

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Spécialité/Option : Biodiversité Et Ecologie Des Zones Humides

Département : Ecologie et Génie de l'environnement

Thème

Toxicité Chronique Du Nitrate Sur *Daphnia Magna*

Présenté par :

✚ BADACHE Soumia
✚ TALBI Awatif

Devant la commission composée de :

Pr. Chenafi F	Présidente	Université de Guelma
Dr. Baaloudj A	Encadreur	Université de Guelma
Dr. Touati L	Co-encadreur	Université de Constantine
Dr. Atoussi S	Examineur	Université de Guelma
Dr. Yalles A	Membre	Université de Guelma
Dr. Derbal N	Membre	Université de Guelma
Dr. Nedjah R	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

Remerciement

Avant tout, nous tenons à remercier le dieu le tout puissant qui avec son vouloir et pouvoir nous sommes arrivées à réaliser ce modeste travail.

Au terme de ce travail, nous sommes très heureuses de pouvoir exprimer nos sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciement au **Dr.BAALOUJ.A** d'avoir pris la responsabilité de diriger ce travail, ses conseils, ses orientations et ses critiques m'ont été très bénéfique tout au long de cette étude.

Nos remerciements les plus profonds au **Dr.TOUATIL** qui a encadré la partie pratique de notre étude avec une patience, compétence, sourire et conseils avisés.

Nos remerciements les plus profonds s'adressent au **Pr.CHENAFI.F** qui nous fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance.

Nos remerciements au **Dr.ATOUSLS** pour avoir accepté très aimablement de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Merci également au **Dr.BOURIACH.M** pour son aide et sa présence positive.

A nos familles qui nous a encouragé, aidée et soutenue tout de nos parcours universitaire.



Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents **Belkacem** et **Khadija**, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et vous procurer une longue vie.

A mes chers frères, **Karim** et **Sami**, pour leur appui et leur encouragement, leur présence malgré la distance qui nous sépare.

A mes chères sœurs **Meriem** et **Sabrina** pour leur encouragement permanents, et leur soutien moral.

A mon mari **Kamel** qui a toujours été à mes côtés, merci d'être toujours là pour moi

A **Wafa**, **Ismahan**, **Madjid**, **Ali**, pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.

A mes chers petits Neveux et Nieces **Islem**, **Youness**, **Ala** et **Ines**.

A ma chère belle-mère **Dalila** et mon beau père **Mourad**. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé.

A mon beau-frère bien aimé et belles sœurs **Bilel**, **Sarah**, **Chaima** .Merci de m'avoir accueilli parmi vous.

A toute ma famille ainsi qu'à mes amis.

A ma belle binôme **Awatif** et à toute sa famille.

A tous ceux qui, par mot, m'ont donné la force de continuer. .

« *Soumia* »



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouverts et une immense joie, je dédie mon travail à :

Ma chère mère **MALIKA** et mon cher père **AMMAR**, qui m'ont comblé de bonheur par leur douce affection, et en reconnaissance de leurs divers sacrifices dans cette vie juste pour me hisser vers le savoir. Que dieu leur préserve une longue vie et bonne santé.

À mes très chères sœurs : **SAMIHA, HANANE** et **IMANE** pour leurs soutien, tendresses et leurs encouragement qui m'ont facilité les choses tout au long de mes études.

À mes chers petits Neveux et nièce : **SIRAGE, FIRAS** et **RITAGE** que j'adore.

À mes amis : **ZINEB** et **YASMINE** pour leurs présence à mes côtés.

À **FAOUSI, KHALID** et **IHCENE** pour leurs encouragements.

À ma binôme **SOUMIA** et pour toute leur effort et leur patient.

À Mme **BAALOU DJ** pour leur soutien moral qui m'a donné d'un bon souffre pour achever ce projet.

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

« Awatif »

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Chapitre 1 : Biologie et écologie de *Daphnia magna*

1.1. Description de <i>Daphnia magna</i>	03
1.2. Classification	03
1.3. Morphologie	03
1.4. Alimentation	05
1.5. Reproduction	05
1.5.1. Reproduction asexuée	05
1.5.2. Reproduction sexuée	05
1.6. La différence entre les deux sexes	07
1.7. La longévité	07
1.8. Développement	07
1.9. Ecologie générale	08
1.10. Communication et perception	09
1.11. Rôles de l'écosystème	09
1.12. Intérêt écotoxicologique.....	09
1.13. Evaluation de la toxicité chronique en milieu aquatique	10
1.13.1. Tests de reproduction standardisés chez <i>Daphnia magna</i>	10
1.14. Etude de la toxicité sur plusieurs générations.....	11

Chapitre 2 : La pollution par le nitrate

2.1. Le nitrate	12
2.2. Propriété Générale	12
2.2.1. Propriétés chimiques	12
2.2.2. Propriété biologiques	13
2.3. Source et contamination	13
2.4. Pollution de l'eau par les nitrates	14

2.4.1. L'eutrophisation	14
2.5. Effet sur les organismes	14
2.6. Effets sur l'environnement	15
2.7. Écotoxicité	15
2.8. Utilisations	15
Chapitre 3 : matériel et méthodes	
3.1. Matériel	17
3.1.1. Matériel biologique (bio indicateur)	17
3.1.2. Matériel expérimental	17
3.2. Méthodes	19
3.2.1. Culture de <i>Daphnia magna</i>	19
3.2.2. Préparation de l'infusion de l'épinard	19
3.2.3. Mode opératoire	19
3.2.4. Analyses statistiques	20
Chapitre 4 : Résultats et discussion	21
4.1. Résultats	21
4.1.1. La taille des femelles adultes à la 1 ^{ère} ponte	21
4.1.2. La taille des juvéniles à la 1 ^{er} ponte	21
4.1.3. La longévité	22
4.1.4. Nombre de descendants par femelle	23
4.1.5. Intervalle de ponte	23
4.1.6. Grandeur de ponte	24
4.1.7. Nombre de ponte par femelle	25
4.1.8. Embryotoxicité	25
4.1.9. Le poids	26
4.1.10. Age des femelles à la 1 ^{ère} ponte	26
4.1.11. La survie	27
4.2. Discussion	28
Conclusion et perspective	30
Références bibliographiques	32
Références webographie	37
Résumés	

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Pages
01	Embryotoxicité en pourcentage des males du <i>Daphnia magna</i> .	26
02	pourcentage du taux de survie des daphnies dans les différentes concentrations.	28

Liste des figures

Figure	Titres	Pages
01	a. Photo de <i>Daphnia magna</i> , femelle adulte. b. Anatomie de <i>Daphnia</i>	04
02	Cycle de vie de <i>D. magna</i> .	06
03	Reproduction de la <i>D. magna</i> par parthénogénèse en condition favorables, au cours vingt et un jour d'après	06
04	Œufs de durée ou éphippies de <i>D.magna</i>	06
05	Femelle de <i>D. magna</i> (A) et mâle de <i>D. magna</i> (B)	07
06	Différents stades de développement embryonnaire chez <i>Daphnia magna</i>	08
07	(a) Vue planaire de la structure de l'ion nitrate. (b) Vue en 3D de la structure de l'ion nitrate	13
08	Source principale de pollution	14
09	Matériel utilisé	19
10	Etape d'un test chronique en cours de la réalisation	21
11	Variation de la taille des femelles adultes à la 1 ^{ère} ponte dans les différentes concentrations.	22
12	Variation de la taille des juvéniles des daphnies a la 1 ^{er} ponte dans les différentes concentrations.	22
13	Variation de la longévité chez les daphnies dans les différentes concentrations.	23
14	Variation du nombre de descendants par femelle dans les différents concentration.	24
15	Variation de l'intervalle de ponte moyenne dans les différentes concentrations.	24
16	Variation de la grandeur de ponte moyenne des daphnies dans les différentes concentrations.	25
17	Variation du nombre de ponte par femelle dans les différents concentration.	26
18	Variation du poids des femelles à la fin du test (21jours) chez <i>Daphnia magna</i> pour des différentes concentrations.	27
19	Variation de l'âge des femelles à la première ponte chez <i>Daphnia magna</i> pour les différentes concentrations.	27

Liste des abréviations

D.magna : *Daphnia magna*.

ISO : International Standards Organisation.

OCDE : Organization for Economic Cooperation and Development.

USEPA : U.S. Environmental Protection Agency.

ASTM : American Society for Testing and Materials.

FA : First antennae (première antenne).

CE : Carapace edge (bord de la carapace).

NO₃⁻ : ion de nitrate.

N₂ : diazote.

***** : (p<0,1)

****** : (p<0,01)

******* : (p<0,001)

Introduction :

Dans l'environnement en général, et plus particulièrement dans les écosystèmes aquatiques continentaux, les organismes vivants sont soumis à l'influence de multiples substances de nature et d'origine diverses (Boukelia, 2015). L'équilibre des milieux naturels a un impact positif sur la biodiversité, soit au niveau aquatique, terrestre où aérien, seulement de nos jours on s'aperçoit que le système écologique commence à se perturber. Celles-ci sont observées sur les différents niveaux d'organisation (moléculaire, cellulaire, tissulaire, organisme, individus, population) à cause de ces perturbations l'intervention de l'écotoxicologie est nécessaire pour chercher des nouvelles méthodes et des solutions urgentes et fiables pour donner l'espoir à retrouver notre équilibre écologique, parmi ces méthodes on trouve les tests écotoxicologiques qui donnent un aperçu significatif illustrant les interactions entre les êtres vivants et les différents éléments du milieu (Zeroual, 2016).

Dans notre sujet, on prend le cas de nitrate, l'augmentation de ce paramètre dans les écosystèmes aquatiques est reconnue par la pollution. Cette dernière est engendrée soit naturellement (érosion, météorisation.. ect), soit par les rejets anthropiques, et pour tester leurs effets sur une de ces espèces bio-indicatrices et sensibles aux différents changements des paramètres physico-chimiques des eaux douces qui s'appelle *Daphnia magna* (Zeroual, 2016).

Le genre des *Daphnidae* et spécialement *Daphnia magna* a été adopté depuis de longues années dans les essais de toxicité normalisés. Les daphnies représentant des invertébrés d'eau douce, constituent en effet une espèce clé dans les écosystèmes aquatiques. La survie, la croissance et la reproduction des daphnies dans de bonnes conditions assurent la pérennité des environnements aquatiques. Ainsi, les daphnies sont utilisées par différentes instances internationales pour l'évaluation du potentiel toxique des différents polluants de l'environnement (OCDE., 1998 ; US EPA., 2002).

Le but de cet mémoire est d'étudier les effets de la toxicité chronique de nitrate sur les différents paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna* (taille des femelles adultes à la première ponte, taille des juvéniles à la première ponte, la longévité, intervalle de ponte, âge à la première ponte, grandeur de ponte, nombre de ponte

Introduction

moyen par femelle, nombre de descendants produits par femelle, nombre total des individus au cours de ce test...).

Pour atteindre l'objectif précédemment évoqué, l'étude se décompose en quatre parties principales :

- ✓ Le premier chapitre présente une étude de la biologie et l'écologie de *Daphnia magna*.
- ✓ Le deuxième est réservé à la pollution par les nitrates.
- ✓ Le troisième chapitre englobe le matériel et les méthodes utilisées dans cette présente étude.
- ✓ Le quatrième chapitre traite les résultats et leur discussion.

Enfin, on termine par une conclusion et perspectives.

