



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الشهيد خضر الوادي

Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N °d'ordre..... Département de biologie قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

N ° de série.....

cellulaire et moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Filière : Sciences biologiques

Option : Toxicologie

THEME

**Effet de l'exposition à l'extrait gomme résine de
Ferula assa-foetida sur quelques bio marqueurs de
stress (GSH-GST) chez *Paramecium* sp**

Présentées Par :

M^{elle}HABITA Amina

M^{elle}MESSAI AHMED Aya

M^{elle}TRIA Meriem

Devant le jury composé de :

Président : Mr Dr.GHANIA Ahmed

Examineurs : Pr.TOUMI Ikram

Promoteur : Dr.OTMANI Hadjer

Grade : université

M.C.B, Université d'ElOued

M.A.A, Université d'ElOued.

M.C.B, Université d'ElOued

Année universitaire 2023/2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَقُلْ اعْلَمُوا

فِي سِيْرَةِ اللَّهِ عِندَ كُتُبِهِ وَرُسُلِهِ وَالْمُؤْمِنُونَ

سورة التوبة: 105

REMERCIEMENT

Avant tout, nous voudrions remercier Dieu tout-puissant qui nous a donné l'opportunité, la patience et la force pendant les moments les plus difficiles et la volonté de mener à bien ce travail de recherche.

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement. C'est un grand honneur d'avoir **Mme Otmani Hadjer** comme encadreur de notre mémoire, nous avons à vous tous nos remerciements et notre appréciation pour votre patience et gentillesse, votre aide et soutien durant notre recherche.*

*Nous remercions sincèrement le président du mémoire **GHLANIA Ahmed** Pour nous avoir fait l'honneur de présider ce travail.*

*Au membre de jury professeur **TOUMI Ikram** a accepté de faire partie de jury et de consacrer son temps pour examiner ce travail.*

*Nous avons un grand remerciement pour **Dr.Khelef Yahia** pour son aide.*

*Un grand merci à **Melle Goubi Sanaa** responsable des laboratoires de la faculté de Biologie d'El-Oued pour sa disponibilité*

*Nous adressons également nos remerciements à tout le personnel du laboratoire du Collège des sciences naturelles et de la vie, **Latifa, Omar et Afaf** et **Bouchra** pour leur aide inestimable.*

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin la réalisation de ce travail

DÉDICACE

وَأَخِرُ دَعْوَتُهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Merci à Dieu pour m'a donnée la patience pour terminer ce chemin et pour ma succès permanent.

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

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

A mes sœurs et mes frères mon soutien et mon épaule sur lesquels je me suis appuyé

A mes chères amies les bougies qui éclairent toujours mon chemin

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

Que **Allah** les garde et les protège.

Habita.A

DÉDICACE

وقالوا الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله

A Allah le tout puissant Qui m'a inspiré et Qui m'a guidé dans le bon chemin, Louanges et remerciements Pour votre clémence et miséricorde.

A mes parents

A mon cher père, pour m'avoir appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler.

A ma chère mère, pour son soutien et ses sacrifices.

Aucune dédicace ne saurait exprimer la reconnaissance, le respect et l'amour que je vous porte.

A ma famille

Pour le soutien et le dévouement dont vous m'avez fait preuve le long de mes études et au cours de la réalisation de ce travail.

A mes ami(e)s

A toute personne qui m'a soutenu de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Messai.A

DÉDICACE

وَمَا آخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Louange à Dieu, amour, remerciement et gratitude, grâce auxquels je suis ici aujourd'hui face à un rêve tant attendu qui est devenu une réalité dont je suis fier.

A mon cher père, l'homme de ma vie. Je te remercie pour la confiance que tu m'accordes. Merci d'être toujours prêt à me donner sans mesure et sans limites.

A ma chère maman, merci de m'avoir soutenu, de m'avoir fait confiance et de m'avoir encouragé tout au long de ces années universitaires. Vous m'avez donné tellement d'amour qu'il suffit de nourrir la terre entière. Je vous remercie du fond du cœur pour l'éducation, les principes et les valeurs que vous m'avez envoyés.

J'espère que j'ai pu vous rendre fier de moi.

Vous êtes les personnes les plus chères au monde et j'espère pouvoir vous rendre un peu de votre amour et de votre générosité.

A mes chers frères et sœurs et mes chères amies Aya et Amina

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Sommaire

Liste des Figures et Tableaux

Liste des Abréviations

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction Générale 1

Chapitre I: Synthèse Bibliographique

1. L'asafoetida	4
1.1. Généralité sur <i>Ferula assa-foetida</i>	4
1.2. Dénomination Internationale	5
1.3. Classification taxonomique de la plante <i>Ferula assa-foetida</i>	6
1.4. Composition chimique	6
1.5. Activité Biologique	7
1.6. Effet toxique	7
2. La paramécie	8
2.1. La présentation de paramécie	8
2.2. Classification	10
2.3. Mouvement	11
2.4. Biologie et Morphologie	11
2.5. Respiration	12
2.6. Alimentation	12
2.7. Reproduction et Cycle de vie	13
2.7.1. Multiplication végétative	13
2.7.2. Reproduction sexuée	13
Conjugaison	15
2.8. Dimorphisme nucléaire	15
2.9. Choix de <i>Paramecium sp</i> comme modèle biologique	16
3.1. Stress oxydatif	17
3.2. Biomarqueurs	17

3.2.1. Biomarqueurs enzymatiques (GST)	17
3.2.1. Biomarqueurs non enzymatiques (GSH).....	18

Chapitre II:Partie Expérimental

1. Matériels et Méthodes	21
1.1. Matériels	21
1.1.1. Matériels Biologiques	21
A.Matériel Animal	21
B. Matériel végétal	22
1.2. Méthodes	22
1.2.1. Préparation de la culture de paramécie	22
1.2.2. Préparation de milieu de culture	23
1.2.3. Impact du milieu de culture sur la croissance de la paramécie	24
1.2.4. Protocole de traitement de l'asafoetida	24
1.2.5. Dosage des protéines	25
1.2.6. Dosage du glutathion (GSH)	25
1.2.7. Dosage activité enzymatique de la glutathion s-transférase (GST)	27
1.2.8. Etude statistique	30
2. Résultats	32
2.1 Effet du l'asafoetida sur l'évolution du taux de protéines totales chez les paramécies	32
2.2 Effets d'asafoetida sur les biomarqueurs du stress oxydant chez <i>Paramecium sp</i>	33
2.2.1 Effets sur l'évolution du taux de glutathion (GSH)	33
2.2.2 Effets sur l'évolution de l'activité glutathion s-transférase (GST)	34
3. Discussion	35
Conclusion Générale	39
Perspectives	40
RéférencesBibliographiques	42
Annexe	54

LISTE DES FIGURES

		<i>Page</i>
Figure 1	La gomme résine de <i>F.asafoetida</i>	4
Figure 2	Arbre Asafoetida	5
Figure 3	Structure d'une paramécie sous microscope	9
Figure 4	Photo prises au microscope à balayage permettant de voir les différences d'organisation des cils des organismes ciliés	10
Figure 5	Morphologie générale d'un spécimen de <i>Paramecium</i> du groupe <i>Aurelia</i>	12
Figure 6	Phases végétative et sexuelle du cycle de vie du <i>Paramecium</i>	14
Figure 7	Le cycle sexuel de <i>Paramecium</i> « la conjugaison »	15
Figure 8	<i>Paramecium sp</i> au microscope	21
Figure 9	La gomme résine d'Asafoetida (<i>Ferula assa-foetida</i>)	22
Figure 10	Préparation de la culture de paramécie	23
Figure 11	Schéma explique une méthode de préparation de milieu de culture	24
Figure 12	Protocole de traitement des paramécies avec l'assa-foetida	25
Figure 13	Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion (GSH)	26
Figure 14	Un schéma explique le protocole de dosage du glutathion S-transférase (GST)	28
Figure 15	Evolution du taux des protéines totales chez <i>Paramecium Sp</i> en présence des concentrations croissantes gomme résine de <i>Ferula assa-foetida</i>	32
Figure 16	Variation du taux de GSH chez <i>Paramecium Sp</i> exposée aux concentrations croissantes d'asafoetida	33
Figure 17	Evolution de l'activité GST chez <i>Paramecium Sp</i> en fonction des concentrations croissantes d'asafoetida	34

LISTE DES TABLEAUX

		<i>Page</i>
<i>Tableau 1</i>	Dénomination international d'asafoetida	5
<i>Tableau 2</i>	Classification <i>F.asafoetida</i>	6
<i>Tableau 3</i>	Activité biologique de <i>ferula assa-foetida</i>	7
<i>Tableau 4</i>	Classification de <i>Paramecium sp</i>	10

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ASS : Acide sulfosalicylique

BBC : Bleu brillant de Coomassie.

BSA : l'Albumine de sérum de bœuf.

CDNB :1-Chloro, 2,4-Dinitrobenzène

DTNB : Acide 5,5''Dithiodis-2-Nitrobenzoïque.

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique.

GCL : Glutamate cystéine ligase

GCLC : Glutamate cystéine ligase catalytique

GCLM : Glutamate cystéine ligase modifiante

GS : Glutathion synthétase

GSH : Glutathion.

GST : Glutathion-S-transférases.

MAC : Macronoyaux

MIC : Micronoyaux

PF : Poids frais

PH : Potentiel Hydrogène

ROS : Espèces réactives oxygénées

SPSS: Statistical package for social sciences

UV-VIS : Ultra-violet visible

Résumé

Les extraits naturels comme la gomme issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de la gomme de *ferula assa-foetida* qui est l'une des plantes asiatiques les plus utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la gomme de asafoetida avec différentes concentrations (0,5.1.2et 3 g/L) pendant 3 heures, sur un modèle cellulaire, ciliés d'eau douce : *Paramecium sp*, considéré comme un indicateur biologique bien adapté aux études toxicologiques. Les résultats obtenus ont montré une évolution du taux de la principale molécule biologique (les protéines totales), Nous observons une augmentation très hautement significative du taux des protéines totales dans la dernière concentration (3g/L) avec 2,34µg/mg de poids frais (PF) par rapport aux témoins 1,34µg/mg de PF chez les paramécies. Aussi, il a été noté que les biomarqueurs du stress oxydatif, lorsqu'ils sont exposés à différentes concentrations d'asafoetida, entraînent des perturbations statistiquement significatives par l'induction d'activités enzymatiques et non enzymatiques vitales (GSH, GST) dans les organismes traités. D'après nos résultats nous constatons une augmentation très hautement significative du taux de GSH dans la première concentration (0,5g/L) avec 46,3µmol/mg protéines comparées au témoin avec 24,2 µmol/mg protéines, en revanche nous constatons une déplétion très hautement significative de l'activité GST dans la deuxième concentration (1g/L) avec 85,4 µmol/mg protéines par rapport au témoin 1264,2 µmol/mg protéines chez *Paramecium sp* traitées. Sur la base de ces résultats, nous concluons qu'après le traitement par l'asafoetida, il y avait des perturbations métaboliques dans la quantité de protéines totales et dans l'activité des biomarqueurs enzymatiques et non enzymatiques par rapport aux témoins.

Mots clés : L'asafoetida, *Paramecium sp*, biomarqueurs, stress oxydatif.

Abstract

Natural extracts like gum from plants contain a variety of biologically active molecules. In this context we attempted to evaluate the antioxidant activity of *ferula assa-foetida* gum which is one of the Asian plants most used in traditional Algerian medicine. In this study, we studied the effect of asafoetida gum with different concentrations (0,5.1.2et 3 g) for 3 hours, on a cellular model, fresh water ciliates: *Paramecium sp*, considered as a biological indicator well suited to toxicological studies.

The results obtained showed an evolution in the level of the main biological molecule (total proteins). We observed a very highly significant increase in the level of total proteins in the last concentration (3g/L) with 2.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of fresh weight (PF) compared to controls 1.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PF in paramecia. Also, it was noted that biomarker of oxidative stress, when exposed to different concentrations of asafoetida, lead to statistically significant disturbances through the induction of vital enzymatic and non-enzymatic activities (GSH, GST) in organisms. treated. According to our results we note a very highly significant increase in the GSH level in the first concentration (0.5g/L) with 46.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteins compared to the control with 24.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteins, on the other hand we note a very highly significant depletion of GST activity in the second concentration (1g/L) with 85.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteins compared to the control 1264.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteins in *Paramecium sp* treated.

Based on these results, we conclude that after asafoetida treatment, there were metabolic disturbances in the amount of total protein and in the activity of enzymatic and non-enzymatic biomarkers compared to controls.

Keywords: Asafoetida, *Paramecium sp*, biomarkers, oxidative stress.

المخلص

المستخلصات الطبيعية مثل الصمغ المستخرج من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيًا. في هذا السياق، حاولنا تقييم النشاط المضاد للأوكسدة لصمغ الـ "*Ferula assa-foetida*"، وهي واحدة من النباتات الأسيوية الأكثر استخدامًا في الطب التقليدي الجزائري. في هذه الدراسة، قمنا بدراسة تأثير صمغ الـ "*Ferula assa-foetida*" بتركيزات مختلفة (2.1,0,5 و3 غ) لمدة 3 ساعات على نموذج خلوي، وهو الكائن الحي "*Paramecium sp*" الذي يعتبر مؤشرًا بيولوجيًا مناسبًا للدراسات السمية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها تطور معدل الجزيء البيولوجي الرئيسي (البروتينات الكلية)، حيث لاحظنا زيادة كبيرة جدًا في معدل البروتينات الكلية في التركيز الأخير (3 غ/10 مل) مع 2.34 ميكروجرام/ملغ من الوزن الطازج PF مقارنة بالشواهد 1.34 ميكروجرام/ملغ من البروتينات لدى الكائنات الحية "*Paramecium sp*" كما تم ملاحظة أن المؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي عند تعرضها لتركيزات مختلفة من الـ "*Ferula assa-foetida*" تؤدي إلى اضطرابات ذات دلالة إحصائية من خلال تحفيز الأنشطة الأنزيمية وغير الأنزيمية الحيوية (GST-GSH)، في الكائنات المعالجة. وفقًا لنتائجنا، نلاحظ زيادة كبيرة جدًا في معدل الـ "GSH" في التركيز الأول (0.5 غ/ل) مع 46.3 ميكرو مول/ملغ بروتين مقارنة بالشواهد 24.2 ميكرو مول/ملغ بروتين. بالمقابل، نلاحظ انخفاضًا كبيرًا جدًا في نشاط الـ "GST" في التركيز الثاني (1 غ/ل) مع 85.4 ميكرو مول/ملغ بروتين مقارنة بالشواهد 1264.2 ميكرو مول/ملغ بروتين لدى "*Paramecium sp*" المعالجة. استنادًا إلى هذه النتائج، نستنتج أنه بعد المعالجة بالـ "*Ferula assa-foetida*" حدثت اضطرابات أيضية في كمية البروتينات الكلية وفي نشاط المؤشرات الحيوية الأنزيمية وغير الأنزيمية مقارنة بالشواهد.

