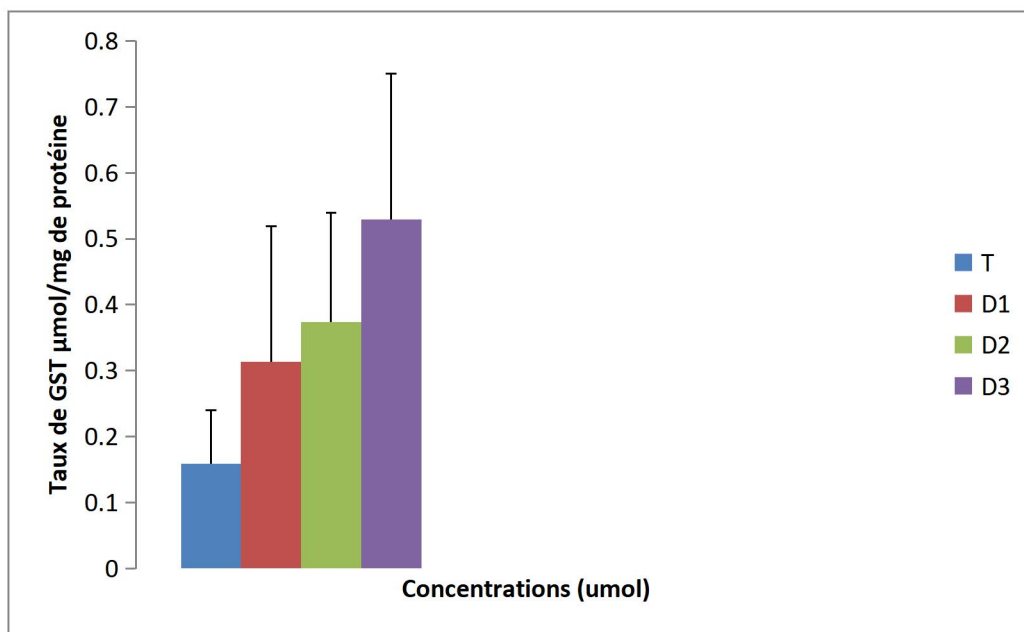


Figure 16 : Effets d'acide phosphorique sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

2.1.4. Effets sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

La figure 17 montre l'évolution de l'activité catalase chez *Paramecium sp* traités par des concentrations croissantes de solution d'acide phosphorique. Des modifications des taux de catalase ont été observées après 3 heures d'exposition.

L'activité de la catalase a diminué avec l'augmentation des concentrations de solution d'acide phosphorique, avec une diminution très hautement significatives ($p < 0,001$) à toutes les concentrations. Les concentrations de 200, 400 et 600 u.mol étaient respectivement d'environ 167,744, 75,561 et 39,007 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, par rapport au témoin (668,52 $\mu\text{mol}/\text{mg}$).

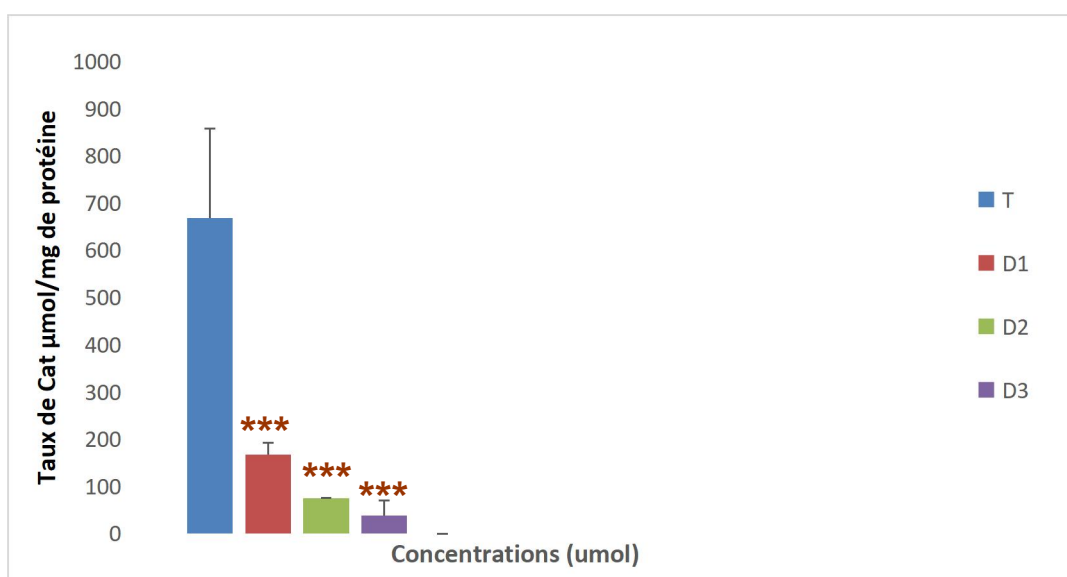


Figure 17 : Effets d'acide phosphorique sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT).

2.2. Discussion

L'acide phosphorique est un liquide cristallin incolore et inodore contenant l'élément phosphore et que l'on trouve dans de nombreuses boissons gazeuses ou sodas sucrés. En plus des boissons, l'acide phosphorique est ajouté à de nombreux aliments transformés comme arôme et conservateur. Et avec l'augmentation de son utilisation dans les aliments et les boissons, les organismes de réglementation se sont impliqués dans l'élaboration de directives et de normes de sécurité. Des autorités telles que la Food and Drug Administration (FDA) américaine et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) ont fixé des niveaux maximaux d'acide phosphorique autorisés dans différents produits alimentaires afin de garantir la sécurité des consommateurs et de prévenir une consommation excessive. Ces dernières années, l'impact environnemental de la production d'acide phosphorique et de son utilisation dans les engrais a été de plus en plus pris en compte. L'extraction et la transformation du phosphate naturel, principale matière première de l'acide phosphorique, peuvent avoir des effets néfastes sur les écosystèmes et la qualité de l'eau. Des efforts sont déployés pour améliorer l'efficacité de l'extraction du phosphate et réduire la pollution environnementale (**Homar murillo., 2020**).

Bien que l'acide phosphorique soit important pour de nombreuses fonctions vitales, certaines études suggèrent qu'une consommation excessive peut entraîner divers problèmes de santé. Parmi les complications potentielles figurent une fragilité osseuse (ostéoporose) et un risque accru de maladie cardiaque.