Chapitre 1 : Biologie Et Ecologie De *Daphnia Magna*



1.1. Description de *Daphnia magna* :

Les daphnies sont des petits crustacés zooplanctoniques herbivores ou détritivores (Mulhaser et Monier, 1995) visibles à l'œil nu, mesurant d'un à cinq millimètres, de la famille du genre *Daphnia* phyllopoètes cladocères, connu également sous le nom de « puce d'eau ». Elle se distribue largement dans les eaux douces non courantes des zones à climats tempérés. Ce cladocère assure une fonction importante dans les transferts de matière et d'énergie des écosystèmes aquatiques. Sa couleur peut varier du transparent au brun en fonction de la nourriture ingérée mais peut également devenir rouge si le taux d'oxygène contenu dans l'eau est très faible. La vigueur de leur mouvement et la rapidité des battements cardiaques donnent l'impression d'une chose intensivement vivante.

1.2. Classification :

La classification de la daphnie (Pacaud, 1939).

Embranchement : Arthropodes

Classe : Crustacés

Sous-classe : Brachiopodes

Ordre : Cladocères

Famille : Daphniidae

Genre : *Daphnia*

Espèce : *Daphnia magna*

1.3. Morphologie :

Daphnia magna est un micro-crustacé largement distribué dans les eaux douces non courantes des zones climatiques tempérées. Sa taille varie entre 3 et 5 mm à l'âge adulte. La figure 1 présente un schéma d'une daphnie. Elle est subdivisée en 2 parties : la tête et le corps

La tête : comporte les yeux, la bouche et 2 antennes qui servent à la locomotion.

Le corps : est protégé par une carapace transparente qui est changée lors des mues. Cette carapace est terminée par une épine apicale.

Le tube digestif : traverse tout le corps de la daphnie et se termine au niveau de la griffe post-abdominale.

La partie ventrale : est équipée d'appendices qui filtrent le phytoplancton.

La partie dorsale : est constituée d'une cavité qui joue le rôle d'une chambre de maturation pour les œufs.

Le cœur : est situé au-dessus de la chambre de maturation. Quant aux ovaires, ils sont placés de part et d'autre de l'intestin.

Le système nerveux : est caractérisé par un ganglion cérébral, localisé entre l'œil et le début du tube digestif.

Le système circulatoire : des daphnies est lacunaire et le transport de l'oxygène se fait à l'aide d'hémoglobine (Manar, 2008).

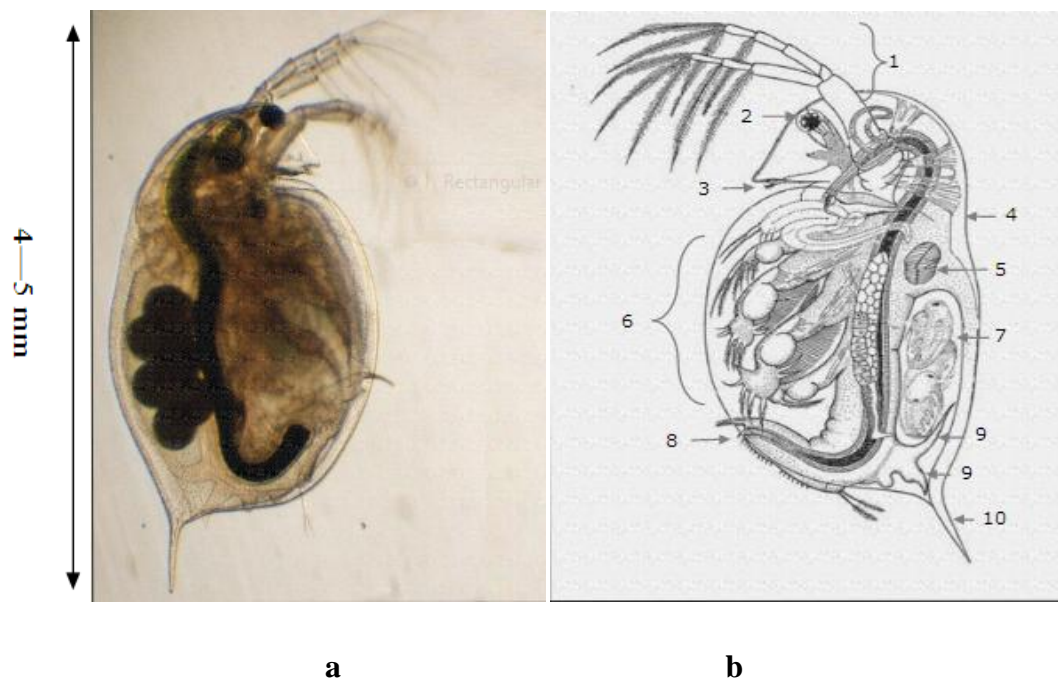


Figure 1 : a. Photo de *Daphnia magna*, femelle adulte. b. Anatomie de *Daphnia*. Antennes (1) ; Œil (2) ; Antennules (3) ; Carapace (4) ; Cœur (5) ; Appendices Thoraciques (6) ; Poche incubatrice (7) ; Anus (8) ; Appendices caudaux (9) ; Epine apicale (10) (d'après Dieter, 2005 in Manar, 2008).

1.4. Alimentation :

D. magna est adaptée à la survie dans les blooms algaux, qui sont riches en protéines et en carbohydrates, où elle se nourrit d'algues et de bactéries malgré sa préférence pour les bactéries (Hadas et *al.*, 1983). La qualité et la quantité de la nourriture affectent la sensibilité de *Daphnia* aux polluants et son taux de reproduction. Keating et Dagbusan (1986), ont montré que les daphnies nourries par les diatomées sont plus tolérantes aux polluants que celles nourries par les algues vertes seulement. Mais, en général les réserves lipidiques sont un bon indicateur des conditions de nutrition chez les daphnies (Tessier et Goulden, 1982 ; Holm et Shapiro, 1984).

1.5. Reproduction :

La daphnie peut se reproduire en deux modes de reproduction selon les conditions du milieu (sexuée et asexuée) (Fig 2) :

➤ **Reproduction asexuée :**

Quand les conditions du milieu sont optimales et favorables la reproduction des daphnies est asexuée, ce qu'on appelle la reproduction par parthénogenèse *D. magna* donne au cours de ce type de reproduction six pontes (Zeman, 2008) et qui sont toutes des femelles (Ebert, 2005), (Fig 3).

➤ **Reproduction sexuée :**

Lorsque les conditions de vie deviennent défavorables (froid, manque de proies, stress, forte densité de population, anoxie, dystrophisation), les daphnies donnent naissance à une génération composée de mâles et de femelles. Après fécondation, deux œufs dits « éphippie » ou œufs de durée de 200 μm (Fig 4), qui donnent naissance à une population génétiquement différente des daphnies mères (Chèvre, 2000).

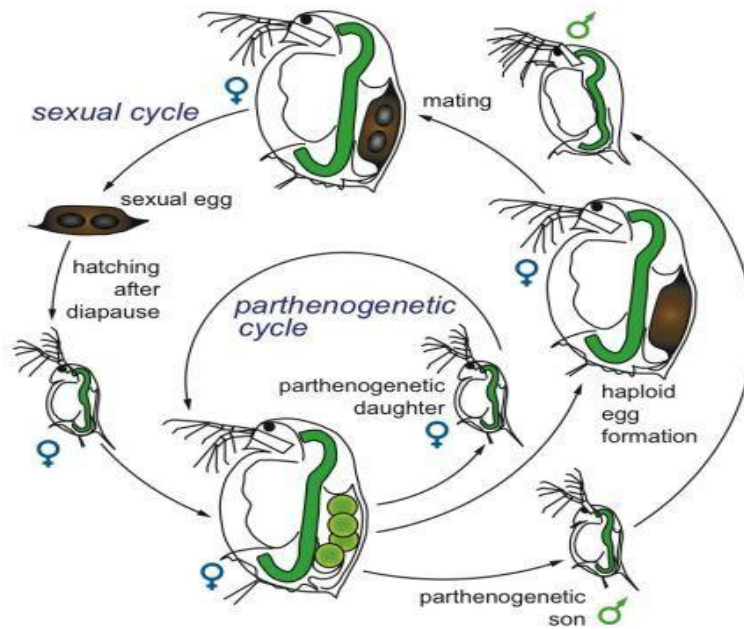


Figure 2 : Cycle de vie de *D. magna* (Ebet, 2005).



Figure 3 : Reproduction de la *D. magna* par parthénogénèse en condition favorables, au cours vingt et un jour d'après (Zeman, 2008).

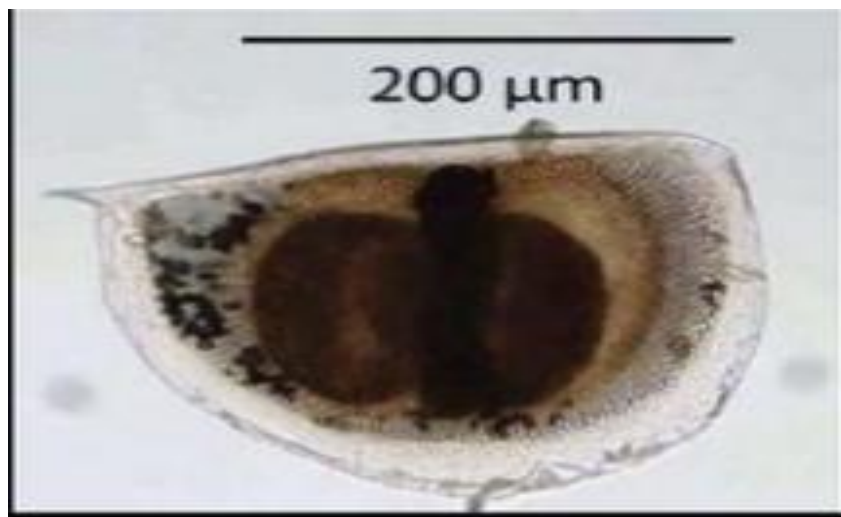


Figure 4 : Œufs de durée ou éphippies de *D. magna* (Boehler et al., 2012).

1.6. La différence entre les deux sexes :

D'après (Olmstead et *al.*, 2002) la différence entre les 2 sexes est visible par la taille de l'antenne primaire qui est grande chez les mâles. Une autre différence réside dans la forme du bord de la carapace. Les femelles ont des carapaces symétriques par contre, les mâles ont des carapaces asymétriques et terminés par des soies (Fig 5).

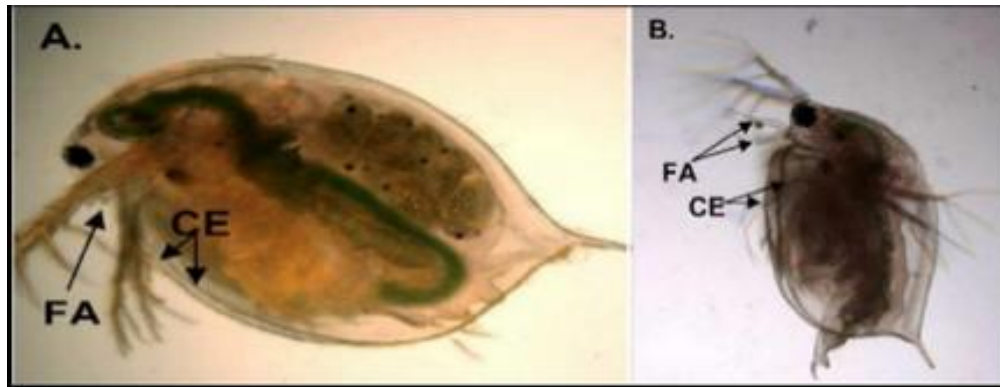


Figure 5 : Femelle de *D. magna* (A) et mâle de *D. magna* (B) (Olmstead et *al.*, 2002).