الكلمات المفتاحية: الحلتيت، *Paramecium sp*، المؤشرات الحيوية، الإجهاد التأكسدي.

Introduction
Générale

Aujourd'hui, la phytothérapie reste le système de soins de santé primaire pour environ 80% de la population mondiale. En particulier dans les pays en développement (Kunle.O.Fet *et al.*,2012). Il y a eu aussi une soudaine augmentation de l'utilisation des herbes comme médicaments sur ordonnance dans les pays développés comme la France et l'Allemagne (Wachtel-Galor.*Set al.*,2011, Edzard.E,2005). Cependant, il est à craindre que tous les médicaments à base de plantes ne soient pas sûrs, car rapporté (Edzard.E,2005). Au fil des années, le recours à la médecine traditionnelle nous a apporté de précieuses formules sur la sélection, la préparation et l'application de plantes médicinales. La même méthode rigoureuse, cliniquement et scientifiquement, doit être mise en œuvre pour vérifier l'efficacité et la sécurité des produits curatifs, pour être une alternative viable à la médecine occidentale (Pal.S.Ket *et al.*,2003).

L'utilisation des plantes comme médicaments remonte à 60 000 ans selon les anciens récits babyloniens. En Égypte et en Chine, les documents écrits sur la phytothérapie remontent à environ 5 000 ans, en Asie Mineure et en Grèce, à 2 500 ans. (Qazi.M.Aet *et al.*,2016)

Les produits de phytothérapie sont depuis longtemps sûrs (Moreira.D.Let *et al.*,2014), mais l'utilisation abusive de ces médicaments peuvent avoir des effets secondaires dus à des constituants toxiques (George.P,2011) . Dans certains pays, l'évaluation toxicologique des plantes médicinales et des produits associés n'est pas utilisée avant de les administrer sur le marché (Ekor M,2014). La phytothérapie d'une seule plante peut contenir des centaines de constituants et les produits mélangés peuvent en contenir plusieurs fois ce nombre. Le temps nécessaire pour isoler chaque ingrédient actif de chaque herbe serait formidable (WHO,2005)

L'asafoetida est utilisée comme épice et comme phytomédecine populaire depuis des siècles. L'asafoetida a une odeur sulfureuse caractéristique et un goût amer. De plus, les Népalais en consomment régulièrement dans leur alimentation quotidienne, (Eigneret Scholz, 1990, Bandyopadhyay *et al.*, 2006).

À ce jour, aucune étude n'a porté sur la toxicité potentielle des asafoetida dans un rapport de cas (Kelly *et al.*, 1984). Il est nécessaire d'étudier la toxicité aiguë, la toxicité subaiguë, la toxicité chronique et le profil de sécurité de l'asafoetida. Il semble qu'il reste encore un grand nombre d'investigations inachevées, notamment des essais cliniques sur l'asafetida (Iranshahy.Met *et al.*,2011).

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.Set *al.*,2021)

Le bioindicateur *Paramecium sp* caractérisé par un cycle de vie court, une multiplication rapide et un comportement normal qui peut être affecté par la présence de polluants. (Benbouzid,Het *al.*, 2015)

L'objectif de notre travail a été entrepris afin de réaliser une étude prospective des effets de l'exposition à la résine-gomme-oléorésine obtenue de *ferula assa-foetida* sur les protéines totales et sur quelques biomarqueurs de stress (GSH-GST) sur un modèle biologique bioindicateur qui est la *Paramecium sp*.

Chapitre I

Synthèse

Bibliographique

1. L'Asafoetida

1.1. Généralité sur *Ferula assa-foetida*

L'Asafoetida est une oléo-gomme-résine obtenue à partir des exsudats des racines de la plante médicinale endémique iranienne, *Ferula assa-foetida*. Cette espèce (*Ferula assa-foetida*) est souvent considérée comme la principale source d'asafoetida, bien que d'autres espèces de *Ferula*, telles que *Ferula foetida*, *Ferula rubricaulis*, *Ferula rigidula*, *Ferula alliacea* et *Ferula narthex*, soient également des sources d'asafoetida (Rajanikanth *et al.*, 1984, Takeoka, 2001, Evans, 2002). *Ferula assa-foetida* pousse à l'état sauvage dans les montagnes du centre et du sud de l'Iran. L'asafoetida oléo-gomme-résine est appelée « Anghouzeh », « Khorakoma » et « Anguzakoma » en Iran. La plante, qui appartient à la famille des Apiacées, est une plante herbacée vivace à odeur désagréable qui atteint environ 2 m de hauteur. L'oléo-gomme-résine est souvent obtenue par incision des racines ou ablation des tiges. Les exsudats durcis (oléo-gomme-résine) sont ensuite collectés et conditionnés pour l'exportation. Asafoetida se présente sous deux formes principales : les larmes et la masse. La masse est la forme d'asafoetida la plus courante sur le marché (Tyler *et al.*, 1976, Evans, 2002).

En médecine traditionnelle, la plante est utilisée pour le traitement de différentes maladies, telles que l'asthme, l'épilepsie, les maux d'estomac, les flatulences, les parasites intestinaux, la digestion difficile et la grippe (Al-Jafari, Vila, Freixa, Costa et Canigüeral, 2012 ; Ross, 2005 ; Zellagui, Gherrafet Rhouati, 2012).



Figure 01 : La gomme résine de *F.assafoetida* (Kavoosi, G., & Rowshan, V, 2013)



Figure 02 : Arbre Asafoetida(Shahrajabian, M.*et al.*, 2021)

1.2.Dénomination internationale

Tableau01 : Dénomination international:(Iranshahy, M., &Iranshahi, M., 2011).

Langue	Nom commun
Arabe	Shajarat-al-Heltit
Français	Ase-fétide
Anglais	Asafetida

1.3. Classification taxonomique de la plante *Ferula assa-foetida*

Tableau02 : Classification F.asafoetida (KareparambanJA, *et al.*, 2012)

Rang taxonomique	Taxon
Royaume	Plantes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Famille	Omellifères
Genre	Férula
Espèces	Assafoetida

1.4. Composition chimique

Assa-foetida contient 25% d'extrait de gomme (glucose, galactose, l-arabinose, rhamnose et acide glucuronique), résine 40–64 % (esters d'acide férulique, acide férulique libre, coumarine dérivés) et huiles volatiles 3 à 17 % (contenant du soufre composés et divers monoterpènes) (Kajimoto *et al.*, 1989).

1.5. Activité biologique

Tableau 03 : Activité biologique de *ferula assa-foetida*

Activité biologique	Référence
Antioxydant	Dehpour.AA <i>et al.</i> , 2009. Kavosi. <i>Get al.</i> , 2013
Antimicrobien	Shrivastava V <i>et al.</i> , 2012. Divya K, <i>et al.</i> , 2014. Padhy. <i>Set al.</i> , 2014. Patil. SD <i>et al.</i> , 2015. Bhatnager. R, 2015
Antiviral	Mahendra. P <i>et Bisht.</i> S, 2012
Antifongique	Kamble. VA <i>et Patil.</i> SD, 2008. Rani. A <i>et Jain.</i> S, Dureja. P, 2009. Mostafa. <i>Zet al.</i> , 2013
Chimio préventif du cancer	Saleem. M, <i>et al.</i> , 2001
Antidiabétique	Abu-Zaiton. AS, 2010
Anti carcinogène	Saleem. M, <i>et al.</i> , 2001. Mallikarjuna. GU, <i>et al.</i> , 2003
Antispasmodique et hypotenseur	Fatehi. <i>Met al.</i> , 2004

1.6. Effet toxique

La consommation d'asafoetida présente également certains effets secondaires. Lorsqu'il est pris cru et en trop grande quantité. Ces médicaments peuvent également affecter la périodicité du cycle menstruel. Lors d'une étude en laboratoire menée auprès de nourrissons traités par l'asafoetida, un effet oxydant de l'asafoetida sur le fœtus a été mis en évidence. (Kelly *et coll.* 1984).

Cependant, un cas d'une méthémoglobinémie a été rapportée après l'administration d'asafoetida chez un nourrisson de sexe masculin noir âgé de 5 semaines. Le nourrisson a été admis à l'hôpital 6 heures après le début de la tachypnée, des grognements et cyanose. Le traitement consistait en du bleu de méthylène intraveineux et le nourrisson s'est rétabli (Kelly *et al.*, 1984). La prise de doses plus importantes peut entraîner un gonflement des lèvres, des troubles digestifs tels que des flatulences et diarrhée, inconfort et maux de tête. Gonflement des organes génitaux a été observé suite à une administration externe sur l'abdomen. Il n'est pas recommandé de l'utiliser pendant la grossesse (Emami *et al.*, 2010).

Toxicité aiguë : d'après (Bagheri.S.M., *et al.*,2014) (Bagheri, S., *et al* 2015) Trente rats Wistar mâles ont été élevés et maintenus dans l'unité animalière de la faculté de médecine sous une température contrôlée de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 12 h de lumière : 12 h d'obscurité. Les animaux étaient hébergés dans des cages en plastique et de la nourriture et de l'eau étaient mises à disposition à volonté. Les rats ont été divisés en cinq groupes. Un groupe a reçu une solution saline comme contrôle et les groupes expérimentaux ont été traités par asafoetida (25, 50, 100 et 200 mg/kg) par voie orale tous les jours pendant 6 semaines. L'approbation éthique de cette étude a été obtenue auprès du comité d'éthique de l'Université des sciences médicales Shahid Sadoghi Iran. L'asafoetida aux concentrations utilisées n'a montré aucun effet toxique à court ou à long terme. Ceci a été mis en évidence par l'absence de tremblements, de paralysie, de perte de poids et de changements de comportement autonome par rapport au groupe témoin. De plus, il n'y a eu aucune mortalité chez les animaux traités pendant 6 semaines d'observation. À la fin des expériences, les rats étudiés ont été observés pour détecter des symptômes de toxicité à court et à long terme et enfin la mortalité a été enregistrée. Ensuite, les animaux ont été gardés sous observation jusqu'à 10 jours pour mettre en œuvre les changements de comportement (tremblements, paralysie), la perte de poids et la mortalité.

2. La paramécie

2.1.La présentation de paramécie

Les paramécies sont des organismes unicellulaires (Protozoaires), de forme oblongue, dont le corps uniformément couvert de cils (ciliés, holotriches), leurs dimensions sont, selon les espèces prises en considération, comprises entre 70 et 350 μ . Les représentants du genre *Paramecium* sont parmi les plus fréquentes des Protozoaires. Ils sont très abondants dans les eaux contenant des débris végétaux ou dans les infusions de foin (infusoires) car les bactéries dont ils se nourrissent pullulent à la surface des végétaux en décomposition. Le genre *Paramecium* inclut environ 15 espèces, actuellement enregistrées, mais moins de 10 peuvent être considérés comme *Paramecium* vrai. Pour chaque espèce il est possible de définir, en ce qui concerne la taille, un polygone de distribution spécifique et de mettre en évidence des différences géographiques ou d'origine nutritionnelle ; ces dernières différences sont fugaces et non transmissibles. Les autres sont si mal définies qu'elles ne peuvent être considérées comme appartenant au genre *Paramecium*. (Benbouzid.H.,2012)

La paramécie vit librement dans les eaux douces et se nourrit de bactéries. Durant sa vie végétative elle se divise par fission binaire, les micronoyaux effectuant une mitose alors que le macronoyau se divise sans fuseau mitotique et de manière non équitable. Les deux noyaux (MIC et MAC) de la paramécie sont très différents, ils n'assurent pas les mêmes fonctions et ne contiennent pas le même génome. Le MIC n'entreprend que peu ou pas de processus durant la vie végétative rendant son étude assez difficile. De plus sa petite taille ainsi que sa faible quantité d'ADN augmentent les limitations quant à son analyse moléculaire. A l'inverse le gros et beau MAC se prête facilement à l'expérimentation, créant un large biais dans les connaissances acquises sur l'un et l'autre des génomes. Le MAC est bien documenté, tandis que le MIC reste particulièrement obscur à l'heure actuelle. (Wilkes.C.D.,2014).