Les protozoaires libres sont des organismes précieux pour les recherches toxicologiques, offrant la possibilité d'étudier directement des cellules indépendantes, ils possèdent à la fois les caractéristiques spécifiques de cellules individuelles et d'organismes entiers. Leur utilisation traditionnelle comme indicateurs d'actions toxiques en médecine et en pharmacologie et comme détecteurs sensibles des modifications morphologiques et métaboliques induites par certains médicaments a été étendue à l'évaluation des dommages cellulaires après exposition à des agents cancérogènes (**Epstein et Burroughs, 1962**), à la fumée de tabac (**Wang, 1963 ; Weiss, 1965**) et aux radiations (**Laborde et al., 1965 ; Planel et al., 1965**).

Le test de toxicité sur *Paramecium* est l'une des méthodes les plus importantes pour étudier la toxicité des composés organophosphorés. Le bio-indicateur ***Paramecium aurelia*** se

caractérise par un cycle biologique court, une multiplication rapide et un comportement normal, susceptible d'être affecté par la présence de polluants (Benbouzid,et *al.*,2013).

Lorsqu'un stress oxydatif s'installe, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques, biochimiques et moléculaires (Boucelha et Djebbar., 2023).

Notre étude montre une forte corrélation dose-réponse entre l'exposition à une solution d'acide phosphorique et l'expression des protéines totale, de GSH, activité GST et activité CAT, après 3 heures chez les paramécies. En effet, **nous avons constaté que l'ajout d'une solution d'acide phosphorique au milieu entraînait une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la teneur en protéines totale de *Paramecium sp.*** Alors qu'à la concentration C2 le taux a légèrement augmenté. Nos résultats sont cohérents avec ceux de (Lian ,et *al.*, 2020), qui ont montré une baisse des niveaux de protéines totales chez *Tetrahymena pyriformis* exposée à des métaux lourds et à des contaminants acides. De même, une étude menée par (Feng, et *al.*,2019) démontre que l'acidification du milieu induit une réduction significative des protéines totales chez les organismes planctoniques, cette activité s'explique par son effet toxique sur l'organisme planctoniques, entraînant une inhibition significative de la synthèse protéique totale ou de son accumulation, La diminution dose-dépendante observée peut s'expliquer par plusieurs mécanismes biologiques potentiels. D'une part, l'acidification du milieu peut entraîner un déséquilibre ionique intracellulaire, altérant la stabilité des enzymes impliquées dans la synthèse protéique (Feng, et *al.*,2019).

Dans un second temps, et après avoir élucidé les effets de solution de acide phosphorique sur l'évolution du taux de protéines totales, nous avons jugé utile de suivre l'évolution du taux de GSH , le glutathion étant le principal antioxydant intracellulaire qui agit contre le stress oxydatif et qui existe principalement sous forme de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxyde (GSSG) (Jin et *al.*, 2010). Le processus de synthèse, de transport, d'utilisation et de métabolisme du glutathion est étroitement contrôlé pour maintenir l'homéostasie intracellulaire du glutathion et l'équilibre redox de la cellule (Huanhuan et *al.*, 2019).

Dans notre travail, après 3 heures d'exposition des paramécies à l'acide phosphorique, la présente étude démontre clairement une forte corrélation dose-réponse entre l'exposition à la solution de acide phosphorique et l'expression de GSH qui semble être sensible aux xénobiotiques. **La concentration de glutathion a diminué de manière non significative à**

mesure que la concentration de la solution d'acide phosphorique a augmenté, ce qui est cohérent avec les résultats de **benbouzid ,et al., 2014**, dans leurs article (Induction d'un stress oxydatif chez *Paramecium aurelia* exposé à un nouveau type de phosphoramidates) dans cette étude précédente, la concentration en glutathion diminuait avec l'augmentation de la concentration en phosphoramidate, Des études antérieures ont montré que la diminution significative des niveaux de GSH peut être due à l'inhibition de la synthèse du GSH ou à une utilisation accrue du GSH pour détoxifier les radicaux libres causés par les toxines. Le rôle du GSH et des thiols non protéiques dans les cellules a été démontré dans la formation de complexes associés aux produits électrophiles du métabolisme des médicaments, qui sont souvent formés par les monooxygénases associées au cytochrome P-450 (**benbouzid, et al., 2014**).

D'autre part, Les glutathion-S-transférases (GSTs) constituent une superfamille multigénique d'enzymes présentes dans les trois domaines du vivant (bactéries, plantes, mammifères). Cette présence ubiquitaire souligne l'origine sans doute très ancienne de ces enzymes ainsi que des fonctions fondamentales conservées au cours de l'évolution. Les GSTs sont impliquées notamment dans la détoxification cellulaire de molécules toxiques et dans le métabolisme secondaire. Par exemple, les GSTs interviennent dans la résistance au stress oxydant (élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par la photosynthèse et/ou la respiration) et la détoxification/excrétion des xénobiotiques (polluants, pesticides, métaux lourds médicaments, etc), et ce, par conjugaison entre le glutathion réduit (GSH, un tripeptide g-glutamyl-cysteinyl-glycine) et les composés toxiques. La GST est une enzyme qui catalyse l'attaque nucléophile du GSH au niveau du centre électrophile de nombreux composés toxiques avec des structures chimiques très différentes (**Bocedi et al., 2019**) . Et représente, de par sa présence dans le cytosol (5-8% de toutes les protéines solubles), la ligne de défense la plus importante (phase II) capable de transformer les xénobiotiques ou balayer les toxines dangereuses en se liant à elles et en favorisant leur extrusion hors de la cellule (**Fabrini et al., 2010; Bocedi et al., 2016**).

Dans notre étude, une augmentation de manière non significative de l'activité enzymatique GST a été observée chez *Paramecia*, ce qui est cohérent avec les résultats de (**benbouzid ,et al., 2014**). L'étude précédente a été menée pour étudier l'effet du composé organophosphoré nouvellement synthétisé : PA-A sur le stress oxydatif. Ce composé a été testé à différentes concentrations (40, 60 et 80 μ M) sur une culture pure de *Paramecium aurelia* pendant 72 heures. Nous comparerons uniquement pendant la première heure, ou ils

ont noté une augmentation significative des taux de glutathion, ce qui concorde avec nos résultats de recherche et s'explique par une réponse au stress oxydatif résultant de la présence de composés organophosphorés chez les paramécies. Les enzymes de biotransformation sont parmi les premières à réagir à la présence d'une substance étrangère dans un organisme. Cette augmentation indique une augmentation du taux de conjugaison de la substance étrangère au glutathion.