(FA : first antennae) (CE : carapace edge) (A : femelle) (B : mâle)

1.7. La longévité :

La durée de vie de *Daphnia* varie avec la température :

Daphnia magna vit environ 108 jours à 8 °C mais également 45 jours à 18 °C et 29 jours seulement à 28 °C (Green, 1954). L'augmentation de la température cause une augmentation de la vitesse du métabolisme. Ainsi l'animal va épuiser son énergie rapidement et meurt plus tôt (Touati & Samraoui, 2002 ; Chakri, 2007).

1.8. Développement :

Les étapes du développement d'un embryon normal chez les daphnies sont divisées en 6 stades distincts (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001) (Fig 6).

Stade 1 : clivage, l'embryon est parfaitement sphérique, pas de différenciation cellulaire. Ce stade se déroule entre 0 et 15 heures.

Stade 2 : gastrulation, début de la différenciation cellulaire, présence du blastopore et l'embryon devient =asymétrique. Ce stade se déroule entre 15 et 25 heures.

Stade 3 : maturation embryonnaire précoce, la tête et l'antenne secondaire sont différenciés. Ce stade se déroule entre 25 et 35 heures.

Stade 4 : maturation embryonnaire moyenne, présence de l'œil pigmentée et développement des antennes qui restent collés à la seconde membrane embryonnaire. Ce stade se déroule entre 35 et 45 heures.

Stade 5 : maturation embryonnaire tardive, rupture de la seconde membrane embryonnaire, extension partielle de l'antenne secondaire et l'épine est pliée sous la carapace. Ce stade se déroule entre 45 et 50 heures.

Stade 6 : développement complet du nouveau-né, développement des antennules et l'épine est bien décollée de la carapace. L'organisme commence à nager (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001).

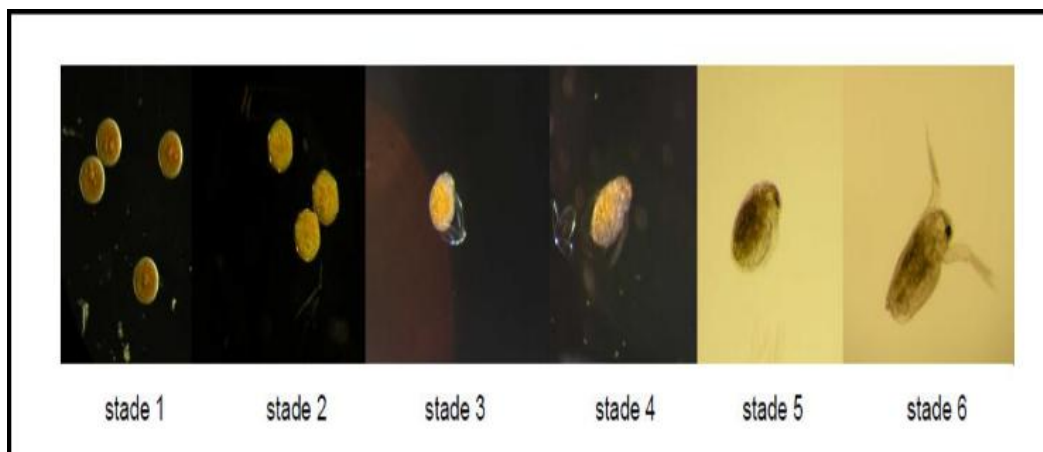


Figure 6 : Différents stades de développement embryonnaire chez *Daphnia magna* (Kast-Hutcheson et *al.*, 2001).

1.9. Ecologie générale :

Les populations de *Daphnia* sont généralement rares en hiver et au début du printemps. Mais avec l'augmentation de la température de l'eau (6 à 12°C), les populations augmentent leur abondance et atteignent des densités élevées de 200 à 500 individus/l (Pennak, 1989). Les populations dans les étangs diminuent de façons importantes leurs effectifs en été. Par contre, en automne, il peut y avoir une seconde pulsation de la population avant la diminution en hiver.

1.10. Communication et perception :

Ces puces d'eau ont un œil composé qui répond à la lumière stimulus, peut percevoir des longueurs d'onde de couleur différente, et peut également suivre les mouvements. Elles utilisent également des repères olfactifs et chimiques pour les aider à localiser et à évaluer les sources potentielles de nourriture, les conspécifiques

et les prédateurs potentiels. (Consi, et *al.*, 1990 ; Roozen et Lüring, 2001 ; Young, 1974).

1.11. Rôles de l'écosystème :

Ces puces d'eau consomment des algues, des bactéries et des détritiques dans l'eau. Ils jouent un rôle clé dans les réseaux alimentaires aquatiques en tant que proies des poissons et des invertébrés. (Ebert, 2005 ; Hooper et *a.*, 2008). Cette espèce est l'hôte d'un certain nombre de bactéries (dont une causant la maladie des cellules adipeuses blanches) et des champignons, ainsi que certaines espèces de nématodes, amibes et ténias (Ebert, 2005).

1.12. Intérêt écotoxicologique :

L'utilisation d'un organisme dans les tests d'écotoxicologie pour l'évaluation de la qualité de l'environnement suppose qu'il répond à certains critères ;

- (1) la pertinence écologique.
- (2) la sensibilité aux contaminants.
- (3) la facilité de manipulation au laboratoire.
- (4) la description détaillée de sa taxonomie.
- (5) la durée du cycle de reproduction qui doit être courte.
- (6) le potentiel de développer des biomarqueurs.

Les cladocères, et spécialement les daphnéidées, ont été largement utilisés dans la toxicologie aquatique. La sélection des daphnies dans les tests de toxicité a été favorisée par leur sensibilité pour une large gamme de toxiques (Adema, 1978 ; Slooff et *al.*, 1983 ; Kimerle, 1985 ; Persoone et Janssen, 1993).

De même, ces espèces présentent un grand intérêt écologique pour les milieux dulçaquicoles à en juger par leur large distribution et leur rôle dans la chaîne trophique. En effet, le genre *Daphnia* est largement répandu dans les eaux douces stagnantes de l'arctique aux tropiques (Fernando et *al.*, 1987 ; Haney et Buchanan, 1987). La présence de ce genre est rapportée dans les différents états trophiques des

cours d'eau et dans les différentes tailles et morphologies des habitats aquatiques en allant des étangs ou des lacs peu profonds à la zone pélagique des grands lacs et des réservoirs (Kasprzak et Schwabe, 1986 ; Benndorf, 1990 ; Flössner, 2000 ; Horn, 2003 ; Jeppesen et *al.*, 2004). Dans la majorité de ces systèmes, les daphnies dominent la communauté des zooplanctons en termes d'abondance et de biomasse durant certains intervalles de temps. Étant donné que les daphnies jouent un rôle important dans la chaîne trophique des lacs, les scientifiques les ont désignées comme espèces clés dans les systèmes pélagiques (Sternier, 1989 ; Carpenter et Kitchell, 1993).

Les daphnies représentent beaucoup d'avantages pour les tests d'écotoxicité. Outre la facilité d'élevage de cette espèce favorisant son utilisation par plusieurs laboratoires. La reproduction par parthénogenèse permet d'avoir une population génétiquement stable. De même, son cycle de vie assez court permet de suivre l'effet des polluants sur plusieurs générations. En plus, étant des consommateurs primaires, se situant entre les producteurs et les consommateurs supérieurs ; les daphnies jouent un rôle clé dans la chaîne trophique. Ainsi, toute perturbation de la biologie des daphnies se répercuterait sur l'écosystème aquatique (eutrophisation par augmentation des algues, diminution de la quantité des poissons...).

Toutes ces raisons ont encouragé l'adoption de cette espèce pour la normalisation au niveau international dans les essais de toxicité à court et à long terme. Les tests de toxicité standardisés incluent des tests aigus qui se déroulent sur 24 ou 48 h et des tests chroniques qui se déroulent sur 14 ou 21 jours (OECD., 1984, 1998 ; US EPA., 1989 ; ISO., 1996 ; ASTM., 2001). D'autres espèces de daphnies sont utilisées dans les tests de toxicité (L'US EPA., 2002).

1.13. Évaluation de la toxicité chronique en milieu aquatique :

♦. Tests de reproduction standardisés chez *Daphnia magna* :

Les tests de toxicité chroniques ont été utilisés depuis longtemps pour estimer la toxicité des polluants qui se trouvent dans l'environnement pour de longues périodes et à faibles doses. Ces tests permettent de détecter des effets à de très faibles doses surtout si la durée d'exposition est longue. À part la mortalité qui est le paramètre commun pour les essais chroniques et aigus, autres paramètres peuvent être mesurés lors des essais à long terme.

La reproduction et la croissance sont étudiées et sont généralement plus sensibles que la mortalité. Le seul test recommandé pendant longtemps pour les tests chroniques chez les invertébrés a été celui de la reproduction 21 jours avec *D. magna*.

Cet intérêt est porté pour cette espèce à cause de sa sensibilité aux contaminants environnementaux par rapport aux autres invertébrés (Adema, 1978 ; Slooff et *al.*, 1983; Kimerle, 1985). La focalisation sur cette espèce a permis d'avoir un grand nombre de résultats de toxicité chronique.

L'exploitation des données du test de reproduction a permis d'obtenir un indice de la croissance de la population. Ainsi, le test de reproduction permet de calculer le taux interne de la croissance naturel (r) qui est un paramètre démographique qui exprime le potentiel de croissance de la population dans un environnement illimité. Le calcul de ce paramètre permet d'estimer l'effet toxique sur la population exposée au laboratoire en intégrant la survie et la fécondité, ce qui traduit la pertinence écologique des résultats obtenus (Van Leeuwen et *al.*, 1985).

1.14. Etude de la toxicité sur plusieurs générations :

Dans le test standard de la reproduction chez *D. magna*, l'effet des substances chimiques sur la capacité de reproduction est déterminé afin d'évaluer les répercussions sur la population. Les paramètres observés sont la survie, le nombre de petits par mère, le temps de la maturation et la croissance (OCDE 211). Il est évident que ces paramètres sont la base de la dynamique de la population.) Mais, ils ne prennent pas en considération l'état de santé de la progéniture. Bien que la descendance puisse être affectée par les substances testées, l'état de santé des petits n'est pas intégré dans l'évaluation des risques en se basant sur le test reproduction standard existant. En effet, le test suit le comportement de daphnies issues de cultures soumis à des conditions optimales. Avec ce protocole, le test se fait sur une seule génération et les petits pondus lors de l'expérience sont éliminés chaque jour. L'évaluation de l'effet de la substance testée sur la santé des petits obtenus dans des conditions d'intoxication peut être réalisée par le lancement d'un nouveau test de reproduction sur des individus de la deuxième génération. Cette démarche serait nécessaire pour mieux approcher l'effet du toxique sur la population (Hammers-Wirtz et Ratte, 2000).