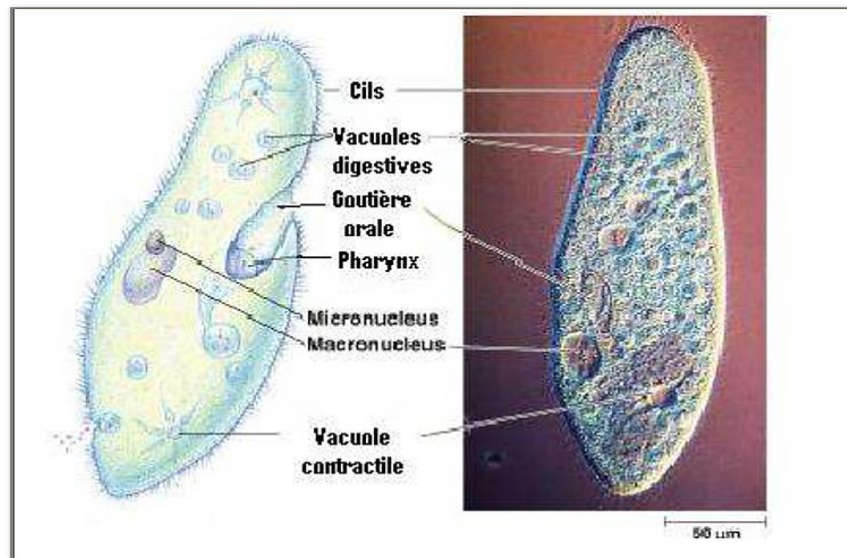


Figure03 : Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

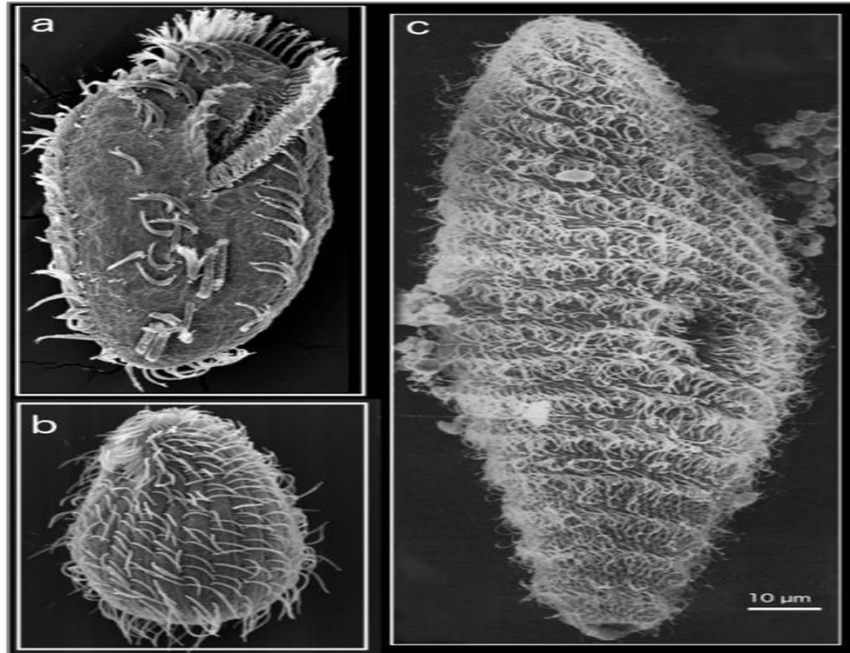


Figure04 : Photo prises au microscope à balayage permettant de voir les différences d'organisation des cils des organismes ciliés. A | *Oxytrichatrifallax*. B | *Tetrahymenathermophila*. C | *Paramecium caudatum*. (Wilkes.C.D.,2014)

2.2.Classification

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

Tableau 04 : Classification de *Paramecium sp*

Règne	<i>Protista</i>
Embranchement	<i>Ciliophora</i>
Classe	<i>Oligohymenophora</i>
Ordre	<i>Peniculida</i>
Famille	<i>Parameciidae</i>
Genre	<i>Paramecium</i>

2.3.Mouvement

Les cils sont le mode de locomotion des paramécies. Ces dernières peuvent diriger les battements de leurs cils pour se déplacer en avant ou en arrière dans un mouvement spiralé. Une paramécie peut effectuer un brusque retrait au contact d'un obstacle. (Benbouzid.H.,2012)

2.4.Biologie et Morphologie

Les cellules de paramécies appartenant au groupe *aurelia* sont exceptionnellement grandes. Elles mesurent environ 150 µm de long et 50 µm de large. Leur taille varie considérablement en fonction de l'approvisionnement alimentaire et le stade du cycle de vie (Beale et Preer, 2008).

La paramécie possède un macronoyau, deux ou plusieurs micronoyaux et deux vacuoles contractiles qui se produisent sur la surface dorsale. Ces vacuoles, servant à réguler l'osmolarité, se situent sur le premier et le dernier quart de l'organisme et vident leur contenu liquide à l'extérieur par l'intermédiaire des pores excrétoires. Sur le côté de la cellule notée "ventrale", se trouve l'œsophage, dans lequel la nourriture (bactéries, levures, algues, etc) est véhiculée par des cils spéciaux. Au bas de l'œsophage, la nourriture est concentrée dans des vacuoles alimentaires qui sont continuellement bourgeonnées et pénétrées dans le cytoplasme. Les résidus non digérés seront déchargés dans le milieu extérieur par un pore anal appelé cytoprocte (anus cellulaire) (Beale et Preer, 2008). La paramécie possède également une voie de sécrétion régulée des trichocystes (voie d'exocytose) comme un moyen de défense contre ses prédateurs (Damaj, 2008). Le cytoplasme des paramécies limité par une mince cuticule présente une zone périphérique hyaline et visqueuse. Cette cuticule résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps. Ce dernier est uniformément recouvert de cils vibratiles. Cette ciliature somatique, qui bat de façon synchronisée, permet aux paramécies de se déplacer (Beaumont et Cassier, 1998).

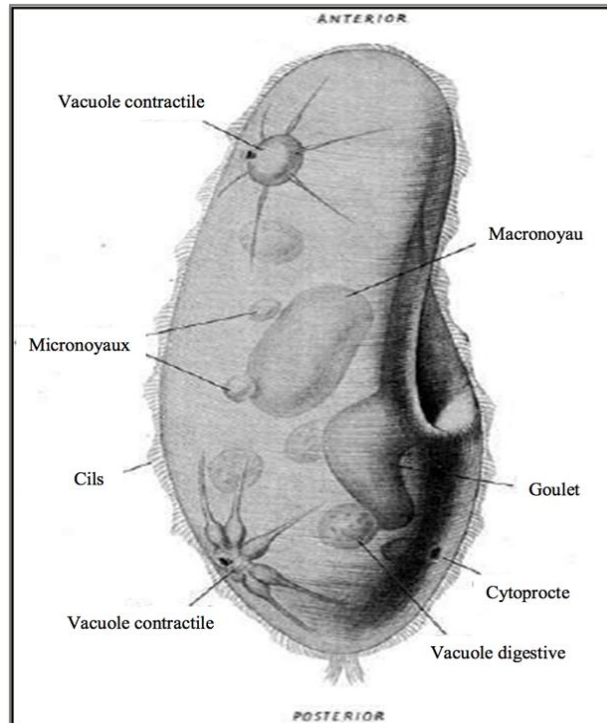


Figure 05 : Morphologie générale d'un spécimen de *Paramecium* du groupe *Aurelia* (Jurandet Selman, 1969).

2.5. Respiration

La respiration chez les paramécies se fait par des échanges gazeux avec le milieu environnant à travers la membrane cellulaire. Ainsi, les gouttelettes d'eau, absorbées au moment de la capture de la nourriture, contiennent de l'oxygène et l'eau rejetée par les vacuoles pulsatiles contient une forte proportion de gaz carbonique (Wehner et Gehring, 1995).

2.6. Alimentation

L'alimentation chez les paramécies s'effectue en 3 étapes :

- **Ingestion des aliments :** La bouche forme un entonnoir allongé qui s'enfonce dans le cytoplasme. Cet entonnoir est pourvu de cils spéciaux qui produisent un courant d'eau entraînant les proies (débris de végétaux, bactéries, algues unicellulaires) dans le fond de la cavité buccale (péristome). Il se forme ensuite, autour des particules, une vacuole digestive (Samworth et Morgan, 2000).

- **Digestion** : Les aliments sont digérés au niveau des vacuoles digestives, et les produits de la digestion sont absorbés par le cytoplasme (Samworth et Morgan, 2000).
- **Excrétion** : Les éléments indigestibles sont ensuite rejetés vers l'extérieur par le cytoprocte (pore anal) (Beale et Preer, 2008). Les paramécies éliminent leurs déchets azotés sous forme ammoniac par diffusion. Cette élimination est facilitée par les mouvements internes du cytoplasme (Samworth et Morgan, 2000).

2.7.Reproduction et cycle de vie

2.7.1. Multiplication végétative

La paramécie se multiplie comme une cellule somatique. On parle alors de multiplication végétative. C'est-à-dire qu'elle fait des clones et cette division dure six heures. Mais la difficulté réside dans le fait que chaque cellule fille devra avoir deux micro-noyaux et un macronoyau afin d'être viable. Pour cela, la cellule mère va avant de se diviser, doubler son nombre de micro-noyau et doubler la taille de son macronoyau. Une fois ces étapes passées, la cellule se divise en deux, en ayant bien pris soin de bien répartir un macronoyau et deux micro-noyau dans chaque cellule fille. (Bétermier,2010).

2.7.2. Reproduction sexuée

Mais la paramécie a aussi une reproduction sexuée, c'est le cas lorsque le milieu dans lequel elles vivent est carencé en nutriments que l'on appelle dans ce cas « la conjugaison ». (Bétermier, 2010).

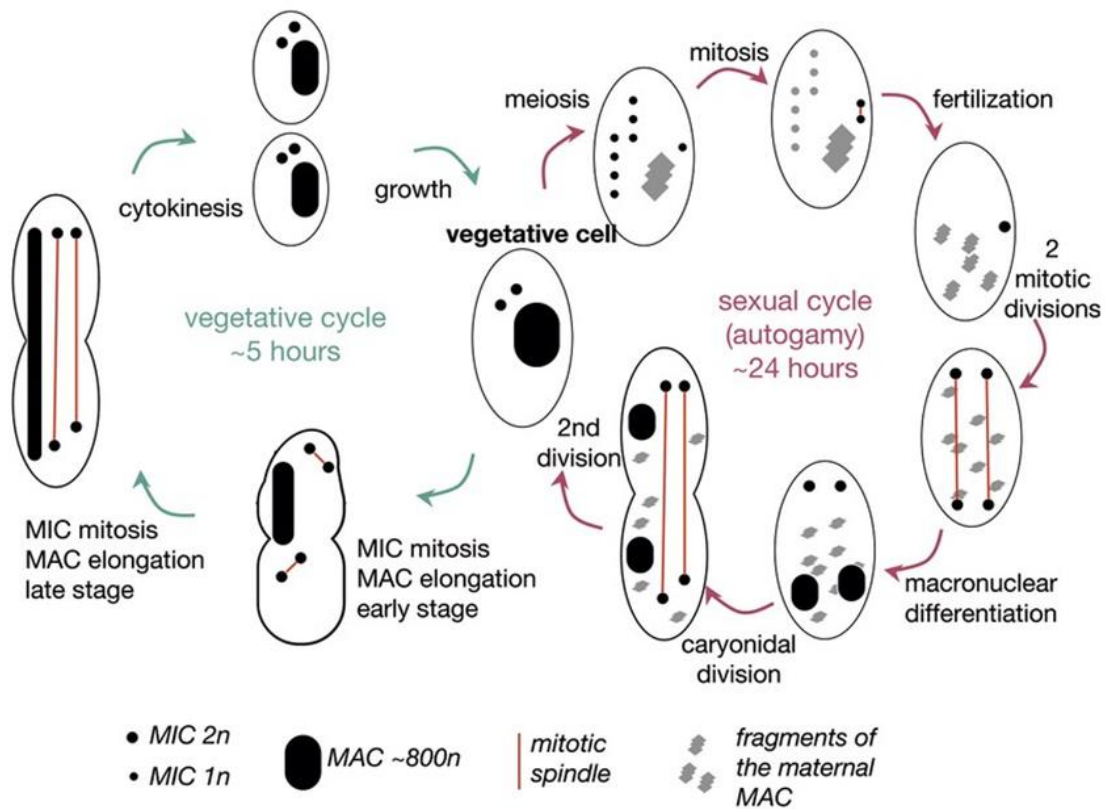


Figure 06 : Phases végétative et sexuelle du cycle de vie du *Paramecium*. Le cycle cellulaire végétatif (flèches vertes) se compose de la division mitotique des deux micronoyaux (MIC) et de la division non mitotique du macronoyau (MAC). Les événements de réorganisation nucléaire pendant l'autogamie (flèches violettes) comprennent la méiose des deux MIC diploïdes, la dégénérescence de sept des huit produits haploïdes avec une division supplémentaire du seul survivant, la caryogamie deux divisions mitotiques du noyau zygotique diploïde 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).

➤ Conjugaison

Lors de la conjugaison, les cellules s'échangent leurs micro noyaux. Comme ces noyaux ne proviennent pas des mêmes cellules, elles ne possèdent pas le même génome. La conjugaison permet donc de mélanger les gènes, de brasser le patrimoine génétique avec peut-être à la clef, une bonne combinaison de gènes permettant de mieux s'adapter au milieu. (Bétermier,2010).