Les catalases (CAT) sont des enzymes peroxysomales qui protègent les molécules biologiques de l'oxydation causée par le peroxyde d'hydrogène. Certaines substances présentes dans les membranes cellulaires sont susceptibles de provoquer un stress oxydatif (Livingston et *al.*, 1993). La catalase joue un rôle important dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO) résultant de la toxicité et est considérée comme une enzyme présentant une réponse claire et précoce à la pollution.

Dans cette étude, nous avons constaté l'activité de la catalase a diminué avec l'augmentation des concentrations de solution d'acide phosphorique, avec une diminution très hautement significatives ($p < 0,001$) à toutes les concentrations, après 3 heures d'exposition à différentes quantités d'une solution d'acide phosphorique chez les Paramécies. Ce qui concorde avec une étude antérieure de (benbouzid et *al.*, 2014), leurs résultats ont montré une diminution de l'activité catalase au cours de la première heure de traitement et une augmentation au cours des 18e et 24e heures. D'autre part, leurs résultats ont montré une augmentation de l'activité catalase chez *Paramecium aurelia* traitée avec différentes concentrations de PA-A, due à une augmentation de l'activité antioxydante dans les cellules. Nous avons constaté que des effets significatifs sur l'activité catalase ont été observés à des concentrations plus faibles de PA-A, ce qui pourrait être dû à la sensibilité de ce biomarqueur. En effet, la catalase est considérée comme l'une des plus sensibles aux stress oxydatifs notamment aux polluants chimiques présents dans le milieu aquatique (benbouzid et *al.*, 2014).

Conclusion

Conclusion

Les protozoaires jouent un rôle fondamental dans la nature vivante, en raison de leur grande valeur et de leur importance en termes de recherche scientifique fondamentale, car de nombreux problèmes biologiques sont plus faciles à étudier dans des cellules isolées plutôt que dans des organismes multicellulaires, et ils sont plus faciles à obtenir, à cultiver et à observer sous un microscope optique. Les paramécies sont des organismes unicellulaires (protozoaires). La facilité de culture et d'observation des paramécies a permis leur étude depuis le début du XVIII^e siècle et en a fait des organismes modèles encore largement utilisés.

Notre choix a été d'étudier les effets de l'exposition à l'acide phosphorique sur certains biomarqueurs de stress (Activité CAT / GST et GSH) et les protéines totales chez les paramécies afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'acide phosphorique à l'échelle de l'organisme unicellulaire et multicellulaire.

Selon une revue de la littérature et des études menées sur l'effet de l'acide phosphorique sur certains animaux et micro-organismes tels que les paramécies et autres, l'acide phosphorique provoque une perturbation globale du métabolisme (diminution du taux de protéines totales). Cependant, le taux de déclin de ces derniers dépend de différentes concentrations et s'explique par le fait que la présence de substances étrangères à l'intérieur de la cellule stimule la synthèse des protéines, notamment des enzymes avec le déclenchement du système anti oxydants, et explique la capacité de ces micro-organismes à métaboliser et à détoxifier.

De toutes ces données, nous pouvons conclure que l'acide phosphorique peut provoquer des troubles métaboliques chez les organismes unicellulaires et que *Paramecium* est un excellent organisme modèle pour les études toxicologiques. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer son efficacité *in vivo*.

Conclusion

En regardant vers l'avenir, il serait intéressant de mener davantage de recherches sur :

- 1/ L'étude d'acide phosphorique sur la paramécie à différentes concentrations et à différents temps.
- 2/ Etudier l'effet systémique de l'acide phosphorique sur d'autres bio-modèles de différents protozoaires.
- 3/ Rechercher plus de détails sur l'effet de l'acide phosphorique sur la physiologie et la structure de la paramécie.
- 4/ Accorder une plus grande importance à l'étude de la génétique et de la neurologie des micro-organismes.

Conclusion

Références

Références

1. Christensen, J. H.; Reed, R. B. (1955). "Design and Analysis Data—Density of Aqueous Solutions of Phosphoric Acid Measurements at 25 °C". *Ind. Eng. Chem.* **47** (6): 1277–1280. doi:10.1021/ie50546a061.
2. Marchese, M., et al. "Ecological diversity and distribution of benthic macroinvertebrates in riverine ecosystems." *Aquatic Ecology*, vol. 30, no. 2, 1996, pp. 187–194.
3. Bennett, W.N., et al. "A review of the comparative toxicology of aquatic microinvertebrates." *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 11, no. 5, 1992, pp. 895–904.
4. Giesy, J.P., et al. "Biological techniques for assessing the toxicity of contaminants in sediments." *Hydrobiologia*, vol. 188/189, 1989, pp. 345–368.
5. Kosmala, S., et al. "Paramecium as a test organism in aquatic ecotoxicology." *Environmental Research*, vol. 80, no. 2, 1999, pp. 144–150.
6. Taylor, D., et al. "The use of protozoa in toxicological testing." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 21, no. 3, 1991, pp. 308–318.
7. McPherson, D.W., et al. "Sensitivity of Paramecium to a range of toxic substances." *Toxicology in Vitro*, vol. 14, no. 4, 2000, pp. 361–367.
8. Van Houten, J.L. "Paramecium as a model to study cell signaling." *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 70, no. 1, 2023, pp. 5–15.
9. Görtz, H.-D. *Paramecium*. Springer-Verlag, 1988.
10. Lynn, Denis H. *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*. 3rd ed., Springer, 2008.
11. Naitoh, Y., et al. "Mechanisms of stimulus-response coupling in Paramecium." *The Journal of Protozoology*, vol. 20, no. 4, 1973, pp. 519–528.
12. B. Références sur l'acide phosphorique (usages, sécurité, activité antimicrobienne, chimie)
13. Dziezak, J.D. "Phosphoric Acid: Properties and Applications." *Food Technology*, vol. 40, no. 7, 2016, pp. 84–88.
14. Maira, J.C., et al. "Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid compared to other irrigants." *Journal of Applied Oral Science*, vol. 23, no. 4, 2015, pp. 384–390. doi:10.1590/1678-775720140447