Chapitre 2 : La Pollution Par Le Nitrate



2.1. Le nitrate :

Le nitrate (NO_3^-) est un ion produit au cours du cycle de l'azote, particulièrement soluble dans l'eau et responsable d'une pollution des eaux. (Fig.7). La principale source d'azote réside dans l'atmosphère sous forme de diazote (N_2) qui représente un peu moins de 80% de la composition de l'air. Des ions nitrates sont formés au terme d'un processus complexe de transformation de l'azote par des bactéries. Ils sont ensuite assimilés par les plantes. La consommation de légumes et de végétaux constitue ainsi, pour les animaux, dont l'homme, la base de l'alimentation en azote. Le nitrate se prête à de nombreuses utilisations industrielles sous forme de nitrate de potassium, de sodium ou d'ammoniac notamment. Le nitrate est dangereux par sa capacité à se transformer en nitrite aux effets toxiques reconnus [1].

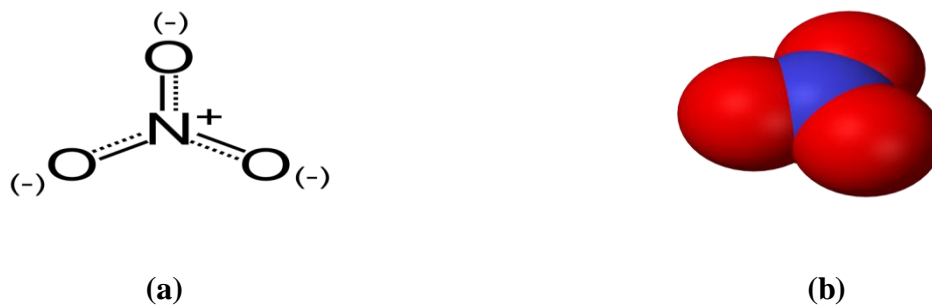


Figure 7 : (a) Vue planaire de la structure de l'ion nitrate [2].

(b) : Vue en 3D de l'ion nitrate [3].

2.2. Propriété Générale :

2.2.1. Propriétés physico-chimique :

Le nitrate (NO_3^-) est un ion naturel présent de façon naturelle dans l'environnement. Il se forme naturellement au cours du cycle de l'azote, notamment lorsque des matières organiques se décomposent, par l'action des bactéries du sol. L'azote organique se transforme par oxydation en composés ammoniacaux puis en nitrates. [Santé Canada, 1992].

Les nitrates étant des sels très solubles dans l'eau ; ils migrent donc aisément dans la nappe phréatique lorsque les niveaux excèdent ce que les plantes peuvent utiliser. Les nitrates sont très utilisés comme engrais minéraux. Ils sont également utilisés dans les explosifs, comme agents oxydants dans l'industrie chimique et

comme agents de conservation. Dans des conditions anaérobies, le nitrate peut se dénitrifier [Adam, 1980].

2.2.2. Propriété biologiques :

L'azote est un élément vital pour la plupart des organismes (comme le potassium et le magnésium), mais les plantes ne savent pas le capter directement dans l'air. Sous forme de nitrate, il est très soluble dans l'eau et alors « bio-disponible » pour les racines. Les nitrates sont en outre des sels qui en tant que tels facilitent ou « forcent » l'entrée d'eau dans les racines et dans la plante (rééquilibrage osmotique)[4].

2.3. Source et contamination :

En raison de la stabilité de l'ion nitrate, la plupart des substances azotées de l'environnement ont tendance à se transformer en nitrates, donc elles sont des sources potentielles de ce dernier [Adam, 1980 ; Egboka, 1984]. Donc les sources les plus courantes de nitrate dans l'eau sont :

- Les engrais chimiques employés pour améliorer la croissance des cultures.
- Les déchets d'origine animale provenant de granges et de sites d'entreposage de fumier.
- Les déchets d'origine humaine provenant de champs d'épuration, ou de fosses septiques ou cuves de rétention non étanches.
- Les sols contenant des composés d'azote provenant de matière organique en décomposition [5].

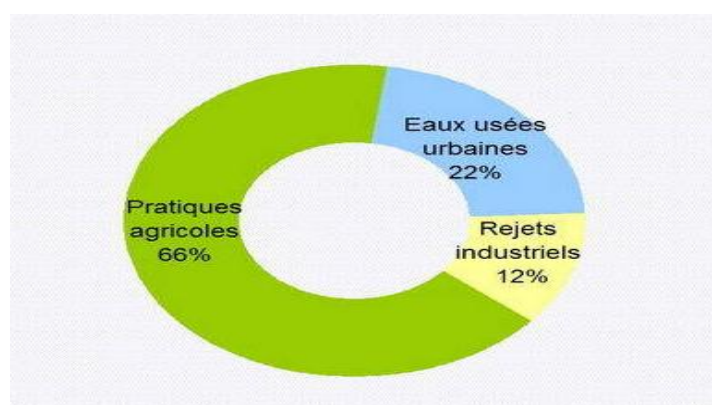


Figure 8 : Source principale de pollution [6].

2.4. Pollution de l'eau par les nitrates :

Des concentrations élevées d'azote dans l'eau, combinées à la présence de phosphore peuvent occasionner une prolifération de plantes et d'algues, qui réduisent la teneur en oxygène, parfois jusqu'à une teneur létale. Dans certains cas, la prolifération d'algues entraîne la production de toxines, qui peuvent nuire à la santé des organismes aquatiques ou des humains qui les consomment [7]. La pollution des eaux par les nitrates présente un double risque. Ingérés en trop grande quantité, les nitrates ont des effets toxiques sur la santé humaine. Par ailleurs, ils contribuent avec les phosphates à modifier l'équilibre biologique des milieux aquatiques en provoquant des phénomènes d'eutrophisation [8].

2.4.1. L'eutrophisation :

Cette forme particulière de pollution est due à un apport excessif en nutriments et en matières organiques biodégradables issus de l'activité humaine. Elle s'observe surtout dans les milieux aquatiques dont les eaux sont peu renouvelées. Ces nutriments proviennent principalement des phosphates contenus dans les détergents et les engrais, et des nitrates contenus dans les engrais azotés, mais aussi de l'ammoniac issu de la décomposition des effluents organiques par des bactéries aérobies.

L'eutrophisation due aux pollutions, encore appelée dystrophisation, ressemble beaucoup à l'eutrophisation naturelle. Mais elle est beaucoup plus rapide, car le milieu reçoit beaucoup plus de nutriments qu'en situation naturelle ainsi que des matières organiques biodégradables [9].

2.5. Effet sur les organismes :

Des concentrations excessives de nitrates dans l'eau potable peuvent causer des maladies graves et parfois mortelles, notamment chez les jeunes enfants. Chez les adultes et les nourrissons, l'effet néfaste est lié à la conversion de nitrate en nitrite dans l'organisme, ce qui interfère avec la capacité du sang à transporter l'oxygène (pouvoir oxyphorique). Cette condition est connue sous le nom de "méthémoglobinémie" ou de "maladie bleue". Parce que les symptômes comprennent l'essoufflement et la cyanose (coloration bleue de la peau). Les nourrissons de moins de trois mois y sont particulièrement vulnérables.

Dans le milieu aquatique, le nitrate est moins toxique que les autres formes de l'azote, comme le nitrite et l'ammoniaque. Toutefois, on trouve de plus en plus d'études qui indiquent qu'il peut avoir des effets néfastes sur le développement des organismes aquatiques aux premiers stades de vie en limitant la capacité du sang à transporter l'oxygène ou en perturbant l'équilibre acido-basique. Bien que le nitrate aux concentrations naturelles n'ait généralement pas d'effet mortel sur les organismes, il peut causer des retards de croissance ou une survie limitée en rendant ces organismes léthargiques [7].

2.6. Effets sur l'environnement :

La présence de nitrate et de phosphore dans les eaux est à l'origine du phénomène dit d'eutrophisation : des algues et des microorganismes se développent et consomment une grande part de l'oxygène qui se trouve dans l'eau. En eau douce, le phénomène d'eutrophisation provient plutôt d'une forte teneur en phosphore alors qu'il tient plutôt à la présence de nitrates en eau de mer, où la formation d'organismes toxiques - bactéries, phytoplanctons et algues vertes responsables, en Bretagne notamment, des fameuses « marées vertes »- peut avoir des effets nocifs et asphyxiants pour les poissons et les crustacés. En particulier, la disparition d'une espèce de moules perlières en France serait due aux nitrates [10].

2.7. Écotoxicité :

La toxicité est liée à l'ion nitrate qui rend le produit soluble dans l'eau, la sève et les fluides corporels. Elle est accrue par sa radio toxicité, d'autant plus qu'il est préparé avec de l'uranium naturel (donc radioactif).

2.8. Utilisations :

Il est principalement utilisé sous trois formes :

1. **Le nitrate de potassium** (autrefois appelé salpêtre). Il est principalement utilisé pour les engrais (apport des éléments potassium et azote), les moteurs de fusées et les feux d'artifice. Il était utilisé dans la fabrication de poudre noire.

2. **Le nitrate de sodium**, autrefois appelé salpêtre du Chili pour le distinguer du nitrate de potassium. Il est utilisé dans la production d'engrais, pour la pyrotechnie, les bombes à fumée, le verre et les émaux, etc.
3. **Le nitrate d'ammonium**. Il est essentiellement utilisé comme engrais. Mélangé à un réducteur comme le fioul, il constitue un explosif. Ce composé est stable ; il doit être amorcé ou être mélangé à un autre corps pour exploser [11].



Chapitre 3 : Matériel et méthodes



3.1. Matériel :**3.1.1. Matériel biologique (bio indicateur) :**

Les daphnies sont des micro-crustacés de l'ordre cladocères, et qui sont considérés comme des espèces sentinelles (bio indicateur), on utilise ces espèces pour évaluer et suivre les risques, et les changements provenant par les différentes substances dans les écosystèmes aquatiques. *Daphnia magna* est l'espèce la plus fiable qui fait l'objet d'un test normalisé (ISO 10706, OCDE 214). Cette espèce a été choisi car :

- ✚ Les daphnies sont des organismes dont la manipulation et l'élevage sont rendus facile.
- ✚ Leur mode de reproduction par parthénogenèse en conditions favorables ne donne que des femelles.
- ✚ Leur fécondité élevée.
- ✚ Leur taille relativement petite.

3.1.2. Matériel expérimental :

- ✓ Aquarium en verre.
- ✓ Pompe et diffuseur d'oxygène.
- ✓ Micromètre.
- ✓ Tubes à essais de 30 ml.
- ✓ Lames.
- ✓ Béchers (100 ml, 200 ml).
- ✓ Boîtes pétri.
- ✓ Pipette.
- ✓ Balance de précision.