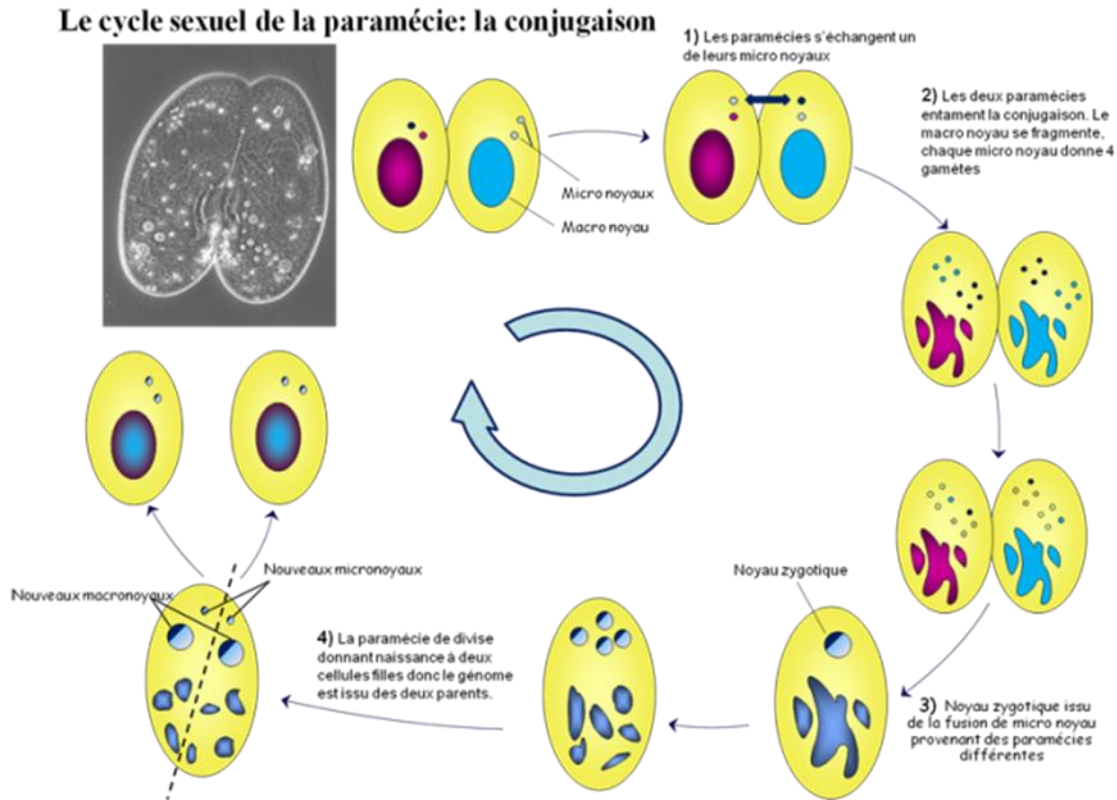


Figure 07 : Le cycle sexuel de *Paramecium* « la conjugaison ». (Bétermier, 2010).

2.8.Dimorphisme nucléaire

Les ciliés sont un groupe important et diversifié d'eucaryotes unicellulaires répartis à travers le monde (Song *et al.*, 2009). Chaque cilié possède deux noyaux fonctionnellement distincts (Hammerschmidt *et al.*, 1996). Le macronoyau ampliploïde (MAC) stocke le génome somatique et régit le phénotype cellulaire, tandis que le micronoyau présumément diploïde (MIC) contient un génome germinatif et est transcriptionnellement silencieux pendant la croissance végétative. (Yurui.Wet *al.*,2017).

➤ **Micronoyaux (MIC)**

Les MIC sont de petits noyaux diploïdes (~3 µm de diamètre) qui correspondent à la lignée germinale de la paramécie. En effet, à chaque cycle sexuel seule l'information génétique contenue dans les MIC est transmise d'une génération à l'autre. (Mélanie.B.G, 2023).

➤ **Macronoyau (MAC)**

Le noyau MAC correspond à la lignée somatique. Il sert à la production des transcrits nécessaires à la vie de la cellule pendant tout son cycle de vie, mais est détruit et un nouveau MAC est formé à chaque cycle sexuel. Sa taille est environ dix fois supérieure à celle des MIC (~30 µm, soit environ 1/5ème de la taille de la paramécie). Le MAC contient une version fragmentée des chromosomes MIC dépourvus de centromère et d'autres séquences répétées (Betermier et Duharcourt, 2014). Il est hautement polyploïde : sa ploïdie a d'abord été évaluée à ~800n (Guérin *et al.*, 2017. Preer, 1976). Cependant, cette première estimation ne prenait pas en compte que près de 50% du génome MIC était éliminé pour former le génome MAC (Sellis *et al.*, 2021)

2.9.Choix de *Paramecium sp* comme modèle biologique

Les paramécies sont des organismes eucaryotes unicellulaires qui mesurent entre 0,1 et 0,3 mm de long ce qui les rend facilement observables au microscope et isolables manuellement. La facilité d'observation et de culture des paramécies a permis leur étude dès le début du XVIIIème siècle et en fait des organismes modèles encore très utilisés. (Bazin.G.M, 2023)

Les ciliés ont servi de modèles dans de nombreux domaines de recherche, notamment en cytologie, zoologie, biologie évolutive et génétique. (Hausmann et Bradbury, 1996).

3.1 Stress oxydatif

Un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, pouvant potentiellement conduire à des dommages, est appelé "stress oxydatif" (Sies, 1985, 1986, 1991). Les oxydants se forment en tant que produit normal du métabolisme aérobie, mais peuvent être produits à des taux élevés dans des conditions pathophysiologiques. Un état quasi-stationnaire est maintenu par un motif complexe d'antioxydants. (see Sies, 1993, 1995). La défense antioxydante est en partie capable de s'adapter aux besoins changeants. La défense antioxydante implique plusieurs stratégies, à la fois enzymatiques et non enzymatiques. (Sies, 1996).

3.2 Biomarqueurs

Un biomarqueur peut être défini comme une caractéristique mesurée et évaluée de manière objective, servant d'indicateur des processus biologiques normaux, des processus pathogènes ou des réponses pharmacologiques aux interventions thérapeutiques. (Group B.D.W, 2001). Un biomarqueur du stress oxydatif est classiquement défini comme une molécule biologique dont la structure chimique a été modifiée par des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour les espèces réactives d'oxygène). (Offord, E., van Poppel, G., Tyrrell, R, 2000).

3.2.1. Biomarqueurs enzymatiques (GST)

Les glutathion S-transférases (GST) (EC 2.5.1.18) forment une famille de protéines multifonctionnelles qui agissent à la fois en tant qu'enzymes importantes pour la détoxification et en tant que protéines de liaison intracellulaire. En raison de cette double fonction, elles ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs, notamment des biochimistes, toxicologues, pharmacologues, biologistes cellulaires et physiologistes. En tant qu'enzymes, elles catalysent la réaction entre le nucléophile glutathion réduit (γ -glutamylcystéinyglycine ou GSH) et un grand nombre de composés électrophiles. De plus, elles se lient à plusieurs composés amphipathiques qu'elles ne métabolisent pas (ligands non substrats) et ont été suggérées comme transporteurs intracellulaires pour des composés ayant une solubilité limitée dans l'eau. (Boyer.T.D.,1989).

3.2.1. Biomarqueurs non enzymatiques (GSH)

La glutathion (GSH) est un tripeptide, γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine, est présente dans les tissus en tant que thiol non protéique le plus abondant qui protège contre le stress oxydatif. La GSH est également un déterminant clé de la signalisation redox, essentiel dans la détoxification des xénobiotiques, et régule la prolifération cellulaire, l'apoptose, la fonction immunitaire et la fibrogénese. La biosynthèse de la GSH se produit dans le cytosol de manière étroitement régulée. Les déterminants clés de la synthèse de la GSH sont la disponibilité du précurseur d'acide aminé sulfuré, la cystéine, et l'activité de l'enzyme limitante, la glutamate cystéine ligase (GCL), qui est composée d'une sous-unité catalytique (GCLC) et d'une sous-unité modifiante (GCLM). La deuxième enzyme de la synthèse de la GSH est la glutathion synthétase (GS). (Shelly C. Lu.,2013).

Chapitre II

Partie

Expérimentale

Matériels et
Méthodes

1. Matériels et Méthodes

C'est au laboratoire du département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'université de Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED entre janvier 2024 et février 2024, que nous avons fait une étude prospective, portant sur des paramécies traitées par la gomme résine de *Ferula assa-foetida* pour étudier l'effet de cette dernière sur quelques biomarqueurs de stress (GSH, et l'activité GST).

1.1. Matériels

1.1.1. Matériels Biologiques

A. Matériel Animal

Le matériel biologique utilisé dans notre étude est le protiste cilié : *Paramecium sp.* *Paramecium* est l'un des premiers organismes unicellulaires qui ont été observé au microscope. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille (120 μm de longueur en moyenne et 48 μm de largeur environ), la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées ont fait un modèle d'étude privilégié pour les biologistes (Boulassel, 2014). Les paramécies présentent aussi des caractères physiologiques comparables à celle des cellules épithéliales des êtres humains, pour la modélisation des tests de cytotoxicité, ils constituent un excellent modèle moderne (Van Houten, 2023).

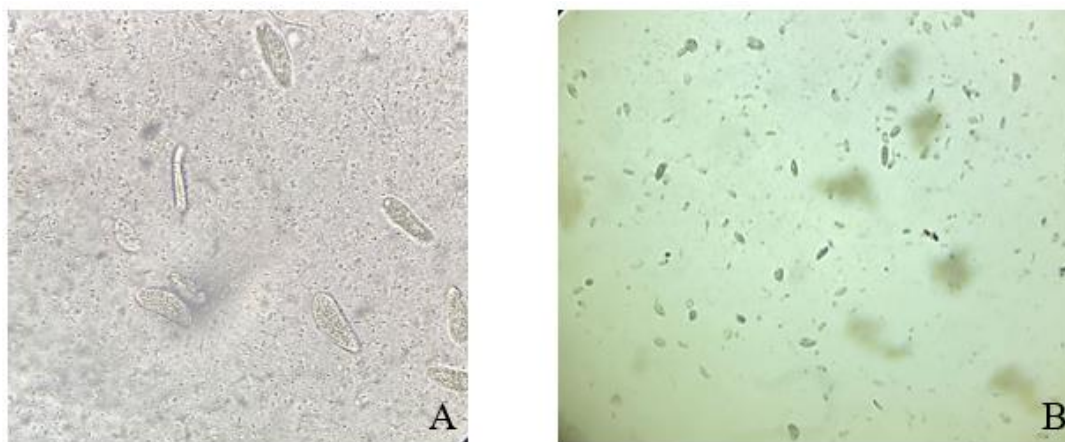


Figure 08 : *Paramecium* au microscope (Originale, 2024)

A : *Paramecium* ($\times 500$), **B :** *Paramecium* ($\times 400$)

B. Matériel végétal

Dans cette étude nous avons utilisée l'extrait gomme résine de la racine de *Ferula assa-foetida* (figure 09), acheté du marché local d'EL-OUED ; récolter récemment et laisser sécher à l'air jusqu'à bien solidifier, puis nous l'avons broyé manuellement jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, ensuite nous l'avons conservée dans des boites hermétiques en verre, pour qu'elle soit utilisées ultérieurement.



Figure 09 : La gomme résine d'Asafoetida (*Ferula assa-foetida*) (Originale, 2024)

1.2.Méthodes

1.2.1. Préparation de la culture de paramécie

Pour préparer un milieu approprié à la croissance de Culture mixte des paramécies nous avons suivi la méthode de Beaumont et cassier (1998), comme suit :

Couper le foin en petits morceaux et le faire trempé dans un récipient en verre d'eau douce. La préparation est conservée dans un endroit chaud, sombre et bien aéré. 5 à 6 jours plus tard un voile bactérien apparaît sur la solution, on observe au microscope optique les paramécies et sans coloration, dont ces derniers se nourrissent au dépend du voile bactérien. En fin récupérer dans un tube à essai contenant 1 ml de milieu de culture et 1 ml de solution contenant des paramécies, et laisser incuber dans une étuve à une température de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 2 à 3 jours.



Figure10 : Préparation de la culture de paramécie (Originale, 2024)

1.2.2. 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
- 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.

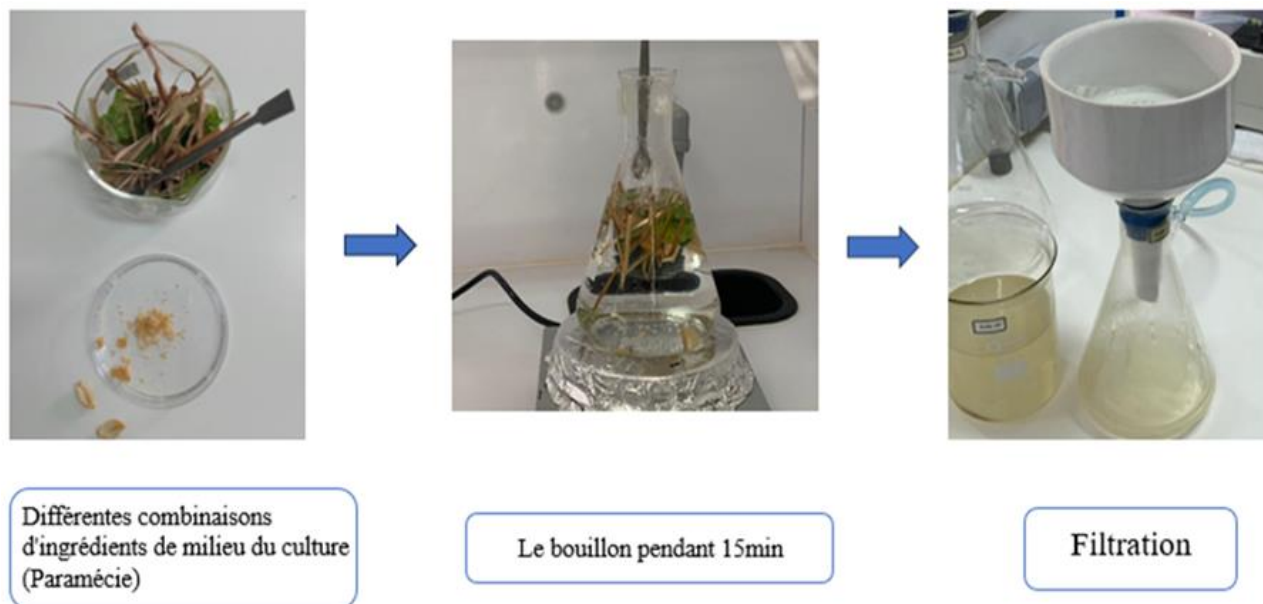


Figure 11 : Schéma explique une méthode de préparation de milieu de culture. (Originale, 2024)

1.2.3. Impact du milieu de culture sur la croissance de la paramécie

- Dilution du milieu de culture pour les paramécies afin d'obtenir une croissance optimale (4 ml milieu de culture + 6 ml l'eau distillée).
- Nous avons préparé 15 tubes (1 ml de paramécie+ 2 ml milieu de milieu de culture) nous y incubons dans une étuve à une température de 25,5°C et réaliser des repiquages tous les 3 jours en ajoutant 0,5 de milieu de milieu de culture dilué.