Références

15. Sigma-Aldrich. Safety Data Sheet: Phosphoric Acid. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2024. [Consulté pour les consignes de sécurité générales et caractéristiques corrosives.]
16. Holleman, Arnold F., et Egon Wiberg. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. De Gruyter, 2007. (Pour les données sur la condensation thermique de H_3PO_4 en $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$, $(\text{HPO}_3)_3$, P_2O_5).
17. **Greenwood, N. N., & Earnshaw, A.** (1997). *Chemistry of the Elements* (2nd ed.). Butterworth-Heinemann. Référence classique sur les propriétés des éléments et de leurs composés, incluant les acides oxygénés comme H_3PO_4 .
18. Randall, D. J. et Robinson, E. C. (1990) Skin irritation tests on various concentrations of phosphoric acid. Journal of the American College of Toxicology. Part B. Acute Toxicity Data 1:1:68-69.
19. European Chemicals Agency (2018) orthophosphoric acid - dossier REACH. Disponible sur : <http://www.echa.europa.eu/>
20. Al-Ani, F. Y. et Al-Lami, S. K. (1988) Absence of mutagenic activity of acidity regulators in the Ames Salmonella/microsome test. Mutation Research 206:4:467-470.
21. Demerec, M., Bertani, G., et Flint, J. (1951) A survey of chemicals for mutagenic action on E. coli. The American Naturalist LXXXV:821:119-136.
22. OECD SIDS (2009) SIDS Dossier - 7664-38-2. SIDS Dossier. SIAM 28.
23. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (2016) Safety assessment of phosphoric acid and its salts as used in cosmetics. Final Report. Cosmetic Ingredient Review, Washington DC.
24. Hawkins, D. B., Demeter, M. J., et Barnett, T. E. (1980) Caustic ingestion: Controversies in management. A review of 214 cases. The Laryngoscope 90:98-109.
25. Markwart, J. C., et al (2019) Systematically controlled decomposition mechanism in phosphorus flame retardants by precise molecular architecture: P-O vs P-N. ACS Applied Polymer Materials 11:118-1128.
26. van der Veen, I. et de Boer, J. (2012) Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. Chemosphere 88:1119-1153.
27. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. Composites Communication 17:104-108.

Références

28. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
29. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
30. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
31. Greenwood, Norman N., et Alan Earnshaw. *Chemistry of the Elements*. 2nd ed., Butterworth-Heinemann, 1997.
32. Memento degremont, www.suezwaterhandbook.fr/procedes-et-technologies/processus-industriels-et-traitements-des-effluents-residuaire/industries-de-pates-et-papiers/autres-references. Consulté le 20 mai 2025.
33. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
34. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
35. Fang, F., et al (2020) A bio-based ionic complex with different oxidation states of phosphorus for reducing flammability and smoke release of epoxy resins. *Composites Communication* 17104-108.
36. Greenwood, Norman N., et Alan Earnshaw. *Chemistry of the Elements*. 2nd ed., Butterworth-Heinemann, 1997.
37. Boucelha, Lilya & Djebbar, Réda. (2023). Stress Oxydatif: Techniques de mise en évidence de ses causes, de ses conséquences et de son atténuation.
38. Habig, William H., Michael J. Pabst, and William B. Jakoby. "Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of Biological Chemistry* 249.22 (1974): 7130-7139.
39. PubChem. "1-Chloro-2,4-dinitrobenzene." National Center for Biotechnology Information, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Chloro-2_4-dinitrobenzene.

Références

40. Sigma-Aldrich. "Trichloroacetic acid $\geq 99.5\%$." Safety Data Sheet and Product Information, <https://www.sigmaaldrich.com>.
41. Lehninger, Albert L., David L. Nelson, and Michael M. Cox. Principles of Biochemistry. 7th ed., W.H. Freeman, 2017.
42. Bradford, Marion M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72.1-2 (1976): 248-254.
43. Maron, M. "A note on the use of Coomassie Brilliant Blue G-250 for the estimation of protein." Biochemical Journal 126.5 (1972): 1176–1177.
44. C., et al. "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids." Analytical Biochemistry 126.1 (1982): 131-138.
45. Sigma-Aldrich. "Phosphate Buffered Saline (PBS)." Product Information Sheet, <https://www.sigmaaldrich.com>.
46. Sigma-Aldrich. "Sulphosalicylic acid solution 30%." Product Information Sheet, <https://www.sigmaaldrich.com>.
47. McPherson, Alexander. Preparation and Analysis of Protein Crystals. Wiley-Liss, 1982.
48. Martell, Arthur E., and Calvin F. Furia. Stability Constants of Metal-Ion Complexes. Plenum Press, 1974.
49. PubChem. "Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)." National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/EDTA>.
50. Peters, Thomas Jr. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, 1995.
51. Sigma-Aldrich. "Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V." Product Datasheet, <https://www.sigmaaldrich.com>.
52. González, A., et al. "Hydrogen peroxide: a key oxidant in the biology of oxidative stress." Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2010.(2010)
53. PubChem. "Hydrogen Peroxide." National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-peroxide>.
54. Lide, David R., ed. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th ed., CRC Press, 2014.
55. PubChem. "Ethanol." National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>.