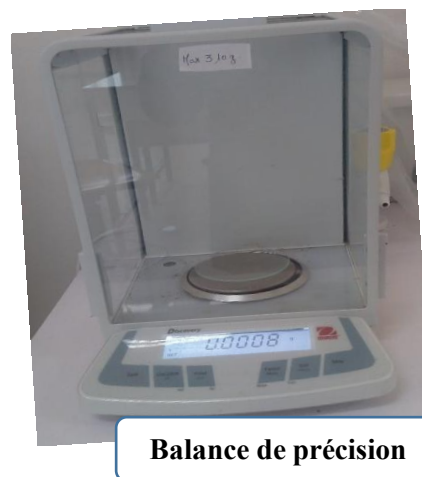
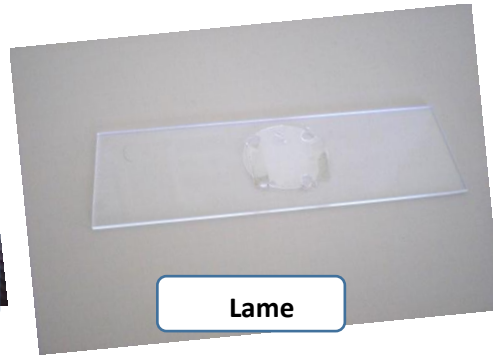
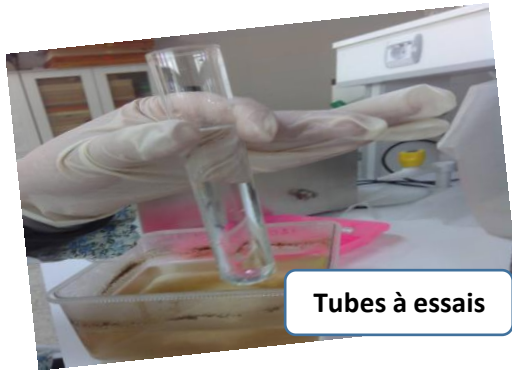


Figure 9 : Matériel utilisé

3.2. Méthodes :

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire du Département d'Ecologie et Génie de L'environnement. Elle vise à étudier la toxicité de nitrate sur *Daphnia magna* pendant une période de 21 jours (test chronique). (ISO 10706 ; OCDE, 2014).

3.2.1. Culture de *Daphnia magna* :

Des spécimens *D. magna* sont introduit dans deux aquariums remplis de deux tiers (2/3) d'eau potable déchlorinée, pour qu'elle s'adapte. Cet élevage est entretenu par un régime constitué d'une pincée de la levure commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*) et l'extrait de l'épinard (*Beta vulgaris maritima*) (Touati et Samraoui., 2002).

3.2.2. Préparation de l'infusion de l'épinard :

Une botte de 1 kg d'épinard lavée, découpée et bouillie dans un litre d'eau de robinet, l'infusion est filtrée dans une bouteille, et conservé dans le réfrigérateur à 4 °C et sera utilisé ultérieurement. (Chakri *et al.*, 2010)

3.2.3. Mode opératoire :

Dans notre travail nous avons adopté un test parmi plusieurs en écotoxicologie, qui est le test chronique ou test à long terme de reproduction sur 21 jours, qui consiste à évaluer l'effet des substances chimiques sur la capacité reproductive de *D. magna* (OECD, 1998). Des jeunes femelles de *D. magna* âgées de moins 24 heure au début de l'essai sont exposées à différentes concentrations (1- 10- 100- 200 mg/l de NO_3) plus le témoin.

Après avoir mis individuellement les juvéniles de *D. magna* dans des tube a essai de 30 ml. On utilise dix (10) répliquas pour chaque concentration (Fig 10). Les daphnies obtenues pendant le test sont observées et mesurés. La longueur des daphnies (du haut de la tête jusqu'à la base de son épine apicale) est mesurée par un micromètre. Le sexe et la morphologie des nouveau-nés sont observés par microscope. Le sexe ratio est défini comme le pourcentage du nombre total des males divisé par le nombre total des juvéniles.

Les paramètres exploités sont :

- La survie.
- Taille des femelles adultes à la première ponte (les mères) en mm.
- Taille des juvéniles à la première ponte (nouveau-né) en mm.
- Age à la première ponte.
- L'intervalle de ponte (moyenne) en jours.
- Grandeur de ponte.
- Le poids.
- La longévité.
- Le nombre des descendants par femelle.
- Le nombre de ponte par femelle durant le test de 21 jours.
- L'embryotoxicité.



Figure 10 : Etape d'un test chronique en cours de la réalisation.

3.2.4. Analyses statistiques :

Pour chaque paramètre, nous avons calculé la moyenne et l'écart type. Nous avons utilisé l'analyse de la variance à un facteur ou l'ordre 1 pour tester l'impact de nitrate sur les paramètres de cycle de vie de *D. magna*. La différence significative est établie à $P < 0,05$.

Chapitre 4 : Résultats et discussion



4.1. Résultats :

4.1.1. La taille des femelles adultes à la 1^{ère} ponte :

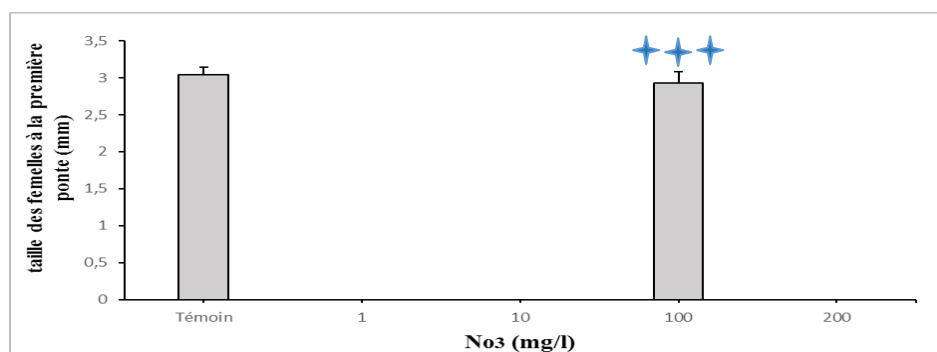


Figure 11 : Variation de la taille des femelles adultes à la 1^{ère} ponte dans les différentes concentrations.

La figure (11) illustre la taille de femelle adulte a la 1^{er} ponte, la taille de femelle est légèrement réduit dans la concentration 100 mg/l de No_3 avec 2,93 mm par rapport au témoin qui est de 3,03 mm, En revanche pour les concentration 10 et 200 mg/l de No_3 les femelles n'arrivent pas a donner la ponte, tel que on a trouvé dans la concertation de 1 mg/l de No_3 la femelle à donner une seule ponte. Les analyses statistiques non significatives que celle dans la concentration 100 mg/l (No_3) est haut significatives ($p < 0.05$).

4.1.2. La taille des juvéniles à la 1^{er} ponte :

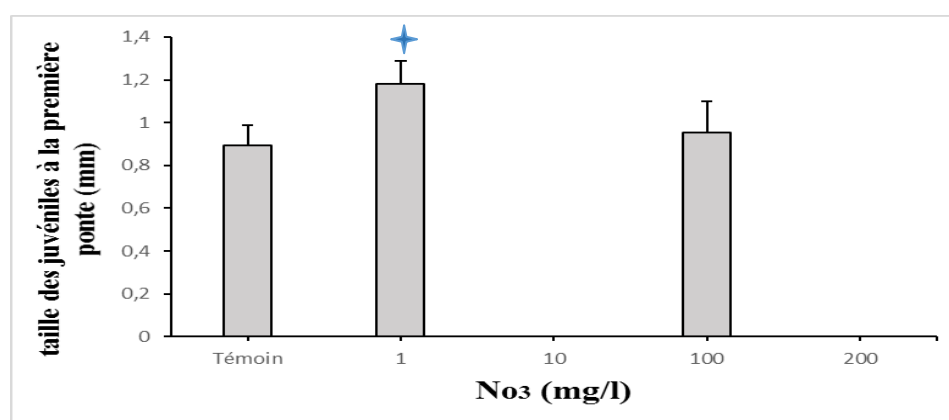


Figure 12 : Variation de la taille des juvéniles des daphnies a la 1^{er} ponte dans les différentes concentrations.

La figure (12) montre que la taille des juvéniles a la 1^{er} ponte élevé dans les concentrations 1 et 100 mg/l de NO_3 par rapport au témoin. Tel que on a trouvé dans les concentrations 10 et 200 mg/l de NO_3 les femelles n'arrivent pas à donner la ponte, les analyses statistiques révèlent l'existence de différences significatives de l'effet de nitrate de la concentration 1 mg/l (NO_3) sur la taille des juvéniles aux 1^{er} ponte ($p < 0.05$).

4.1.3. La longévité :

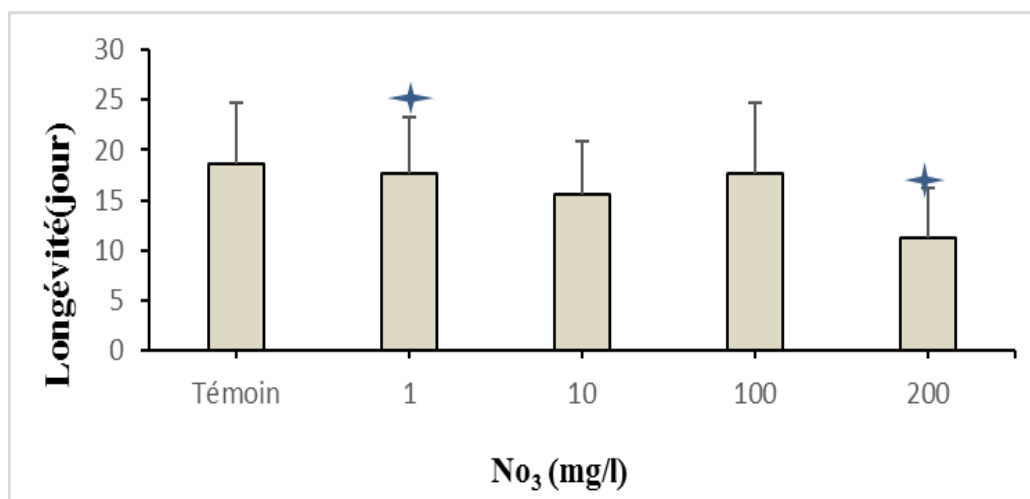


Figure 13 : Variation de la longévité chez les daphnies dans les différentes concentrations.

Les résultats illustrés dans la figure (13), montrent une réduction de la longévité pour les concentrations 10 et 200 mg/l de NO_3 qui est de 15,6 et 11,2 jours respectivement. Tandis que, pour les autres concentrations 1 et 100 mg/l de NO_3 , les valeurs de la longévité sont proche de celle du témoin. Les analyses statistiques révèlent l'existence de différences significatives de l'effet de nitrate de la concentration 1 et 200 mg/l (NO_3) sur la longévité ($p < 0.05$).

4.1.4. Nombre de descendants par femelle :

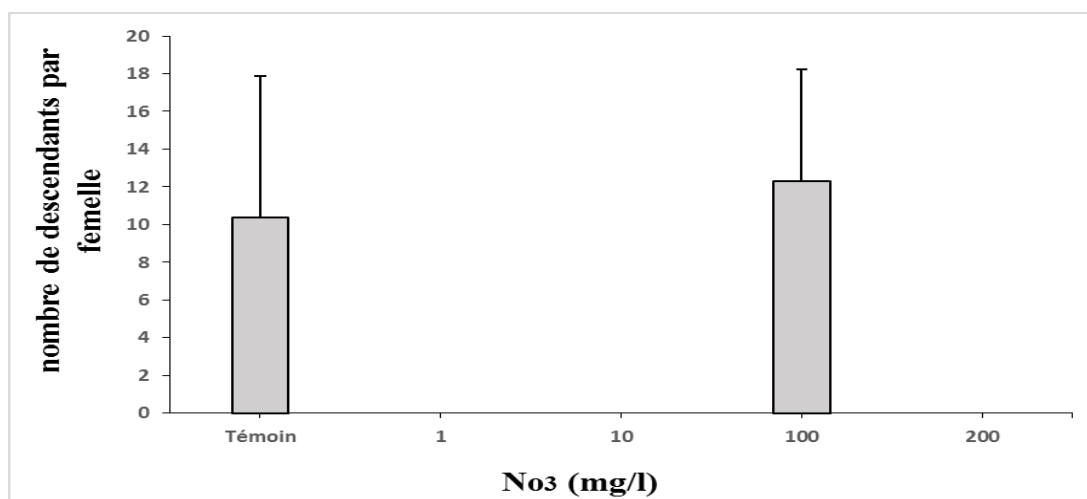


Figure 14 : Variation du nombre de descendants par femelle dans les différentes concentrations.