1.2.4. Protocol de traitement de l'asafoetida

Nous avons placé de l'eau contenant les paramécies et du 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.

L'expérience comprenait le test de l'effet de l'asafoetida sur la paramécie. Nous avons préparé 1g d'asafoetida dans 1L d'eau distillée. Nous avons ensuite choisi 4 concentrations différentes qui permettraient d'obtenir une réponse biologique à la paramécie comme suit (C1, C2, C3 et C4) correspondant respectivement à 0.5, 1, 2 et 3 g/L.

Les tests sont réalisés dans des tubes à essais de 1ml de culture de paramécies et 1 ml de chaque concentration d'asafoetida, et après 3 heures de traitement, nous avons réalisé les dosages (les tests sont répétés 3 fois) selon le protocole suivant :

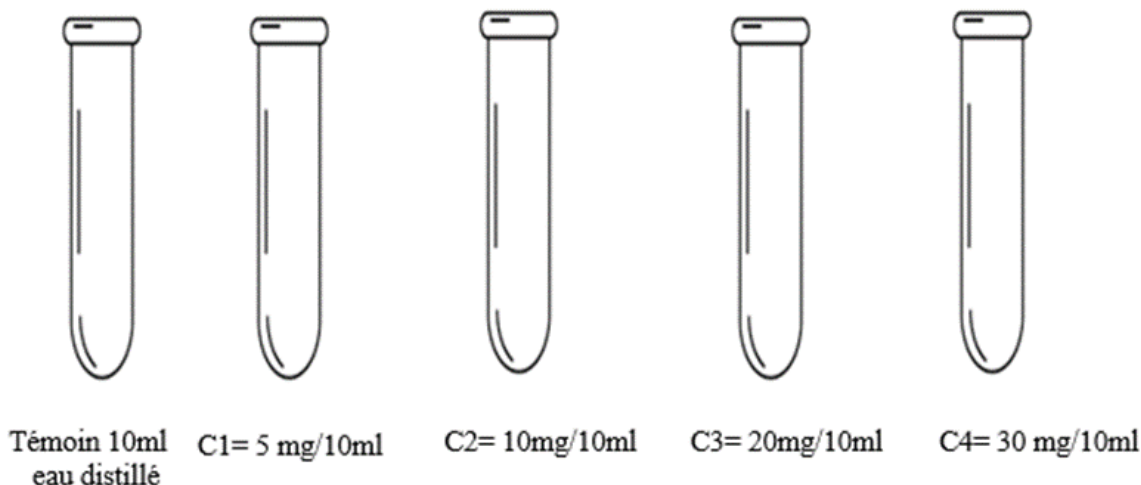


Figure 12 : Protocole de traitement des paramécies avec l'assa-foetida (Originale, 2024)

1.2.5. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de **Bradford (1976)**, qui consiste à additionner une fraction aliquote de 100 μ l du surnageant ou de la gamme étalon à 4 ml du réactif colorant bleu brillant de Coomassie (BBC) G250 [100 mg BBC, 50 ml éthanol 95 °C, agitation pendant 2 heures, 100 ml acide orthophosphorique 85%, q.s.p 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].

1.2.6. Dosage du glutathion GSH

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Wackberker& 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 [7,448 g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion l'homogénat 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'homogénat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1000 tours/mn pendant 5 mn.

Une aliquote de 500 μ l du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris/EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 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 μ l du surnageant sont remplacés par 500 μ l d'eau distillée.

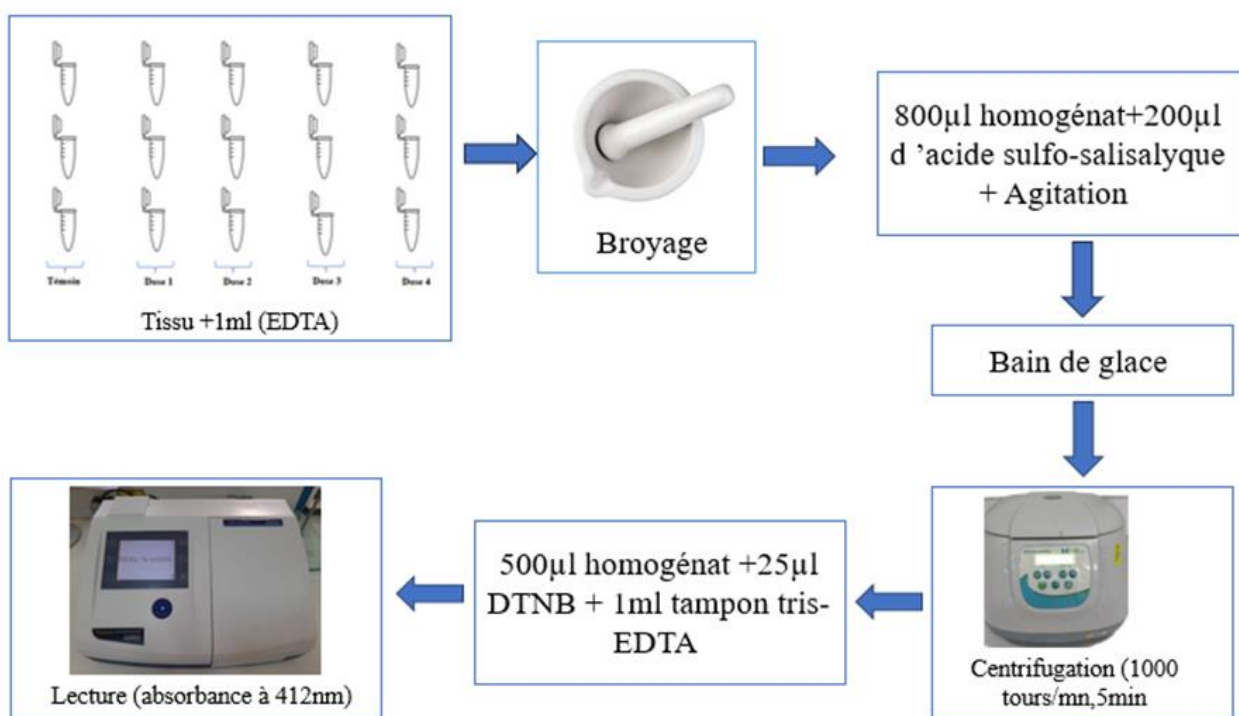


Figure 13 : Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion (GSH)(Original, 2024)

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

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

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

1.2.7. Dosage activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

La mesure de l'activité de glutathion S-transférase (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 cofacteur le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre visible/UV. Les

échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 trs/mn pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme. Le dosage consiste à faire réagir 200 μ l du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1 mM) /GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml 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 d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 μ l d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant.

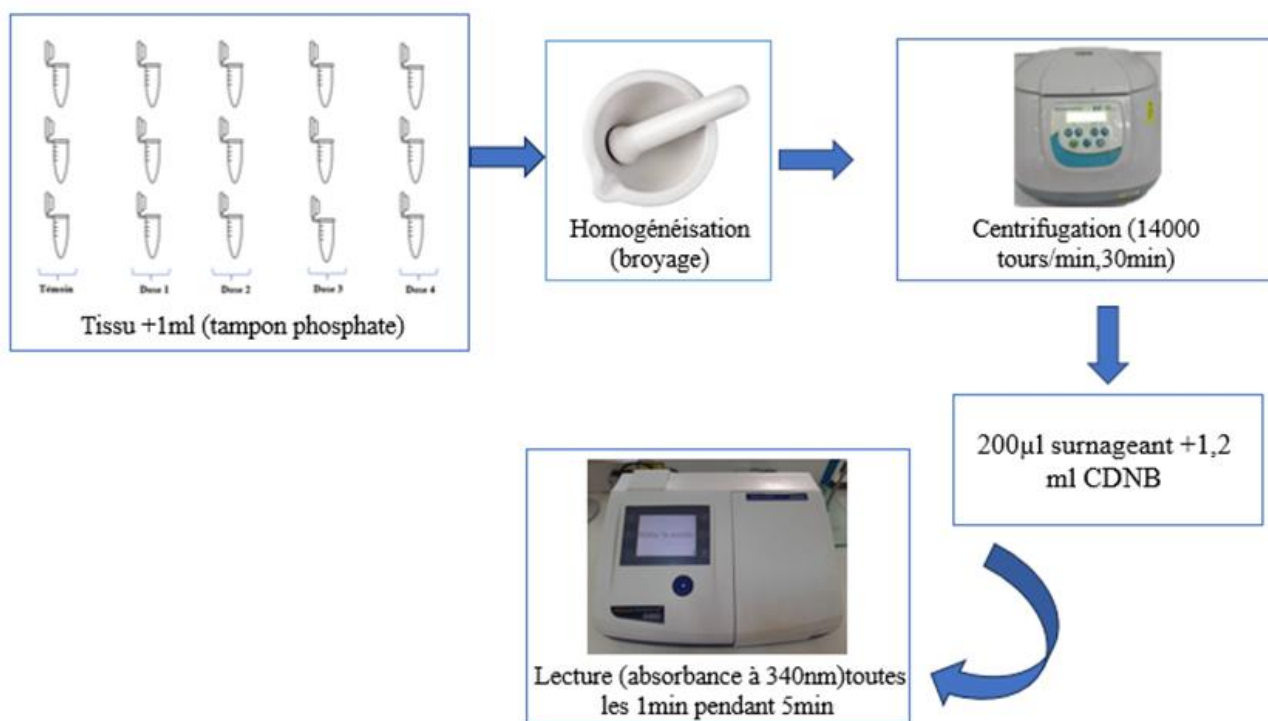


Figure 14 : Un schéma expliquant le protocole de dosage du glutathion S-transférase (GST)
(Originale, 2024)

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

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

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

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

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

Mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

Mg de protéines

- Ajouter 4ml de BBC en tube à essai,
- Puis nous y ajoutons 100 μl de surnageant,
- 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.
- Un blanc où les 500 μl du surnageant sont remplacés par 500 μl d'eau distillée.

1.2.8. Etude statistique

- ❖ Les résultats obtenus ont été exprimé par la moyenne de trois répétitions pour chaque groupe (T, C1, C2, C3, C4) plus au moins l'écart-type ;
- ❖ L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel SPSS (Version 20.0), basé sur l'analyse de la variance à un critère d'évaluation (ANOVA) qui permet d'effectuer des tests de comparaisons multiples afin d'expliquer les différences entre les moyennes. Les différences sont considérées comme :
 - ❖ Significatives lorsque $p \leq 0,05$ (*) ;
 - ❖ Hautement significatives lorsque $p \leq 0,01$ (**);
 - ❖ Très hautement significatives lorsque $p \leq 0,001$ (***)).

Résultats et
Discussion

2 Résultats

2.1 Effet du l'asafoetida sur l'évolution du taux de protéines totales chez les paramécies

La figure (15) illustre l'évolution du taux de protéines totales en fonction des concentrations croissantes de oléo-gomme-résine de *Ferula assa-foetida*.

Nos résultats montrent qu'en présence de l'oléo-gomme-résine de *Ferula assa-foetida*, le taux de protéines totales tend à augmenter de manière dose dépendante et très hautement significative ($p < 0,001$) pour toutes les concentrations (0.5, 1, 2 et 3 g/L) respectivement 1.34, 2.01, 2.07, 2.16 et 2.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF, par rapport aux témoins 1.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF.

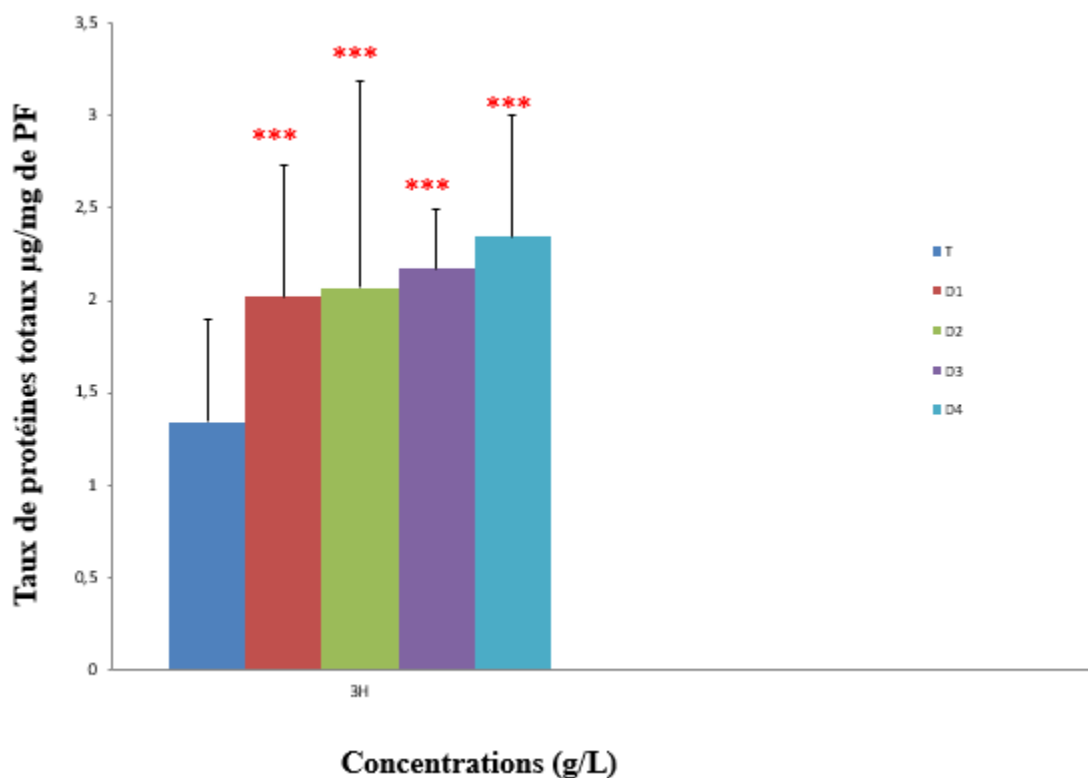


Figure 15 : Evolution du taux des protéines totales chez *Parametium Sp* en présence des concentrations croissantes gomme résine de *Ferula assa-foetida*

2.2 Effets d'asafoetida sur les biomarqueurs du stress oxydant chez *Paramecium sp*

2.2.1 Effets sur l'évolution du taux de glutathion (GSH)

La figure (16) illustre l'évolution du taux de GSH en présence de concentrations croissantes de *Ferula assa-foetida* :

Durant la période de 3 heures, nous remarquons une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) du taux de GSH chez les paramécies traitées par rapport au témoin après une exposition aux trois premières concentrations (0.5, 1 et 2g / L d'eau distillé) avec 46.3, 45.1 et 27.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine d'une oléo-gomme-résine de *Ferula assa-foetida*. Cependant dans la plus forte dose (3g/L d'eau distillé) avec 15.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine, il a été constaté que l'oléo-gomme-résine entraîne une diminution très hautement significative ($P < 0,001$) du taux de GSH comparativement au témoin avec 24,2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine.