56. Nelson, David L., et Michael M. Cox. *Lehninger Principes de biochimie*. De Boeck Supérieur, 2013.
57. PubChem. "Sodium Chloride." National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-chloride>.
58. Skoog, Douglas A., Donald M. West, et al. *Chimie analytique*. De Boeck Université, 2007.
59. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology ("Gold Book")*. 2nd ed., <https://goldbook.iupac.org>.
60. [ÖÖ 8:58, 21.05.2025] 1 ريان منصوري/Sheehan, D. Meade, G. Foley, V.M. et Dowd, C.A. (2001) Structure, fonction et évolution des glutathion transférases : implications pour la classification des membres non mammifères d'une ancienne superfamille d'enzymes. *Journal biochimique*, 360 : 1-16.
61. Van Der Oost, R. Beyer, J. et Vermeulen, N.P.E. (2003) Bioaccumulation des poissons et biomarqueurs dans l'évaluation des risques environnementaux : une revue, *Environ. Toxicol. Pharma.* 13:57-149.
62. Sako, F. Taniguchi, N. Kobayashi, N. et Takakuwa, E. (1977) Effets des colorants alimentaires sur *Paramecium caudatum* : effets toxiques et inhibiteurs sur l'activité de la leucine aminopeptidase et de l'ac-id phosphatase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39:11-17
63. Van Der Oost, R. Beyer, J. et Vermeulen, N.P.E. (2003) Bioaccumulation des poissons et biomarqueurs dans l'évaluation des risques environnementaux : une revue, *Environ. Toxicol. Pharma.* 13:57-149.
64. Sako, F. Taniguchi, N. Kobayashi, N. et Takakuwa, E. (1977) Effets des colorants alimentaires sur *Paramecium caudatum* : effets toxiques et inhibiteurs sur l'activité de la leucine aminopeptidase et de l'ac-id phosphatase, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39:11-17
65. Apostol, S. (1973) Un bioessai de toxicité utilisant des protozoaires dans l'étude de la pollution de l'environnement aquatique et sa prévention. *Environ. Rés.* 6: 365-372.
66. Gutierrez, J.C. Martin-Gonzalez, A. Diaz, S. et Ortega, R (2003) Les ciliés comme source potentielle de biomarqueurs/biocapteurs cellulaires et moléculaires pour la pollution par les métaux lourds. *EUR. J. Pro-tistol.* 39 : 461-467.
67. Huang, Q., Zhang, C., Dong, S., Han, J., Qu, S., Xie, T., ... & Shi, Y. (2022). Asafoetida exerts neuroprotective effect on oxidative stress induced apoptosis through PI3K/Akt/GSK3B/Nrf2/HO-1 pathway. *Chinese Medicine*, 17(1), 83.

Références

68. Jin, Y.; Zhang, X. Shu, L. Chen, L. Sun, L. Qian, H. Liu, W. Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78: 846-852.
69. Madoni, P. (2000). La toxicité aiguë du nickel pour les ciliés d'eau douce. *Pollution de l'environnement* 109 : 53-9.
70. Dupont, Marc. Réponses cellulaires au stress oxydatif chez les protozoaires : Mécanismes et applications toxicologiques. Presses Universitaires de Lyon, 2022.
71. Singh, S.N., Vats, P., Kumria, M.M., Ranganathan, S., Shyam, R., Arora, M.P., Jain, C.L. et Sridharan, K. (2001) Effet de l'exposition à haute altitude (7 620 m) sur le glutathion et le métabolisme associé chez le rat. *Eur J Appl Physiol*. 84:233-237
72. Von Ossowski I., Hausner G., Loewen P. C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal of Molecular Evolution*. 1993;37(1):71–76. doi: 10.1007/BF00170464. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
73. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5e éd.). Oxford University Press.
74. Ce livre est une référence incontournable sur le stress oxydatif, les radicaux libres et les systèmes antioxydants.
75. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
76. Minogue PJ & Thomas JN 2004. Une étude dose-réponse d'a-tocophérol chez *Paramecium tetraurelia*. *Vieillesse mécanique Dev* 125 : 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2003.1>
77. Nalecz-Jawecki G, Demkowicz-Dobrzanski K, Sawicki J 1993. Le protozoaire *Spirostomum ambiguum* comme bio-indicateur hautement sensible pour une détermination rapide et facile de la qualité de l'eau. *Sci Total Environ* 134:1227-1234. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80128-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80128-7)
78. Beaumont et Cassier ; 1998 . *Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie,*
79. *Embryologie, Histologie*, 3ème édition DUNOD, pp : 123-143.
80. Samworth.M et Morgan M. 2000. Article sur la vie des étangs : *Paramecium* Article MISCAP : *Paramecie*. Déc. 95 Mis à jour par l'éditeur MISCAP en avril 2000.
81. Alberts, B. et al. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). Garland Science.
82. Voir chapitre sur la respiration cellulaire et les protozoaires.
83. Boucelha, A., et Dje bbar, A. Toxicité des espèces réactives de l'oxygène et stress oxydatif. 2023.

Références

84. Habashi, Fathi. *Phosphoric Acid: Purification, Uses, Technology, and Economics*. Marcel Dekker, 1985.
85. Benbouzid, H., et al. Étude de la toxicité des polluants sur *Paramecium aurelia*. 2013.
86. Burroughs, J. "Effets cellulaires des agents cancérogènes." *Journal de Biologie Cellulaire*, 1962.
87. Epstein, S. S. "Carcinogenic Agents and Cellular Effects." *Cancer Research*, 1962.
88. Laborde, A., et al. "Effets des radiations sur les cellules vivantes." *Revue de Radiobiologie*, 1965.
89. Planel, H., et al. Influence des radiations naturelles sur les micro-organismes. 1965.
90. Wang, H. "Effets de la fumée de tabac sur les cellules." *Revue Médicale de Chine*, 1963.
91. Weiss, B. "Tabac et mutations cellulaires." *Toxicologie Cellulaire*, 1965. Fabrini, R., et al. "Glutathione Transferases and Xenobiotic Metabolism: Structural and Functional Aspects." *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010.
92. Bocedi, A., et al. "The Role of Phase II Enzymes in Detoxification Pathways." *Toxicology Reports*, 2016.
93. Livingston, D. P., et al. "Role des catalases dans la protection contre les ERO." *Revue de Biochimie Cellulaire*, 1993.
94. Livingston, D. P., et al. Role des catalases dans la protection contre le stress oxydatif chez les cellules. 1993.
95. Marchese, M., et al. "Benthic macroinvertebrates and their role in the assessment of aquatic environments." *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 40, no. 2, 1996, pp. 105–124.
96. Bennett, J. W., et al. "Microorganisms as model systems for evaluating environmental toxicants." *Toxicology*, vol. 74, no. 1, 1992, pp. 3–30.
97. Giesy, J. P., et al. "Use of invertebrates to detect and assess the effects of environmental stressors." *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 8, no. 5, 1989, pp. 381–390.
98. Kosmala, M., et al. "The importance of microorganisms in aquatic ecosystems." *Aquatic Ecology*, vol. 33, no. 3, 1999, pp. 243–252.
99. Taylor, F. J. R., et al. "Culturing protists: a practical guide." *Phycologia*, vol. 30, no. 2, 1991, pp. 154–164.