Le nombre de descendants par femelle illustre dans la figure (14) montre que ce dernier est élevé dans la concentration 100 mg/l de No_3 qui est de 12,28 par rapport au témoin. En revanche pour les concentrations 10 et 200 mg/l de No_3 , les femelles n'arrivent pas à donner la ponte. Tel qu'on a trouvé dans la concentration 1 mg/l de No_3 , elle a donné une seule ponte. Les analyses statistiques ne montrent aucun effet de nitrate sur le nombre de descendants ($p > 0.05$).

4.1.5. Intervalle de ponte :

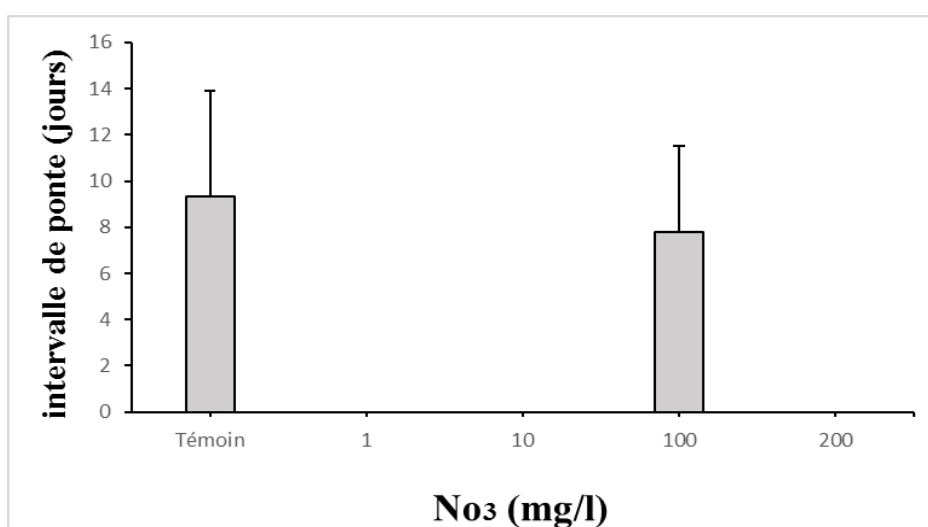


Figure 15 : Variation de l'intervalle de ponte moyenne dans les différentes concentrations.

Les résultats ainsi obtenu (figure15) montrent que l'intervalle de ponte moyenne dans la concentration 100 mg/l de No_3 et réduit par rapport au témoin. Tel qu'on a trouvé que dans les concentrations 10 et 200 mg/l de No_3 . Les femelles n'arrivent pas à donner la ponte. Les analyses statistiques non significatives ($p>0.05$).

4.1.6. Grandeur de ponte :

Les résultats recueillis (figure16), révèlent la réduction de la grandeur de ponte chez les daphnies traitées dans 100 mg/l de No_3 et dans le témoin que celle dans la concentration 1 mg/l de No_3 est élevé avec une grandeur de ponte de 9. Ainsi on a trouvé dans les concentrations 10 et 200 mg/l de No_3 , les femelles n'arrivent pas à donner la ponte. Les analyses statistiques non significatives ($p>0.05$).

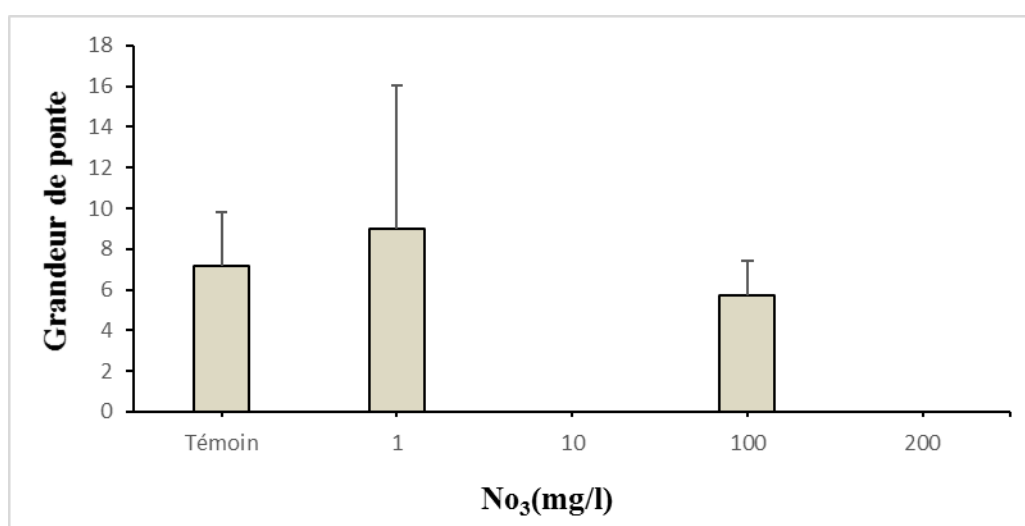


Figure 16 : Variation de la grandeur de ponte moyenne des daphnies dans les différentes concentrations.

4.1.7. Nombre de ponte par femelle :

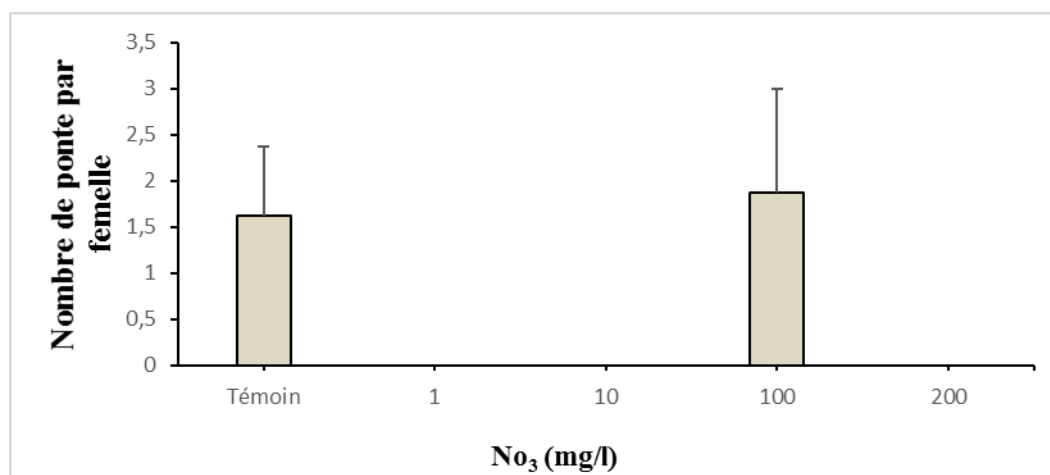


Figure 17 : Variation du nombre de ponte par femelle dans les différents concentration.

Le nombre de ponte moyenne par femelle est assez élevé chez les daphnies traitées avec la concentration 100 mg/l de No_3 , comparativement au témoin avec 1,62 (figure17). En revanche pour les concentrations 10 et 200 mg/l de No_3 les femelles n'arrivent pas à donner la ponte. Par contre à la concentration 1 mg/l de No_3 , une seule femelle a donné une seule ponte. Les analyses statistiques non significatives ($p > 0.05$).

4.1.8. Embryotoxicité :

	témoin	1 mg/l	10 mg/l	100 mg/l	200 mg/l
Sexe ratio	0%	5%	0%	2%	0%

Tableau 1 : Embryotoxicité en pourcentage des males du *Daphnia magna*.

Il y a des individus males au niveau de concentration 1 mg/l de No_3 (5% males) et aussi dans la concentration 100 mg/l de No_3 (2% males).

4.1.9. Le poids :

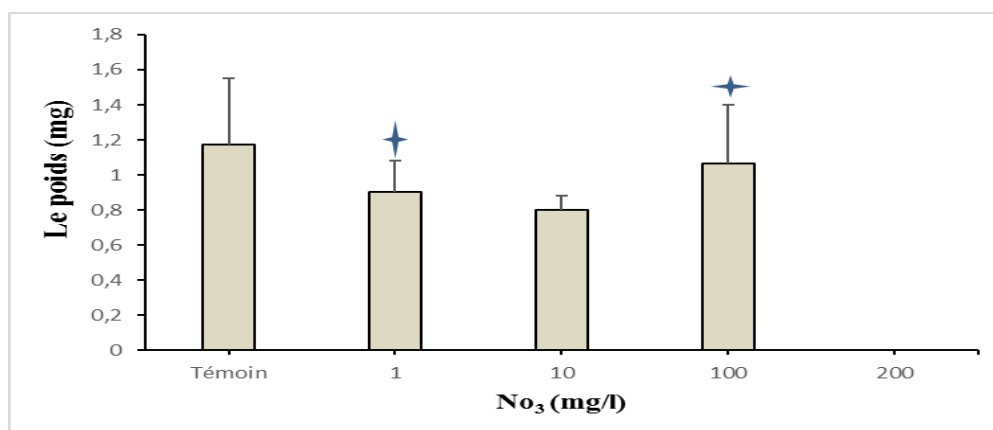


Figure 18 : Variation du poids des femelles à la fin du test (21jours) chez *Daphnia magna* pour des différentes concentrations.

La figure (18) montre l'effet de No_3 sur le poids des daphnies à la fin du bio essai. Le groupe de témoin a montré un poids élevé représenté par 1.17 mg par rapport aux autres concentrations. Les analyses statistiques révèlent l'existence de différences significatives de l'effet de nitrate des concentrations 1 et 200 mg/l (No_3) sur le poids des femelles à la fin du test ($p < 0.05$).

4.1.10. Age des femelles à la 1^{ère} ponte :

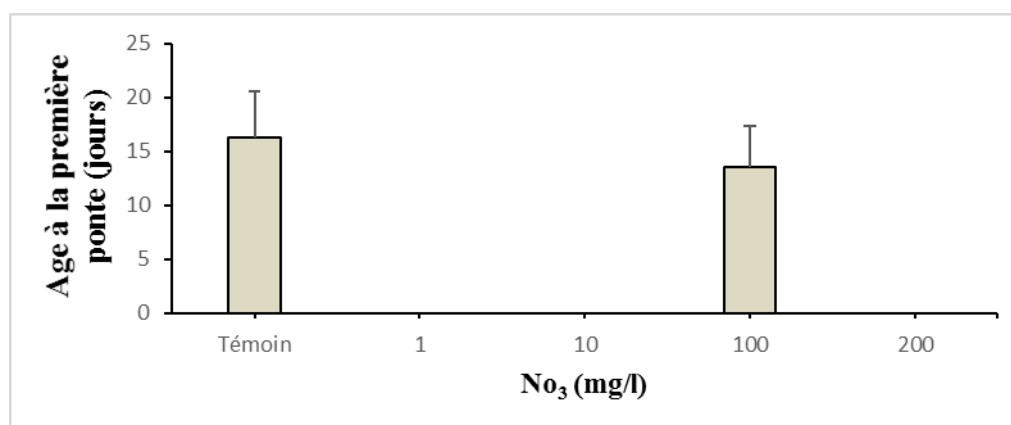


Figure 19 : Variation de l'âge des femelles à la première ponte chez *Daphnia magna* pour les différentes concentrations.