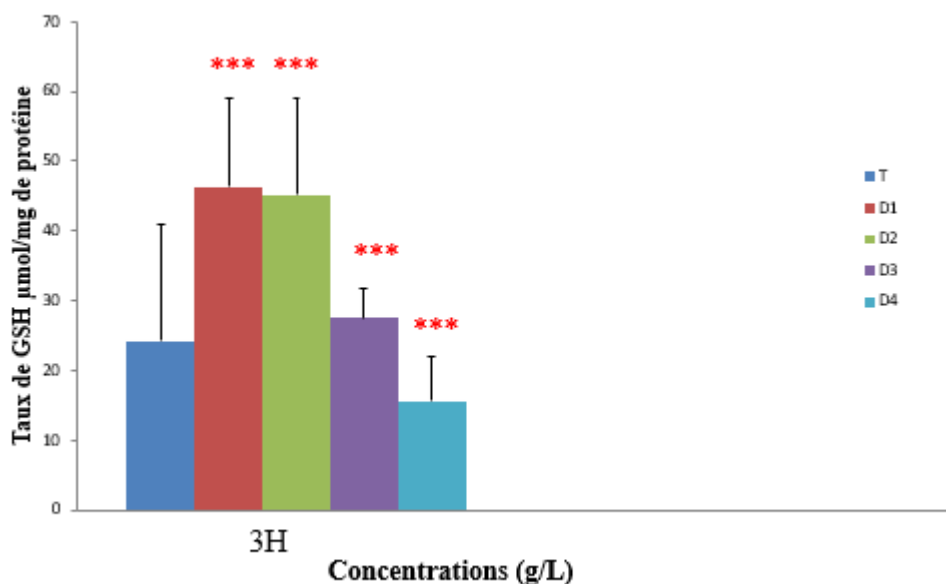


Figure 16 : Variation du taux de GSH chez *Paramecium Sp* exposée aux concentrations croissantes d'asafoetida

2.2.2 Effets sur l'évolution de l'activité glutathion S-transférase (GST)

Les variations du taux de GST chez les paramécies témoins et traités par les concentrations croissantes d'asafoetida sont représentés dans la figure (17).

Au cours de la période de trois heures, l'activité enzymatique de la GST tend à diminuer mais seulement devenu très hautement significatif ($P < 0,001$) avec les concentrations (0.5, 1, 2 et 3g/L d'eau distillé) respectivement d'environ 149.8, 85.4, 112.7 et 282.8 $\mu\text{mol/mg}$ de protéine d'une oléo-gomme-résine de *Ferula assa-foetida* par rapport au témoin 1264.6 $\mu\text{mol/mg}$ de protéine.

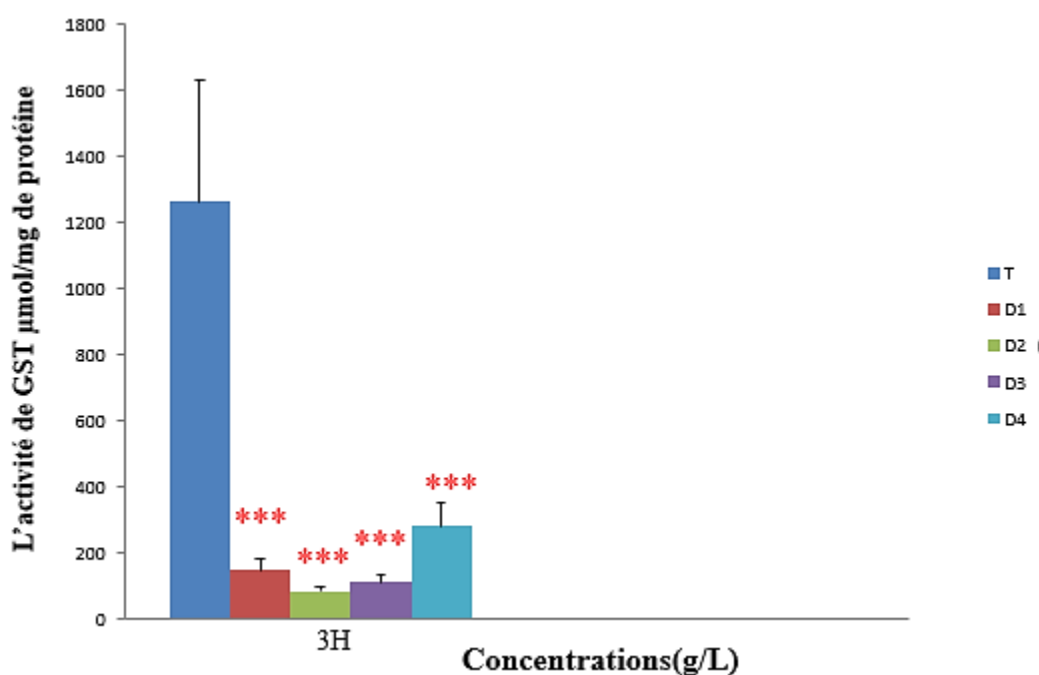


Figure 17 : Evolution de l'activité GST chez *Paramecium Sp* en fonction des concentrations croissantes d'asafoetida

3 Discussion

Il est fréquemment mentionné dans la littérature scientifique, les rapports officiels et la presse que 80 % des populations asiatiques et africaines utilisent la médecine traditionnelle (MT) pour répondre à leurs besoins de santé (Oyebode.O *et al*, 2016). L'asafoetida est traditionnellement utilisée pour le traitement de diverses maladies et est l'une des plantes médicinales les plus menacées (Iranshahy.M, et Iranshahi.M, 2011). La gomme résineuse provient de la sève séchée extraite de la tige et des racines et est utilisée comme épice. La résine est blanc grisâtre lorsqu'elle est fraîche mais en séchant, elle prend une couleur ambrée foncée (Golmohammadi.F, 2016).

Aujourd'hui, la forme la plus couramment disponible est l'asafoetida composé, une poudre fine contenant 30 % de résine d'asafoetida, ainsi que de la farine de riz et de la gomme arabique (Golmohammadi.F, 2016)

Les protozoaires jouent un rôle fondamental dans la nature vivante ; et leur valeur est tout aussi grande sur le plan de la recherche scientifique fondamentale. (Dragesco.J.,1980). Les ciliés peuvent être de précieux micro-organismes eucaryotes à utiliser comme biocapteurs cellulaires complets ou comme source potentielle de biomarqueurs/biocapteurs moléculaires pour détecter les polluants dans les échantillons environnementaux (Gutiérrez, J. C., M *et al* 2003). Les paramécies se sont des bioindicateurs de pollution et font partie des premiers microorganismes identifiés avec l'apparition du microscope et les cultures de microorganismes dans des infusions de végétaux (foin, blé, avoine, thé...). (Bazin.G.M,2023).

Chaque fois que les micro-organismes sont soumis à des changements dans leur environnement, ils sont stressés. Ce stress peut être intense, et entraîner la mort des micro-organismes s'ils ne parviennent pas à réagir, notamment lorsque leurs enzymes de détoxification sont inhibées. Ça peut être également moins intenses, leur permettant de déployer une batterie de réponses, par l'activation de mécanismes de détoxification, afin de combattre, survivre et dans certains cas, s'acclimater à ce nouveau paramètre (Lagadic *et al.*, 1997).

Notre étude démontre une forte corrélation dose-réponse entre l'exposition à l'asafoetida et l'expression des protéines totales après 3 heures d'exposition des paramécies. En effet, nous avons constaté que l'ajout d'asafoetida au milieu dirigé à une augmentation significative de la teneur en protéines totales du *Paramecium sp.* Ceci est en accord avec des études antérieures de Huang, Q., *et al* (2022) ; l'asafoetida a causé une augmentation significative au niveau des protéines totales qui est probablement due au déclenchement du mécanisme de séquestration protéique.

Dans un second temps, et après avoir élucidé les effets de l'extrait gomme résine de la racine de *Ferula assa-foetida* sur l'évolution du taux de protéines totale, nous avons jugé utile de suivre l'évolution du taux de GSH et les variations de l'activité GST, le glutathion est le principal antioxydant intracellulaire qui agit contre le stress oxydatif et qui existe principalement sous forme de glutathion réduit (GSH) et de glutathion oxydé (GSSG) (Jin et al., 2010). Les processus de synthèse, de transport, d'utilisation et de glutathion le métabolisme 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, la présente étude démontre clairement une forte corrélation dose-réponse entre l'exposition à l'asafoetida et l'expression de GSH.** L'expression du GSH semble être sensible au xénobiotique : Saleem.M *et al* 2001, quand ils ont fait une étude sur le potentiel antioxydant et anti-carcinogène de l'asafoetida après traitement des souris albinos suisse en différents concentrations (300, 400 and 500 µg) ont trouvé une augmentation au niveau et d'activité de l'antioxydant cellulaire, à savoir glutathion GSH. Et d'après Khazdair, M. R *et al* 2019, (Figure 1 dans l'article) l'asafoetida a causé une augmentation au niveau de taux de glutathion GSH ce qui est en corrélation avec nos résultats. Akerboom et Sies, 2017, explique que l'augmentation du taux de glutathion est révélatrice d'un stress oxydatif. En revanche le taux de glutathion est fortement décliné à la plus faible concentration en asafoetida, cette déplétion pouvant être due à son utilisation massive par l'oxydation de deux molécules de GSH en une molécule de GSSG. Le GSH récupère également les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les métaux peuvent être séquestrés par le GSH pour empêcher son interaction négative avec les biomolécules. Le GSH et d'autres thiols jouent un rôle crucial dans le nettoyage des ROS (Broerse *et al.*, 2012 ; Sulata *et al.*, 2008 ; Xiaoxia Yang *et al.*, 2012).

D'autre part, 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 (Bocediet *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 ; Bocediet *al.*, 2016). **Dans la présente étude on a noté une diminution significative de l'activité enzymatique de la GST dans les paramécies, parallèlement à l'augmentation des taux de GSH puis décliné à la plus forte concentration en asafoetida**, Tans dit que Dadkhah.A *et al* 2015 ; se sont étudiées sur le potentiel chimio préventif de *Ferula assa-foetida* chez les rats par des différents concentrations (6.25 et 12.5mg/Kg b.w) pendant 4 semaine, leurs résultats obtenus indiquent après le traitement chimio préventif avec les extraits de *F. assa-foetida* a entraîné une augmentation significative ($P < 0,05$) du niveau de l'activité glutathion S-transférase (GST). Et d'après Saleem.Met *al* 2001, dans leurs études sur le potentiel antioxydant et anti carcinogène de l'asafoetida, après traitement des souris albinos suisse en différents concentrations de l'afoetida (300, 400 and 500 μ g), leurs résultats obtenus indiquent que l'asafoetida a également provoqué une récupération significative de l'activité des enzymes de phase II, à savoir la glutathion S-transférase de manière dose-dépendante. Et enfin Rahbarian.R *et al* 2017 ont traité des rats en concentrations (100 et 200 mg/kg) de l'asafoetida à jours alternés pendant un mois, les résultats de cette étude ont montré une augmentation significative ($P < 0.05$) sur l'activité de glutathion S-transférase (GST). Habituellement l'épuisement du GSH conduit à l'activation de la GST avec une resynthèse simultanée de GSH pour le remplacement du niveau normal, il joue donc un rôle majeur dans la métabolisation des xénobiotiques par les organismes et fournit à la cellule un état d'équilibre et de protection contre les espèces réactives oxydées (Mofredj *et al.*, 1999).

Enfin, nous avons remarqué que malgré les différentes concentrations, l'asafoetida produisait une perturbation sur une courte période.

Conclusion

Générale

Conclusion Générale

Les protozoaires jouent un rôle fondamental dans la nature vivante et leur valeur est tout aussi grande sur le plan de la recherche scientifique fondamentale car de nombreux problèmes biologiques sont plus faciles à étudier sur des cellules isolées plutôt que sur des organismes multicellulaires, elles sont faciles à obtenir et à cultiver. Les paramécies sont des organismes unicellulaires (Protozoaires), la facilité d'observation et de culture des paramécies a permis leur étude dès le début du XVIII^{ème} siècle et en fait des organismes modèles encore très utilisés.