Références

100. McPherson, D. W., et al. "Toxicological evaluation of model organisms in aquatic bioassays." *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 46, no. 2, 2000, pp. 187–195.
101. Van Houten, Judith. "Paramecium as a modern model system for cytotoxicity and cellular behavior studies." *Cell Biology Reports*, vol. 12, 2023, pp. 85–99.
102. Görtz, Hans-Dieter. "Paramecium as a genetic model in biology." *International Review of Cytology*, vol. 113, 1988, pp. 69–141.
103. Lynn, Denis H. *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*. 3rd ed., Springer, 2008.
104. Naitoh, Yutaka, et Kunio Eckert. "Physiology and behavior of Paramecium: membrane properties and ionic control." *Journal of Experimental Biology*, vol. 59, no. 1, 1973, pp. 53–65.
105. Dziezak, J. D. "Phosphoric Acid and Phosphates." *Food Technology*, vol. 70, no. 6, 2016, pp. 60–69.
106. Maira, R. B., et al. "Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid and other endodontic irrigants." *Journal of Applied Oral Science*, vol. 23, no. 5, 2015, pp. 541–547. DOI:10.1590/1678-775720150244.
107. Deregnaucourt, C., Keller, A. M., & Capdeville, Y. (1988). A new class of Paramecium surface proteins anchored in the plasma membrane by a glycosylinositol phospholipid. *Biochemical Journal*, 253(2), 395–400.
108. Hauser, K., Haynes, W. J., Kung, C., Plattner, H., & Kissmehl, R. (2000). Expression of the green fluorescent protein in Paramecium tetraurelia. *European Journal of Cell Biology*, 79(2), 144–149.
109. Cronkite, D. L. (1985). Role of protein synthesis and ninhydrin-positive substances in acclimation of Paramecium tetraurelia to high NaCl. *Journal of Experimental Zoology*, 233(1), 47–54.
110. Maira, F. C., et al. (2015). Antimicrobial activity of phosphoric acid in endodontics.

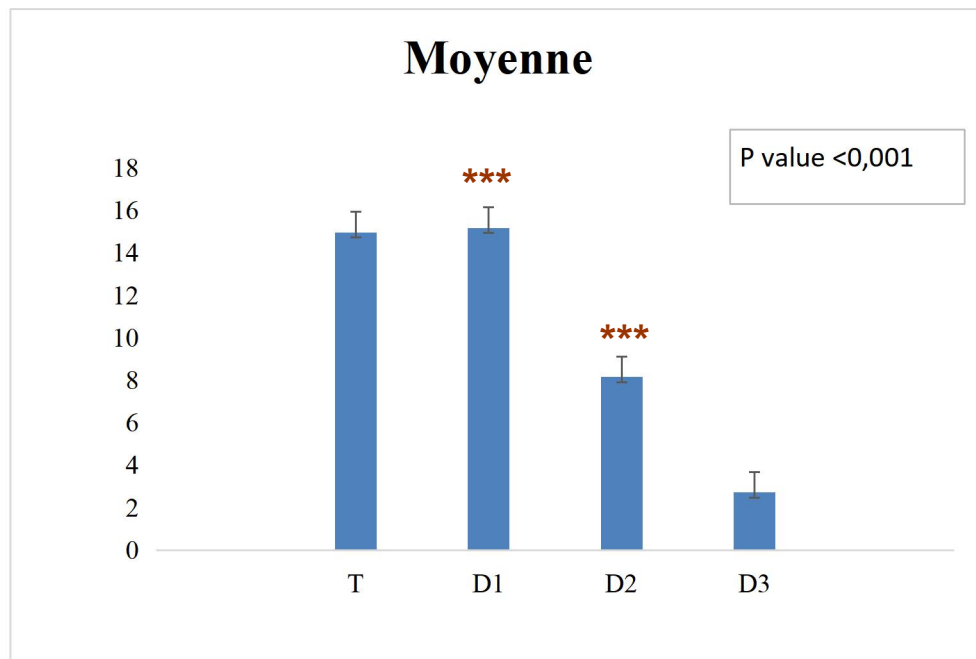
Annex

Annex

1. Méthode

1) Protéines totales

ANOVA						
						VAR00001
	Somme des carrés	df	Carré moyen	F	Sig.	
Entre groupes	323.387	3	107.796	81.866	0.000	
Intra-groupes	10.534	8	1.317			
Total	333.921	11				



Annex

Comparaisons multiples :						
Variable dépendante:						
Différence significative de Tukey						
(I) Groupe		Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	95% Intervalle de confiance	
					Borne inférieure	Borne supérieure
T	D1	-0.2219775	0.9369206	0.995	-3.222327	2.778372
	D2	6,8130763*	0.9369206	0.000	3.812727	9.813426
	D3	12,2508339*	0.9369206	0.000	9.250484	15.251183
D1	T	0.2219775	0.9369206	0.995	-2.778372	3.222327
	D2	7,0350538*	0.9369206	0.000	4.034704	10.035403
	D3	12,4728114*	0.9369206	0.000	9.472462	15.473161
D2	T	-6,8130763*	0.9369206	0.000	-9.813426	-3.812727
	D1	-7,0350538*	0.9369206	0.000	-10.035403	-4.034704
	D3	5,4377576*	0.9369206	0.002	2.437408	8.438107
D3	T	-12,2508339*	0.9369206	0.000	-15.251183	-9.250484
	D1	-12,4728114*	0.9369206	0.000	-15.473161	-9.472462
	D2	-5,4377576*	0.9369206	0.002	-8.438107	-2.437408

*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.