L'âge à la première reproduction illustré dans la figure (19) montre que ce dernier est réduit à la concentration 100 mg/l de No_3 qui est de 13,57 jours. Par rapport au témoin qui est de 16,5 jours. En revanche pour les concentrations 10 et 200 mg/l de No_3 , les femelles n'arrivent pas à donner la ponte. Les analyses statistiques non significative ($p > 0.05$).

4.1.11. La survie :

No_3 (mg/l)	Taux de la survie en %
Témoin	80%
1	60%
10	10%
100	60%
200	10%

Tableau 02 : pourcentage du taux de survie des daphnies dans les différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus dans le tableau 2, on constate que le taux de survie le plus élevé est apparu chez le témoin 80%, comparativement aux daphnies traitées aux concentrations de 10 et 200 mg/l de nitrate a une valeur enregistré de 10%. En revanche dans les concentrations 1 et 100 mg/l de nitrate, ses valeurs approximativement de celle du témoin aux alentours de 60%.

4.2. Discussion :

Notre étude s'applique à la détermination de la toxicité de Nitrate NO_3 sur les traits d'histoire de vie chez un bio indicateur de la qualité de l'eau *Daphnie magna*. Les résultats obtenus dans les différents bio essais montre que :

✚ La taille des femelles à la 1^{ère} reproduction est affectée légèrement dans la concentration [100 mg/l] de NO_3 par rapport au témoin. Cela s'expliquerait par le fait que les daphnies semblent trouver un milieu défavorable.

Alors que la réduction est effectivement observable dans la concentration de [1 mg/l] de NO_3 , on a trouvé qu'il y'a une seule femelle a donner la ponte, cette diminution de la taille et la conséquence de l'accélération de la maturité, qui devient un avantage pour *Daphnia* qui se reproduit alors avant d'atteindre la taille ou elle sera plus vulnérable aussi pour les prédateurs donc la diminution de la taille est une réponse adaptative.

Ainsi pour les concentrations [10 et 200 mg/l] de nitrate les individus ne peuvent pas exprimer leur pouvoir reproducteur (biotique), ceci expliqué par les conditions défavorables des milieux.

✚ La taille des juvéniles est élevée dans les concentrations [1 et 200 mg/l] de NO_3 par rapport au témoin. Cela s'expliquerait peut être à l'influence de nitrate sur la femelle.

✚ Le nombre des descendants s'est avérée élevé à la concentration [100 mg/l] de NO_3 contrairement au témoin, cette augmentation peut être expliqué que l'espèce représente une forme adaptative, nous avons enregistré que les femelles ne peuvent pas atteindre leur pouvoir reproducteur au niveau des deux autres concentrations [10 et 200 mg/l] de NO_3 , ce qui confirme que ces dernières ne sont pas idéales pour leur croissance.

✚ Pour la longévité, on remarque que les daphnies ont été affectées aux différents concentrations, et avec une moyenne de 11,2 jours pour la concentration [200 mg/l] de NO_3 . Cela explique par le fait que la réponse des daphnies à un toxique est le meilleur critère d'effet écotoxicologique.

En effet la concentration en nitrate joue un rôle primordial, les milieux très concentrés et les milieux pauvres en nitrate sont des milieux défavorables.

✚ L'âge moyen des femelles à la première ponte est réduit dans les différentes concentrations. Comparativement avec le témoin, parce que les doses de nitrate influent sur la croissance des individus.

✚ L'intervalle de ponte est semblablement élevé dans la concentration [100 mg/l] de nitrate par rapport aux autres concentrations. Ce qui confirme nos résultats des paramètres précédents.

✚ La grandeur de ponte est élevée à la concentration [1 mg/l] par rapport aux autres concentrations, cela est due par le nombre réduit des femelles qui atteignent la ponte (une seule ponte par cette concentration).

✚ Le poids des femelles à la fin du test est réduit dans les différentes concentrations par rapport au témoin.

✚ Le sexe ratio apparaît au niveau de deux concentrations [1 et 100 mg/l] de nitrate avec un pourcentage réduit des mâles entre [5 % et 2%] respectivement, ce qui confirme que le milieu est défavorable.

Enfin nous pouvons dire que l'utilisation d'un bioindicateur comme *Daphnia magna*, nous a permis la mise en évidence de l'effet de nitrate sur les paramètres de cycle de vie cités préalablement, afin de connaître les perturbations survenues enregistrées par le biomarqueur sentinelle et qui ouvre les perspectives dans la gestion et la bio surveillance des zones humides en déclenchant le signal d'alarme.

Con**clusion**sion



Conclusion :

La daphnie est l'organisme modèle qui a été le support de notre travail. Il s'agit d'un invertébré clé des écosystèmes aquatiques dulçaquicoles et l'un des trois modèles biologiques les plus utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques écotoxiques des substances chimiques (Pereira et al., 2010).

Ces critères nous ont incités à entreprendre l'étude de l'effet de nitrate sur plusieurs paramètres biologiques qui concernent la survie, la croissance, la longévité, la reproduction, l'embryotoxicité et le poids tout en réalisant un test chronique de 21 jours.

Notre travail a pour but d'étudier l'effet de nitrate sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*. Les résultats obtenus à travers les bio essais révèlent l'effet la pollution par le nitrate (NO_3) sur le cycle de vie de *D. magna*. Une réduction dans le taux de survie est liée à l'augmentation des concentrations [1 ; 10 ; 100 et 200 mg/l] et à la durée étendue du test. La diminution est fortement signalée avec la plus grande concentration.

D'autre part, plusieurs paramètres du cycle de vie de *D. magna* sont affectés par le nitrate (NO_3) tels que : (la taille des femelles et des juvéniles à la 1^{ère} ponte, la longévité). Une diminution a été recensée suite à l'élévation des concentrations, particulièrement pour celle la plus grande [200 mg/l].

Cependant la grandeur de ponte a été augmentée pour les concentrations [1 et 100 mg/l], comparativement au témoin. Alors que l'âge à la 1^{ère} ponte s'est prolongé dans le temps avec un retard remarquable pour les différentes concentrations à l'exception la concentration [100 mg/l].

En occurrence, la longévité a connu une diminution relativement marquée en fonction de l'augmentation des concentrations utilisées dans ce test. La baisse ou la chute dans la longévité été observée pour [200 mg/l].

Egalement, le nombre de descendant par femelle est affecté par la pollution de nitrate. La diminution est particulièrement décelée pour les concentrations [1, 10 et 200 mg/l], contrairement à la concentration de [100 mg/l].

Aussi, une diminution dans la taille des femelles, du poids et de taux de survie à la fin du test, qui synchronisent avec l'augmentation des concentrations du NO_3 .

Malgré, la courte durée et les conditions pratiques de travail au niveau de notre laboratoire les résultats obtenus dans cette étude à travers les bioessais sur *D.magna* révèlent l'effet de nitrate sur les traits de cycle de vie.

Ils montrent que les daphnies utilisées sont adaptées ou sont tolérants pour la concentration [100 mg/l].

Enfin ce travail mérite d'être poursuivi pour approfondir nos connaissances sur les effets des taux de nitrate dans les milieux des eaux douces et saumâtres sur *D. magna*. Cela pour mieux comprendre le phénomène d'adaptation et le stress de nitrate avec son effet sur la survie et la reproduction.

Références bibliographiques

1. **Adam, J. W. H. (1980).** Health aspects of nitrate in drinking-water and possible means of denitrification. *Water SA*, 6 :79.
2. **Adema M.M., (1978).** *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59, 125–134.
3. **ASTM American Society for Testing and Materials, (2001).** Standard guide for conducting *Daphnia magna* life-cycle toxicity tests. In: Annual book of ASTM standards, E 1193-97, Philadelphia, 418–433.
4. **Benndorf J., (1990).** Conditions for effective biomanipulation; conclusions derived from whole-lake experiments in Europe, *Hydrobiologia*, 200/201, 187–203.
5. **Boehler, J. A., Keller, T. S. et Krieger, K. A., (2012).** Taxonomic Atlas of the Water Fleas, Cladocera (Class Crustacea). National Center for Water Quality Research Heidelberg University Tiffin, USA 44883.
6. **Boukelia. H. (2015).** Contribution à l'étude de l'effet de la dureté de l'eau sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*. Mémoire de master. Univ. Des Frères Mentouri Constantine.
7. **Carpenter S., Kitchell J., (1993).** The trophic cascade in lakes. University Press, Cambridge.
8. **Chakri, K., (2007).** Contribution à l'étude écologie de *Daphnia magna* (Branchiopoda : Anomopoda) dans la Numidie, et inventaire des grands Branchiopes en Algérie. Thèse de doctorat d'état en Biologie animale. Université Badji Mokhtar- Annaba.
9. **Chèvre H., (2000).** Etude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudo kirchneriella subcapitata*. Thèse en Ecole Polytechnique Fédérale. Département de Génie rural, Lausanne, 127 p.
10. **Consi, T. R., Passani, M. B., et Macagno, E. R. (1990).** Eye movements in *Daphnia magna*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 166(3), 411-420.
11. **Ebert D., (2005).** Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US).
12. **Ebert, D. (2005).** Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine.
13. **Egboka, B. C. E. (1984).** Nitrate contamination of shallow ground waters in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ*, 35: 53.

Références bibliographiques

14. **Fernnando C., Paggi J., Rajapaska R., (1987).** *Daphnia* in tropical lowlands. In: R. H. Peters & R. De Bernardi (eds.), *Daphnia*, vol. 45, 107–141, Memorie Dell'Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco Di Marchi., Verbania Pallanza.
15. **Flössner D., (2000).** Die Haplopoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
16. **Green, J. (1954). a.** *Daphnia*, The water flea. *New biology* 23: 48-65.
17. **Green, J. (1954). b.** Size and reproduction in *Daphnia magna* (Crustacean: Cladocera). *Proc Zool Soc. London* 124: 535-545.
18. **Hadas O., Kott Y., Bachrach U. & Cavari B., (1983).** Ability of *Daphnia* Cell-Free Extract to Damage *Escherichia coli* Cells. *Applied Environmental Microbiology*, 45 : 1242-1246.
19. **Hammers-Wirtz, M., Ratte, H.T., (2000).** Offspring fitness in *Daphnia*: Is the *daphnia* reproduction test appropriate for extrapolating effects on the population level? *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1856–1866.
20. **Haney J., Buchanan C., (1987).** Distribution and biogeography of *Daphnia* in the artic. In: Peters R.H., De Bernardi R., (eds.), *Daphnia*, vol. 45, 77–105, Memorie Dell' Istituto Italiano Di Idrobiologia Dott. Marco Di Marchi., Verbania Pallanza.
21. **Holm N.P., Shapiro J., (1984).** An examination of lipid reserves and the nutritional status of *Daphnia pulex* fed *Aphanizomenon flos-aquae*, *Limnology and Oceanography*, 29, 1137-1140.
22. **Horn W., (2003).** Long-term development of the crustacean plankton in the Saldenbach Reservoir (Germany) – changes, causes, consequences, *Hydrobiologia*, 504, 185–192.
23. **International Standards Organisation. (1996).** Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. Geneva, Switzerland.
24. **Jeppesen E., Jensen J., Sondergaard M., Gron F., Bramm M.E., Sandby K., Moller P., Rasmussen H., (2004).** Impact of fish predation on cladoceran body weight distribution and zooplankton grazing in lakes during winter, *Freshwater Biology*, 49, 432–447.