Notre choix s'est porté sur l'étude des effets de l'exposition de l'asafoetida sur quelques biomarqueurs de stress (GSH-GST) chez les paramécies pour mieux comprendre le mode d'action de la gomme résine aussi bien à l'échelle d'un organisme unicellulaire que pluricellulaire.

D'après la synthèse bibliographique et des études effectuées sur l'impact de résine-gomme-oléorésine obtenue de *Ferula assa-foetida* sur certains animaux et micro-organismes comme les paramécies et autres, l'asafoetida a causé une perturbation globale du métabolisme (une augmentation du taux des protéines totales). Cependant, l'augmentation croissante du taux de ces dernières dépendrait des différentes concentrations et s'explique que la présence des xénobiotiques à l'intérieur de la cellule stimule la synthèse protéique dont les enzymes et rend compte de la capacité de ces micro-organismes à la métabolisation et détoxification.

D'un autre côté, concernant l'étude des biomarqueurs du stress oxydant : selon les travaux effectués précédemment, nous remarquons une perturbation (dépendante de la dose d'asafoetida) sur le taux de GSH parallèlement de l'activité des enzymes antioxydantes GST chez les paramécies traitées par rapport au témoin.

A travers tous ces données, nous pouvons conclure que l'asafoetida peut provoquer des perturbations sur le métabolisme des organismes unicellulaires et que la paramécie est un excellent modèle pour les études toxicologiques. Cependant il en faut plus des études pour déterminer son efficacité *in vivo*.

Perspectives

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

- L'étude de l'impact de l'extrait gomme résine de la racine de *Ferula assa-foetida* chez les paramécies avec des autres concentrations et autres temps.
- L'étude de l'impact toxicologique de l'extrait gomme résine de la racine de *Ferula assa-foetida* sur d'autres modèles cellulaires.
- La recherche de l'impact d'asafoetida sur la physiologie et la reproduction des paramécies.
- Des tests de génotoxicité et l'étude de la neurotoxicité de *Ferula assa-foetida* chez ces protistes.

Références
Bibliographiques

A

- Abd El-Razek, M.H., Ohta, S., Ahmed, A.A., Hirata, T.**, 2001. Sesquiterpenecoumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 58, 1289–1295.
- Abu-Zaiton.AS.** Anti-diabetic activity of *Ferula assafoetida* extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Pak J Biol Sci.* 2010; 13:97e10
- Akerboom, T.** and Sies, H. (2017). Glutathione transport and its significance in oxidative stress. In *Glutathione* (1990) (pp. 45-56). CRC Press.
- Al-Jafari, A. H., Vila, R., Freixa, B., Costa, J., Canigual, S.** (2012). Antifungal compounds from the rhizome and roots of *F. hermonis*. *Phytotherapy Research*.
- Angelini.P, Pagiotti.R, Venanzoni.R, Granetti.B.** Antifungal and allelopathic effects of *assafoetida* against *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus* spp. *Allelopath J.* 2009; 23:357e368
- Azzouz, Z., Berrebbah, H., & Djebbar, M. R.** (2011). Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3243-3250.

B

- **Beale G.H., Preer J.R.**, 2008. *Paramecium: genetics and epigenetics*. 1st edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, p 191.
- **Beaumont et Cassier** ; 1998. *Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie*, 3ème édition DUNOD, pp : 123-143.
- **Beaumont R., Cassier C.**, 1998. *Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie*, 3ème édition DUNOD, 123–143.
- Beisson, J., Bétermier, M., Bré, M. H., Cohen, J., Duharcourt, S., Duret, L., ... & Sperling, L.** (2010). *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(1), pdb-emo140.

Références bibliographiques

- **Bétermier.M.** Que peut nous apprendre la paramécie sur la biologie des génomes ? (Jeudi 4 novembre 2010)
- Bétermier, M. and Duharcourt, S.** (2014). ProgrammedRearrangement in Ciliates:*Paramecium*.MicrobiolSpectr 2, MDNA-0035-2014 doi/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0035-2014
- Bagheri SM, Dashti-R MH, Morshedi A.** Antinociceptive effect of *Ferulaassa-foetida*oleo-gum-resin in mice. RPS. 2014 ;9 :207–12.
- Bazin-Gelis, M.** (2023). Etude du complexe impliqué dans l'élimination programmée d'ADN pendant la différenciation du noyau somatique chez *Parameciumtetraurelia* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay).
- Benbouzid, H., Berrebbah, H., Djebbar, M. R.** (2015). Toxicity of the chlorfenapyr : Growth inhibition and induction of oxidative stress on a fresh water protozoan: *Paramecium sp.* Advances in Environmental Biology, 9(3), 281-285.
- Benbouzid.H.** Thèse de Doctorat : Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricides sur des protistes ciliés, p23, p24, p25, p27, p29 (2012).
- Bhagat, J.;Ingole, B. S. and Singh, N.** (2016). Glutathione S-transferase, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and lipid peroxidation as biomarkers of oxidative stress in snails: A review. Invertebrate Survival Journal, 13(1), 336-349.
- Bhatnager R, Rani R, Dang AS.** Antibacterial activity of *Ferula asa foetida*: A comparison of red and white type. J Appl Biol Biotechnol. 2015; 3:18e21.
- Bocedi, A.;Fabrini, R.; Lo Bello, M.;Caccuri, A.M.;Federici, G.;Mannervik, B.;Cornish-Bowden, A. and Ricci, G.** (2016). Evolution of Negative Cooperativity in Glutathione Transferase Enabled Preservation of Enzyme Function. J Biol Chem. 291(52) : 26739–26749
- Boubidi.F, Zebila.Ch.** Mémoire de master : Test de cytotoxicité d'un principe actif le citrate de clomifène sur un modèle cellulaire ciliée d'eau douce : *Paramecium*sp. P18.

Références bibliographiques

-**Boulassel.A.** (2014). Evaluation de la toxicité de deux médicaments: le Paracétamol et l'Ibuprofène, sur un modèle cellulaire : *Paramecium teraurelia*. Essai à l'échelle subcellulaire. Thèse de Doctorat-Annaba.

- **Boyer, T. D.** (1989). Special article the glutathione S-transferases: an update. *Hepatology*, 9(3), 486-496.

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

-**Broerse, M., Oorsprong, H., & van Gestel, C. A.** (2012). Cadmium affects toxicokinetics of pyrene in the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicology*, 21, 795-802.

C

-**Cudmore.D., Larison.P., Charles.D.**, Book: "The Center of Life: A Natural History of the Cell" published in 1977 by David & Charles in Newton Abbot.

D

- **Damaj R.**, 2008. Squelette membranaire chez *Paramecium tetraurelia* : analyse structurale et fonctionnelle de la famille multigénique des épiplasmines. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, France, 171 p.

-**Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini, S., Rasooli, A., &Torabi, F.** *Ferula assa-foetida* extracts protection on the detoxification enzymes and β -catenin in colon tumor.

-**Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS, Mohammad NS.** Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula asa foetida* and its essential oil composition. *Grasas Aceites*. 2009; 60:405e412

-**Divya K, Ramalakshmi K, Murthy PS, Rao LJM.** Volatile oils from *Ferula asa foetida* varieties and their antimicrobial activity. *LWT Food Sci Technol*. 2014; 59:774e779.

E

- Edzard.E.** The efficacy of herbal medicine – An overview. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2005; 19:405-409. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2005. 00335.x
- Eigner, D., Scholz, D.**, 1990. Das zauberbchel in der GyaniDolma. *Pharmazie in Unserer Zeit* 19, 141–152.
- Ekor, M.** (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 66193.
- Emami, A., Fasihi, S., Mehregan, I.** Book: *Medicinal Plants* published by Andisheh Avar in Tehran in 2010.
- Evans, W.C.**, 2002. *Volatile oils and Resins*, Trease and Evans Pharmacognosy, fifteenthed. W.B. Saunders, London, p. 286.

F

- Fabrini, R.;Bocedi, A. ; Pallottini, V. ; Canuti, L. ; De Canio, M. ; Urbani, A. ; Marzano,V. ; Cornetta, T. ; Stano, P. ; Giovanetti, A. ; Stella, L. ; Canini, A. ; Federici, G. and Ricci, G.** (2010). Nuclearshield: a multi-enzyme task-force for nucleus protection. *PLoS ONE* 5, e14125
- **Fatehi M, Farifteh F, Fatehi-Hassanabad Z.** Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asa foetida* gum extract. *J Ethno pharmacol*. 2004; 91:321e324

G

- George P.** Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants –An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;1(6):40-44. ISSN: 2231-3354.
- Génoscope:** Centre National de Séquençage,2007 in France.
- Golmohammadi, F.** (2016). *Ferula assa-foetida* as a main medical plant in east of Iran (harvesting, main characteristics and economical importance). *Journal of progressive agriculture*, 7(2), 1-14.

-Group, B. D. W. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and **conceptual framework**. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69:89 – 95; 2001.**

-Guérin, F., Arnaiz, O., Boggetto, N., Denby Wilkes, C., Meyer, E., Sperling, L and Duharcourt, S. (2017). Flow cytometry sorting of nuclei enables the first global characterization of *Paramecium* germline DNA and transposable elements. *BMC Genomics* 18, 327. doi/10.1186/s12864-017-3713-7.

-Gutiérrez, J. C., Martín-González, A., Díaz, S., & Ortega, R. (2003). Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *European journal of protistology*, 39(4), 461-467.

H

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

-Hausmann, K., & Bradbury, P. C. (Eds.). (1996). *Ciliates: cells as organisms* (pp. ix+-485).

-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/GSK3 β /Nrf2/HO-1 pathway. *Chinese Medicine*, 17(1), 83.

-Huanhuan, L.v; Chenxiao, ZhenJunyu, Liu.; Pengfei, Yang.; Lijiang, Hu.; Peng. Shang. (2019). Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2019 |Article ID 3150145

I

-Ibtissem, S., Hana, S. (2021). Antioxidant activities and lipid peroxidation in the freshwater bioindicator *Paramecium* sp. exposed to hydrazine carboxylate (Bifenazate). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 25(1), 257-268.

Références bibliographiques

-**Iranshahy, M., Iranshahi, M.** (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin)—A review. *Journal of ethnopharmacology*, 134(1), 1-10.

J

-**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.

K

-**Kajimoto T, Yahiro K, Nohara T,** 1989. Sesquiterpenoid and disulfide derivatives from *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 28, 1761–1763.

-**Kamble, V. A., & Patil, S. D.** (2008). Spice-derived essential oils: effective antifungal and possible therapeutic agents. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 14(3-4), 129-143.

-**Kareparamban JA, Nikam.PH, Jadhav.AP, Kadam.VJ.** *Ferula foetida* "Hing": a review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 2012;3(2):775-86.

-**Kavoosi, G., & Rowshan, V.** (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: effect of collection time. *Food chemistry*, 138(4), 2180-2187.

-**Kelly.K.J, Neu.J, Camitta.B, MetHonig.G.R.**(1984) Methemoglobinemia in an infant treated with the folk remedy glycerited asafoetida, *Pediatrics* 73: 717–19.

-**Khazdair, M. R., Anaeigoudari, A., Hashemzahi, M., & Mohebbati, R.** (2019). Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 9(2), 98-105.

L

-**Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C. and Ramade, F.** (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : Aspects fondamentaux. Edition Masson, pp: 33-53-97.

Références bibliographiques

- Lee, B.; Duong, C. N.; Cho, J.; Lee, J. ; Kim, K. ; Seo, Y. ; & Yoon, J. (2012). Toxicity of citrate capped silver nanoparticles in common carp (Cyprinus carpio). Bio Med Research International.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1830(5), 3143-3153.

M

- Mahendra, P., & Bisht, S. (2012). Ferula asa foetida: Traditional uses and pharmacological activity. Pharmacognosy reviews, 6(12), 141.
- Maity, S., Roy, S., Chaudhury, S., & Bhattacharya, S. (2008). Antioxidant responses of the earthworm *Lampitoma mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. Environmental Pollution, 151(1), 1-7.
- Mallikarjuna, G. U., Dhanalakshmi, S., Raisuddin, S., & Ramesha Rao, A. (2003). Chemo modulatory influence of *Ferula asa foetida* on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes, antioxidant profiles and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats. Breast cancer research and treatment, 81, 1-10.
- Mofredj, A., Cadranel, J. F., Darchy, B., Barbare, J. C., Cazier, A., Pras, V., & Biour, M. (1999, October). Hepatotoxicity caused by therapeutic doses of paracetamol in alcoholics. Report of 2 cases of fatal hepatitis in cirrhosis. In *Annales de Médecine Interne* (Vol. 150, No. 6, pp. 507-511).
- Moreira, D. D. L., Teixeira, S. S., Monteiro, M. H. D., De-Oliveira, A. C. A., & Paumgarten, F. J. (2014). Traditional use and safety of herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 248-257. -Mostafa Z, Soheil P, Mahdi J, Mahmoodi S. Antifungal effects of *asa foetida* seed essential oil on in vitro growth of five species of plant pathogenic fungi. *Int Res J Appl Basic Sci*. 2013;4:1159e1162.
- Moumeni, O. (2017). Thèse de Doctorat : Etude de la toxicité d'un cyclohexanedione (herbicide) sur deux modèles biologiques d'eau douce: *Paramecium Tetraurelia* et *Daphnia Magna*, p14, p15, p16, p17.

O

- Offord, E., Van Poppel, G., & Tyrrell, R.** (2000). Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease. *Free radical research*, 33, S5-S19.
- Okigbo, R. N., Anuagasi, C. L., & Amadi, J. E.** (2009). Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of medicinal plants Research*, 3(2), 86-95.
- Oyebode, O., Kandala, N. B., Chilton, P. J., & Lilford, R. J.** (2016). Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study. *Health policy and planning*, 31(8), 984-991.