2) Activité CAT . ANOVA

RAPPORT DÉTAILLÉ					
Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance	
d3	3	117.0222488	39.00741627	1013.72371	
d2	3	226.6837323	75.5612441	0.14166933	
D1	3	503.2336003	167.7445334	648.558762	
T	3	2005.566172	668.5220573	35833.2282	
ANALYSE DE VARIANCE					
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité
Entre Groupes	768807.3932	3	256269.1311	27.3385435	0.000147965
A l'intérieur des groupes	74991.30477	8	9373.913097		

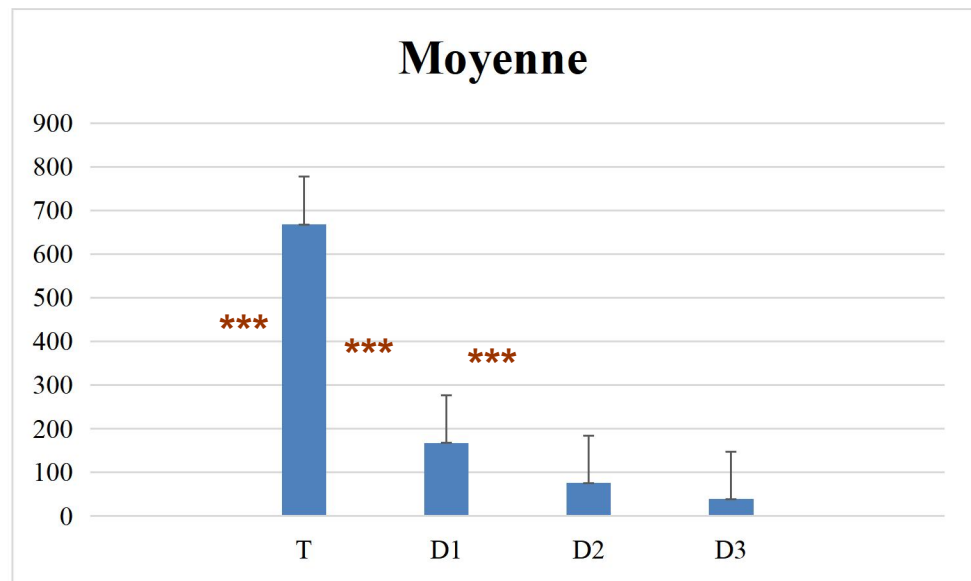
Annex

Total	843798.698	11			

\T

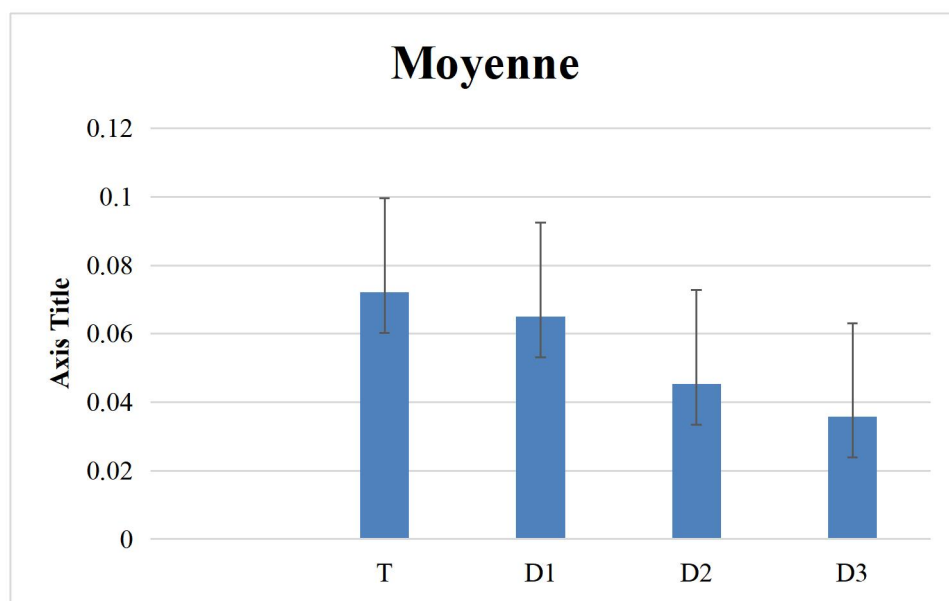
ANOVA					
value					
	Somme des carrés	df	Carré moyen	F	Sig.
Entre groupes	768807.393	3	256269.131	27.339	0.000
Intra-groupes	74991.305	8	9373.913		
Total	843798.698	11			

Comparaisons multiples :						
Variable dépendante:	value					
Différence significative de Tukey						
(I) Groupe		Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	95% Intervalle de confiance	
					Borne inférieure	Borne supérieure
T	D1	500,77752*	79.05236	0.001	247.6240	753.9310
	D2	592,96081*	79.05236	0.000	339.8073	846.1143
	D3	629,51464*	79.05236	0.000	376.3612	882.6681
D1	T	-500,77752*	79.05236	0.001	-753.9310	-247.6240
	D2	92.18329	79.05236	0.663	-160.9702	345.3368
	D3	128.73712	79.05236	0.416	-124.4164	381.8906
D2	T	-592,96081*	79.05236	0.000	-846.1143	-339.8073
	D1	-92.18329	79.05236	0.663	-345.3368	160.9702
	D3	36.55383	79.05236	0.965	-216.5997	289.7073
D3	T	-629,51464*	79.05236	0.000	-882.6681	-376.3612
	D1	-128.73712	79.05236	0.416	-381.8906	124.4164
	D2	-36.55383	79.05236	0.965	-289.7073	216.5997
*. La différence moyenne est significative au niveau 0.05.						