Références bibliographiques

25. **Kasparzak P., Schwabe W., (1986).** Some observations on the diurnal vertical migration of crustacean zooplankton in a stratified oligotrophic clear water lake (Lake Stechlin, GDR), *Limnologica*, 18, 297–312.
26. **Kast-Hutcheson K., Rider C.V., & LeBlanc G.A., (2001).** The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environnement. Toxicology*. 20 : 502-509.
27. **Kast-Hutcheson K., Rider C.V., et LeBlanc G.A., (2001).** The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environnement. Toxicology*. 20 : 502-509.
28. **Kimerle R.M., Werner A.F., Adams W.J., (1985).** Aquatic hazard evaluation principles applied to the development of water quality criteria. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium* (Edited by R. D. Cardwell, R. Purdy, and R. C. Bahner), pp. 538-547, ASTM STP 854, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
29. **Manar R. (2008).** Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés cladocères *Daphnia* Sp. dans une perspective d'évaluation des Risques. Thèse de doctorat. Univ. Metz.
30. **Mulhauser, B. (1995).** Guide de la faune et de la flore des lacs et des étangs d'Europe. Delachaux et Niestlé.
31. **Olmstead, A. W., et Leblanc, G. A. (2002).** Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 293 (7), 736-739.
32. **Organization for Economic Cooperation and Development, (1984).** *Daphnia* sp. 14-day reproduction test (including an acute immobilization test) (Guidelines for the testing of chemicals no. 202). OECD, Paris.
33. **Organization for Economic Cooperation and Development, (1998).** OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
34. **Pacaud A., (1939).** Contribution à l'écologie des cladocères. *Bulletin. Bibliologique*. France et Belgique, suppliment. 24 : 260 p.
35. **Pennak R. W. (1989).** Fresh-water invertebrates of the United States. 3rd edition. Protozoa to Mollusca, John Wiley & Sons, New York, NY.

Références bibliographiques

36. **Pereira J.L.**, Hill C.J., Sibly R.M., Bolshakov V.N., Goncalves F., Heckmann L.H. & Callaghan A., 2010. Gene transcription in *Daphnia magna*: effects of acute exposure to a carbamate insecticide and an acetanilide herbicide. *Aquat. Toxicol.*, 97, 268–276.
37. **Persoone G., Janssen C.R., (1993).** Freshwater invertebrate toxicity tests. In *Handbook of Ecotoxicology*, (Edited by P. Calow), Blackwell Scientific Publisher, p. 55, Ambleside, UK.
38. **Roozen, F., et Lürling, M. (2001).** Behavioural response of *Daphnia* to olfactory cues from food, competitors and predators. *Journal of Plankton Research*, 23(8), 797-808.
39. **Santé Canada (1992).** Le nitrate et le nitrite. Recommandation pour la qualité de l'eau potable au Canada. Documentation à l'appui, Accessible à www.hc-sc.gc.ca/catalogue/dpcpubs/repcoc.
40. **Slooff W., Canton J.H., Hermens J.L.M., (1983).** Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds. I. (Sub) acute toxicity tests, *Aquatic Toxicology*, 4, 113–128.
41. **Strener R., (1989).** The role of grazers in phytoplankton succession. In: U. Sommer (ed.), *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*, 107–170, Berlin, Springer.
42. **Tessier A.J., Goulden C.E., (1982).** Estimating food limitation in cladoceran populations. *Limnology and Oceanography*, 27, 707-717.
43. **Touati L., et Samraoui B., (2002).** The ecology of *Daphnia chevreuxi* Richard in Northeast Algeria (Crustacea: Anomopoda). *Spécial Biologie, Sciences et Technologie*. 17 : 75-81
44. **U.S. Environmental Protection Agency, (1989).** Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA/600/4-89/001, p. 249, Cincinnati.
45. **U.S. Environmental Protection Agency., (2002).** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition, Office of Water (4303T), EPA-821-R-02-012, Washington.

Références bibliographiques

46. Van Leeuwen C.J., Luttmer W.J., Griffieon P.S., (1985). The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9, 26–39.
47. Young, S. (1974). Directional differences in the colour sensitivity of *Daphnia magna*. *J Exp Biol*, 61, 261-267.
48. Zeman F., (2008). Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna* : Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thèse de doctorat en évolution. Ecologie. Université Montpellier II., 210 p.
49. Zeroual. C. (2016). L'effet chronique de la salinité du chlorure de sodium sur les paramètres du cycle de vie de *Daphnia magna*. Mém. Master. Univ. Des Frères Mentouri Constantine.

Tableau 1 : Résultats de l'analyse de la variance à un facteur testant l'effet de nitrate de concentration 1 mg/l sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*.

Les paramètres	DDI	Fobs	Pr>F
survie	4	0,95	0,40
Taille des femelles à la 1ère ponte	6	0,125	0,73
Taille des juvéniles à la 1ère ponte	21	2,7	0,11
Le poids	6	0,15	0,71
Age à la 1ère ponte	6	1,85	0,22
La longévité	9	0,54	0,48
Nombre de descendants par femelle	6	0,007	0,93
Intervalle de ponte	11	0,2	0,66
Grandeur de ponte	11	0,7	0,4
Nombre de ponte par femelle	6	0,26	0,62

P= probabilité que l'hypothèse nulle égale à zéro ; DDL : degré de liberté ;

Fobs=Cma/Cmr

Tableau 2 : Résultats de l'analyse de la variance à un facteur testant l'effet de nitrate de concentration 10 mg/l sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*.

Les paramètres	DDI	Fobs	Pr>F
survie	4	0,95	0,40
Taille des femelles à la 1ère ponte	0	0	0
Taille des juvéniles à la 1ère ponte	0	0	0
Le poids	6	5,7	0,06
Age à la 1ère ponte	0	0	0
La longévité	9	0,44	0,52
Nombre de descendants par femelle	0	0	0
Intervalle de ponte	0	0	0
Grandeur de ponte	0	0	0
Nombre de ponte par femelle	0	0	0

P= probabilité que l'hypothèse nulle égale à zéro ; DDL : degré de liberté ;

Fobs=Cma/Cmr

Tableau 3 : Résultats de l'analyse de la variance à un facteur testant l'effet de nitrate de concentration 100 mg/l sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*.

Les paramètres	DDI	Fobs	Pr>F
survie	4	0,95	0,40
Taille des femelles à la 1ère ponte	6	33,15	0,0001
Taille des juvéniles à la 1ère ponte	21	0,67	0,42
Le poids	6	0,07	0,8
Age à la 1ère ponte	6	1,1	0,33
La longévité	9	5,33	0,04
Nombre de descendants par femelle	6	0,03	0,85
Intervalle de ponte	11	1,7	0,32
Grandeur de ponte	13	0,04	0,84
Nombre de ponte par femelle	6	0,35	0,58

P= probabilité que l'hypothèse nulle égale à zéro ; DDL : degré de liberté ;

Fobs=Cma/Cmr

Tableau 3 : Résultats de l'analyse de la variance à un facteur testant l'effet de nitrate de concentration 200 mg/l sur les paramètres de cycle de vie de *Daphnia magna*.

Les paramètres	DDI	Fobs	Pr>F
survie	4	0,95	0,40
Taille des femelles à la 1ère ponte	0	0	0
Taille des juvéniles à la 1ère ponte	0	0	0
Le poids	6	4,8	0,07
Age à la 1ère ponte	0	0	0
La longévité	9	3,6	0,09
Nombre de descendants par femelle	0	0	0
Intervalle de ponte	0	0	0
Grandeur de ponte	0	0	0
Nombre de ponte par femelle	0	0	0

P= probabilité que l'hypothèse nulle égale à zéro ; DDL : degré de liberté ;

Fobs=Cma/Cmr

Résumé :

L'utilisation de *Daphnia magna* comme bio indicateur pour évaluer la qualité de l'eau, à révéler l'effet de nitrate sur les paramètres de cycle de vie de leur vie (taille des femelles a la première ponte, la taille des juvéniles, intervalle de ponte, grandeur de ponte, la longévité...).

Les bio essais menés sur *Daphnia magna* (bio indicateur), a montré une réduction dans le taux de la survie, la taille de la femelle à la première ponte, la longévité, le poids, ainsi que l'âge a la première ponte.

On note que la taille des juvéniles est un peu élevé dans [1 mg/l] de NO_3 par rapport au témoin et les autres concentrations, ainsi que la grandeur et l'intervalle de ponte.

En outre le nombre de ponte est élevé dans [100 mg/l] de NO_3 par rapport au témoin et les autres concentrations ainsi que le nombre de descendants par femelle.

L'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt du modèle *Daphnia magna* dans l'étude de la toxicité de nitrate et de leurs éventuels effets sur la reproduction.

Mots clés : *Daphnia magna*, bio-indicateur, paramètre de cycle de vie, test chronique, nitrate, écotoxicologie.

ملخص :

إن استعمال براغيث الماء *Daphnia magna* كمؤشر الحيوي لتقييم نوعية المياه، أظهرت تأثير النترات على دورة حياتهم (قياس الإناث خلال التكاثر الأول، قياس المواليد خلال التكاثر الأول، فرق الزمن بين الولادتين، قياس عدد المواليد، العمرية ...).

إن التجارب البيولوجية التي أجريت على *Daphnia magna* (مؤشر بيولوجي) ، أظهرت تقلص في معدل البقاء على قيد الحياة ، قياس الإناث خلال التكاثر الأول ، العمرية ، الوزن ، وسن البيضة الأولى.

لاحظنا أن حجم المواليد مرتفع قليلا في التركيز 1 ملغ / ل، مقارنة بالشاهد و التراكيز الأخرى، و بالمثل في فرق الزمن بين الولادتين، العمرية.

بالإضافة عدد الإباضة مرتفع قليلا في التركيز 100 ملغ / ل ، مقارنة بالشاهد و التراكيز الأخرى ، وعدد من المواليد لكل أنثى.

إن مجموعة هذه النتائج توضح فائدة النوع *Daphnia magna* في دراسة سمية النترات ، و آثاره المحتملة على الإنجاب.

الكلمات المفتاحية: براغيث الماء *Daphnia magna*، مؤشر بيولوجي، دورة الحياة، النترات، تلوث البيئي، تجربة مؤقتة.

Abstract :

The use of *Daphnia magna* as a bio indicator to evaluate the quality of water, revealed the effect of nitrate on her life cycle traits (size of females at first clutch, size of neonates, brood interval, age at maturity, brood size, longevity ...).

The bioassays carried out on *Daphnia magna* (bio indicator) ; have shown reduction in The rate of survival, size of females at first clutch, longevity, the weight and the brood size.

The size of the juveniles is slightly elevated in [1 mg / l] NO_3 compared to the control and the other concentrations, as well as the size and interval of laying.

In addition, the number of eggs was high in [100 mg / l] NO_3 compared to the control and the other concentrations and the number of offspring per female.

All these results underline the interest of the *Daphnia magna* model in the study of the toxicity of nitrate and their possible effects on reproduction.

Key words: *Daphnia magna*, bioindicator, life cycle parameter, chronic test, nitrate pollution, ecotoxicology.