P

- Padhye, S., Rai, S., Lamba, N. N., & Upadhyay, M.** (2014). Spices as potent anti-bacterial agents against *Staphylococcus aureus*. *ARPN J Sci Technol*, 4(1), 46-51.
- Patil, S. D., Shinde, S., Kandpile, P., & Jain, A. S.** (2015). Evaluation of antimicrobial activity of *asafoetida*. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6(2), 722.
- Preer, J. R.** (1976). Quantitative predictions of random segregation models of the ciliate macronucleus. *Genet Res* 27, 227–238 doi/10.1017/S0016672300016426.

Q

- Qazi, M. A., Molvi, K.** (2016). Herbal medicine: A comprehensive review. *Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2):1-5.

R

- Rahbarian, R., SEPEHRI, M. H., & Sadoughi, S. D.** (2017). Effect of aqueous extract of *Ferula assa-foetida* and *avicennia marina* on oxidative stress parameters of brain cells in diabetic rats.
- Rajanikanth, B., Ravindranath, B., Shankaranarayana, M. L.,** 1984. Volatile polysulphides of *asafoetida*. *Phytochemistry* 23, 899–900.

-**Rani, A., Jain, S., & Dureja, P.** (2009). Synergistic fungicidal efficacy of formulations of neem oil, nicotinic acid and Ferula asafetida with α , β -unsaturated carbonyl compounds against *Sclerotium rolfsii* ITCC 5226 & *Macrophomina phaseolina* ITCC 0482. *Journal of pesticide science*, 34(4), 253-258.

-**Ross, I. A.** (2005). *Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses, medicinal plants of the world*. Totowa: Humana Press Inc., pp. 223–234.

S

- **Samworth M., Morgan M.**, (2000). Article on pond life: *Paramecium*. MISCape Article: *Paramecium*, Text by MIKE SAMWORTH, images by MIKE MORGAN. Dec.95 Updated by the MISCape Editor April 2000

-**Saleem, M., Alam, A., & Sultana, S.** (2001). Asafetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. *Life sciences*, 68(16), 1913-1921.

-**Sellis, D., Guérin, F., Arnaiz, O., Pett, W., Lerat, E., Boggetto, N., Krenek, S., Berendonk, T., Couloux, A., Aury, J.-M., et al.** (2021). Massive colonization of protein-coding exons by selfish genetic elements in *Paramecium* germline genomes. *PLoS Biol* 19, e3001309. doi/10.1371/journal.pbio.3001309.

- **Sies, H.** (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.

T

-**Takeoka, G.**, (2001). Volatile constituents of Asafetida. In: Takeoka, G.R., Guntert, M., Engel, K.-H. (Eds.), *Aroma Active Compounds in Foods*. American Chemical society, Washington, DC, pp. 33–44.

-**Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E.**, 1976. *Pharmacognosy*, seventh ed. Lea & Febiger Philadelphia.

V

-**Van Houten, J.** (2023). A Review for the Special Issue on Paramecium as a Modern Model Organism. *Microorganisms*, 11(4), 937.

W

-**Wachtel-Galor S, Benzie IFF.** Herbal medicine. In: Benzie I, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2011. ISBN: 13: 978-1-4398-0713-2

-**Wang, Y., Wang, Y., Sheng, Y., Huang, J., Chen, X., Al-Rasheid, K. A., & Gao, S.** (2017). A comparative study of genome organization and epigenetic mechanisms in model ciliates, with an emphasis on Tetrahymena, *Paramecium* and Oxytricha. *European Journal of Protistology*, 61, 376-387.

-**Weckbecker, G., & Cory, J. G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.

-**WHO.** (2005). *National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines*. Geneva: World Health Organization.

-**Wilkes.C.D.** (2014). Thèse de Doctorat : Ciblage & élimination des transposons et de leurs vestiges lors des réarrangements programmés du génome somatique de la paramécie, p7, p 9,p12.

Y

-**Yang, X., Song, Y., Kai, J., & Cao, X.** (2012). Enzymatic biomarkers of earth worms Eisenia fetida in response to individual and combined cadmium and pyrene. *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, 162-167.

Z

-Zellagui, A., Gherraf, N., Rhouati, S. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* leaves, endemic in Algeria. *Organic Medicine and Chemical Letters*, 2, 31–38.

Annexe

1. Matériels



Figure 1: Spectrophotomètre UV-visible (JENWAY 6705)



Figure 2 : Étuve 25.5°C



Figure 3 : Centrifugeuse

Annexe

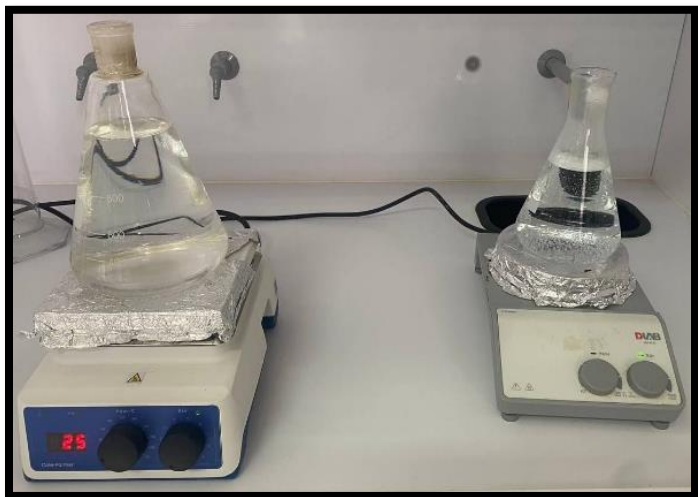


Figure 4 : Plaque agitatrice



Figure 5 : Balance de précision



Figure 6 : Microscope optique



figure 7 : Balance de laboratoire

Annexe

2. Méthode de préparation milieu de culture

Tableau 1 : Différentes combinaisons d'ingrédients du milieu de culture *Paramecium*.
(Azzouzet *al*,2011)

Quantity (g.L ⁻¹) \ Ingredient	Hay	Lettuce	Wheat plant	Cucumber rind	Potato rind	Yeast	Peanut
	2	2	2	1	1	0.5	0.5
Com. 1	+						
Com. 2		+					
Com. 3	+					+	+
Com. 4		+				+	+
Com. 5	+	+				+	+
Com. 6	+	+	+			+	+
Com. 7	+	+	+	+		+	+
Com. 8	+	+	+	+	+		
Com. 9	+	+	+	+	+	+	+

(Com.: combination).

3. Résultats de SPSS

L'analyse de ces résultats est réalisée par le logiciel SPSS (Version 20.0)

L'analyse de la variance (ANOVA) des protéines totales

Tableau 1 : ANOVA des protéines totales

ANOVA

protien T

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,000	4	,000	,000	,000
Within Groups	5,000	10	,000		
Total	6,000	14			

Taux de protéines totales

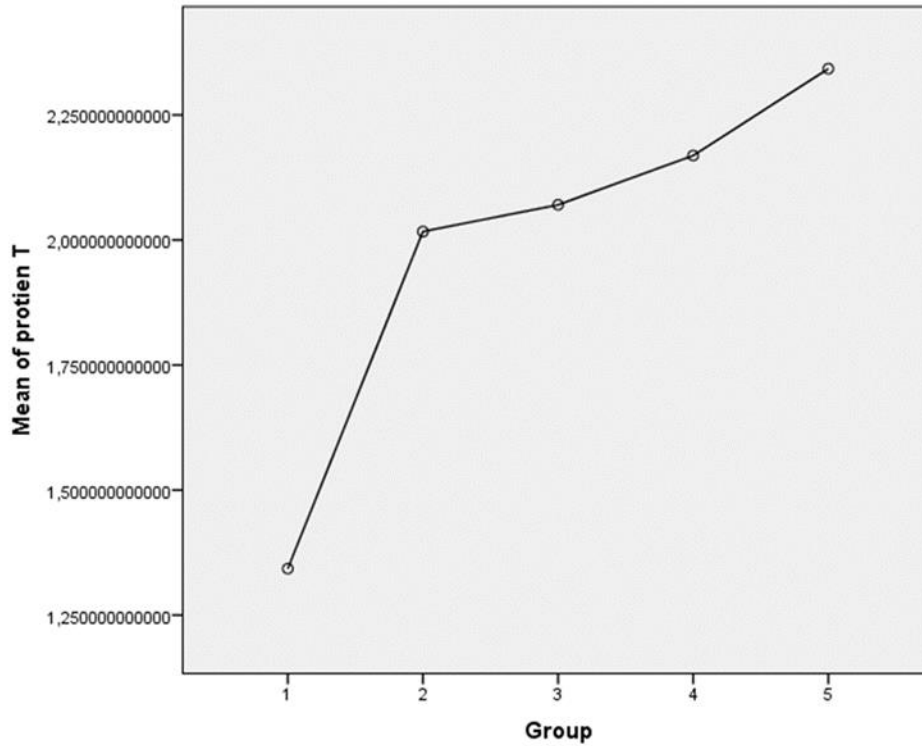


Figure : Moyenne de protéines T en fonction de groupe

L'analyse de la variance (ANOVA) de GSH

Tableau 2 : ANOVA de GSH

ANOVA

GSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2183,000	4	545,000	3,000	,035
Within Groups	1368,000	10	136,000		
Total	3552,000	14			

Taux de GSH

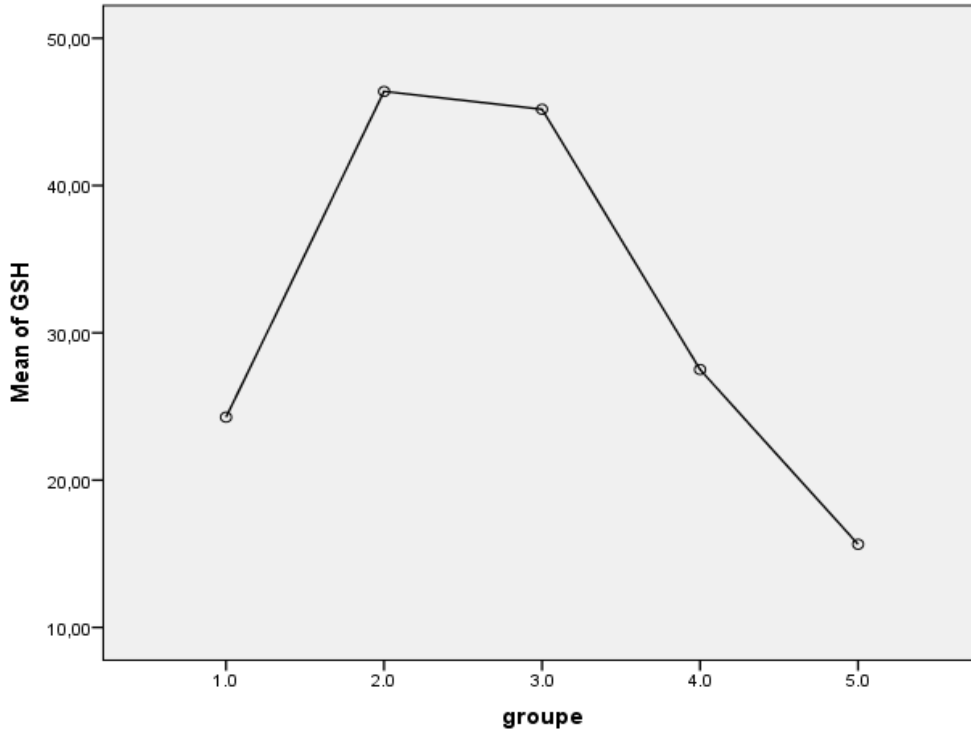


Figure : Moyenne de GSH en fonction de groupe

L'analyse de la variance (ANOVA) de GST

Tableau 3 : ANOVA de GST

ANOVA

GST

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3007625,000	4	751906,000	26,088	,000
Within Groups	288224,000	10	28822,000		
Total	3295850,000	14			

Taux de GST

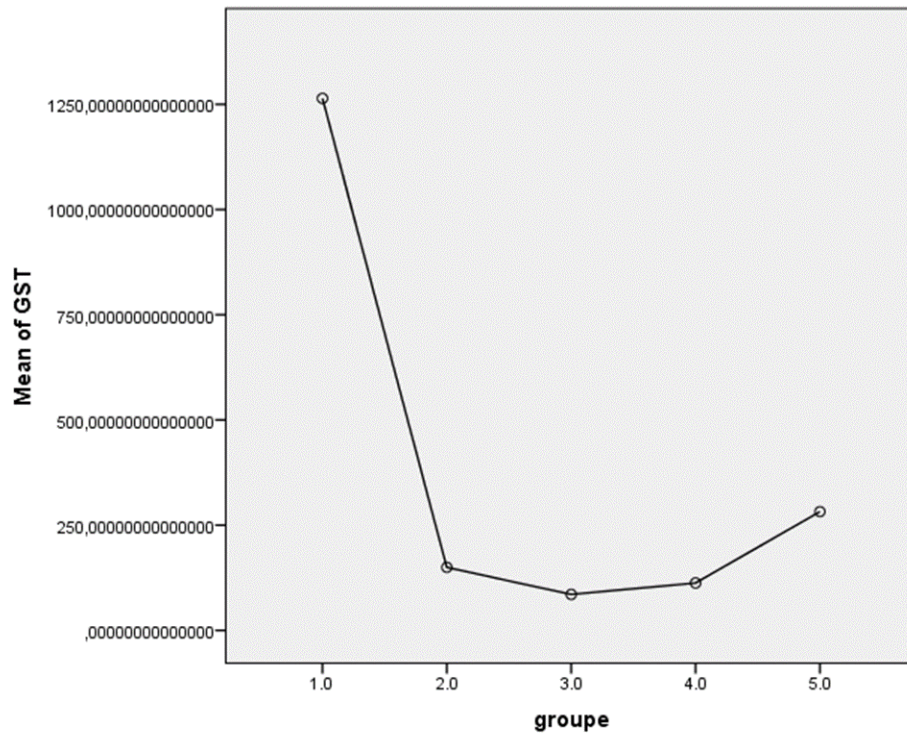


Figure : Moyenne de GST en fonction de groupe