2) GSH ; ANOVA

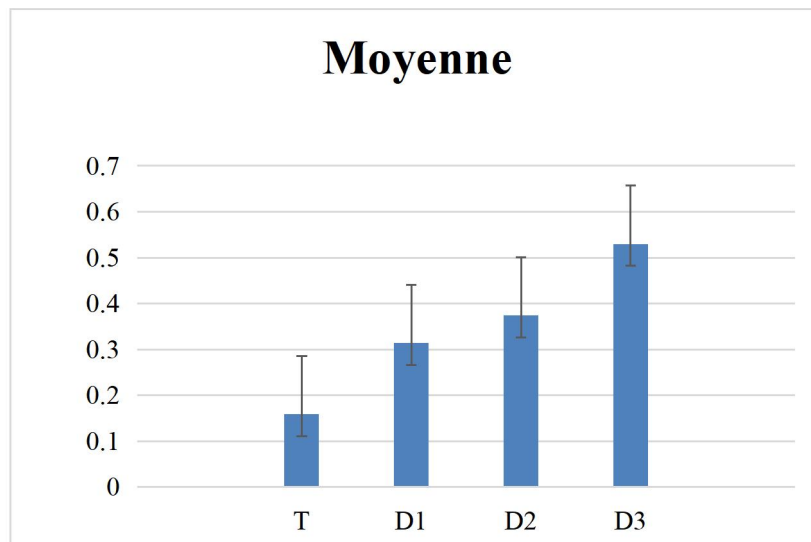
Analyse de variance: un facteur					
RAPPORT DÉTAILLÉ					
<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>	
D3	3	0.107067111	0.035689037	0.00042463	
D2	3	0.135858628	0.045286209	0.000646745	
D1	3	0.195057328	0.065019109	0.00225799	
T	3	0.216255765	0.072085255	0.001832314	
ANALYSE DE VARIANCE					
<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Entre Groupes	0.002575913	3	0.000858638	0.665394021	0.596407741
A l'intérieur des groupes	0.010323357	8	0.00129042		
Total	0.01289927	11			



Annex

Analyse de variance: un facteur					
RAPPORT DÉTAILLÉ					
<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>	
D3	3	1.5889	0.5296337	0.048794	
D2	3	1.12134	0.3737792	0.027558	
D1	3	0.94135	0.3137836	0.042315	
T	3	0.47582	0.1586079	0.006667	
ANALYSE DE VARIANCE					
<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Entre Groupes	0.2118897	3	0.0706299	2.254113	0.15928611
A l'intérieur des groupes	0.2506704	8	0.0313338		
Total	0.4625601	11			
			P>0,05	N.SIG	

3) GST;ANOVA



3. Les matériels

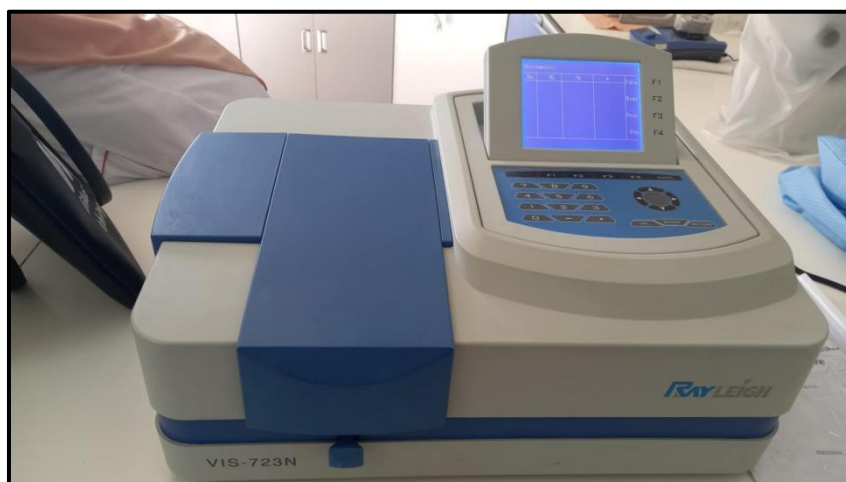


Figure 1 : Spectrophotomètre UV-visible (JENWAY 6702)



Figure 2 : Étuve 25.5°C



Figure 3 : Plaque agitatrice



Figure 4 : Centrifugeuse.

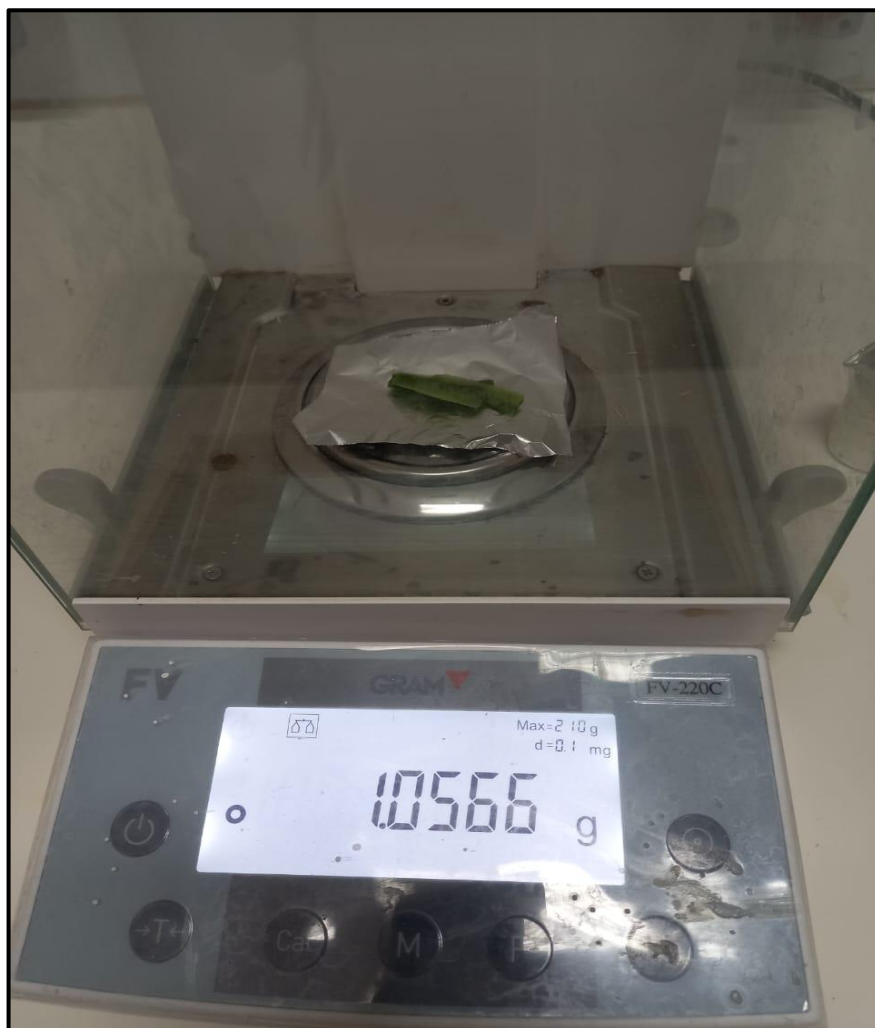


Figure 5 : Balance de précision