

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 : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité/Option: biologie moléculaire et cellulaire  
Département: biologie

---

**Thème : Contribution à l'étude de la toxicité d'un fourmicide  
"Chlorpyrifos-éthyl" sur des protistes ciliés d'eau douce  
(*Paramecium sp.*)**

---

Présenté par :

BOUGOUSSA Faten

DAHCHAR Imen

KEBBACI Marwa

Devant le jury composé de :

Présidente : M<sup>me</sup> Merabet R

M.A.A

Université de Guelma

Examineur : M<sup>r</sup> Guettaf M

M.C.B

Université de Guelma

Encadreur : M<sup>me</sup> Benossmane S

M.C.B

Université de Guelma

Juillet 2019

## **REMERCIEMENT**

D'emblée, on tient à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et nous a imprégné de patience, afin de venir à bout de cette tâche et d'avoir pu réaliser ce modeste travail.

On tient à remercier également notre encadreur **M<sup>me</sup>. BENOSMANE Sana** maitre de conférences au département de biologie, faculté de S.N.V et S.T.U Université de Guelma 8 Mai 1945, pour les conseils et orientations prodigués durant toute la période de préparation, aussi sa capacité de stimulation nécessaire à la finalisation de notre projet de fin d'étude.

Nos sincères et vifs remerciements sont adressées aux membres du jury **M<sup>r</sup>. GUETTAF** et **M<sup>me</sup>. MERABET** pour l'immense privilège qu'ils nous font en acceptant d'examiner notre travail et en l'enrichissant par leurs remarques et propositions très bénéfiques.

Nos sincères remerciements vont au laboratoire de recherche toxicologie cellulaire de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba aussi à l'ensemble des personnes qui ont participé ou été en relation d'une manière directe ou indirecte dans la préparation, la mise en œuvre et la concrétisation de ce travail. Soyez assuré de toute notre reconnaissance pour avoir éclairé nos idées concernant la réalisation des techniques de pratiques. Merci pour votre disponibilité.

Nous exprimant également nos sincères remerciement à tout le personnel des laboratoires pédagogiques trouvez à notre université, nos vives reconnaissances pour leurs aides techniques.

Merci à tous.

# Résumé

## **Résumé**

Dans le but d'évaluer la toxicité d'un insecticide à base de « Chlorpyrifos-éthyl », nous avons effectué un travail de recherche sur un modèle cellulaire en l'occurrence un protiste cilié d'eau douce « *Paramecium sp.* » Pour son utilisation dans le cadre de la lutte contre la pollution des milieux aquatiques puisqu'il est considéré comme bio-indicateur.

L'étude de ce pesticide a permis d'aboutir à un ensemble de résultats qui met en évidence son effet nocif.

La toxicité de ce xénobiotique montre une action sur les paramètres physiologiques et biochimiques, qui révèlent des variations suite à sa forte concentration sur les paramécies.

Les effets du Chlorpyrifos-éthyl sur les protistes ciliés ont été évalués d'une part sur la croissance et d'autre part sur les teneurs en protéines, en Glutathion et en activité Catalase.

Nos résultats mettent en évidence des perturbations physiologiques en effet la croissance des protistes qui a été inhibé. Cette toxicité a été confirmée par les modifications métaboliques indiquent une augmentation de la teneur en protéines totales et de l'activité CAT ainsi qu'une diminution du taux du GSH par rapport aux cellules témoins.

**Mots clés: insecticide , Chlorpyrifos-éthyl, *Paramecium sp.* , toxicité , CAT , GSH.**

## الملخص

من أجل تقييم سمية مبيد حشري يعتمد على "كلوربيريفوس إيثيل" كمادة فعالة ، قمنا بعمل بحث على نموذج خلوي في هذه الحالة اولاني هذبي للمياه العذبة "*Paramecium sp.*" لاستخدامها في إطار مكافحة التلوث في نظام المائية لأنها تعتبر كمؤشر حيوي.

وقد أدت دراسة هذا المبيدات إلى مجموعة من النتائج التي تبرز تأثيرها الضار.

تُظهر سمية هذا الملوث تأثيرًا على العوامل الفسيولوجية والكيميائية الحيوية ، والتي تكشف عن اختلافات بعد تركيزها العالي على البراميسيوم.

تم تقييم آثار الكلوربيريفوس إيثيل علي كائن من فصيلة الهدبيات من ناحية النمو ، ومن ناحية أخرى على محتوى البروتين و الجلوتاثيون ونشاط الكاتالاز.

نتائجنا تبين اضطرابات فسيولوجية على نمو الاولانيات المكبوح ، تم تأكيد هذه السمية من خلال التغييرات الأيضية التي تشير إلى زيادة في نسب البروتين الكلي ونشاط الكاتالاز وكذلك انخفاض في مستوى الجلوتاثيون مقارنة مع الخلايا الشاهدة.

**كلمات البحث:** المبيدات الحشرية ، كلوربيريفوس إيثيل ، *Paramecium sp.* ، سمية ، GSH ، CAT.

### **Abstracts**

In order to evaluate the toxicity of an insecticide based on "Chlorpyriphos-ethyl", we carried out a research work on a cellular model in this case a freshwater ciliate protist "*Paramecium sp.*" for its use in the fight against pollution of aquatic environments since it is considered as a bio-indicator.

The study of this pesticide has led to a set of results that highlights its harmful effect.

The toxicity of this xenobiotic shows an action on the physiological and biochemical parameters, which reveal variations following its high concentration on paramecium.

The effects of Chlorpyriphos-ethyl on ciliated protists were evaluated on the one hand on growth and on the other hand on the protein content, Glutathione and on Catalase activity.

Our results highlight physiological disturbances indeed the growth of protists that has been inhibited. This toxicity was confirmed by metabolic changes indicating an increase in total protein content and CAT activity as well as a decrease in GSH level compared to control cells.

**Keywords: insecticide, Chlorpyriphos-éthyl, *Paramecium sp.* , toxicity , CAT , GSH**

# *Sommaire*

## Sommaire

REMERCIEMENT .....	i
Résumé.....	ii
المخلص .....	iii
Abstracts.....	iv
<i>Sommaire</i> .....	IV
Liste des abréviations .....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Introduction .....	1
<b><u>Chapitre I: introduction générale</u></b>	
<b>1. La pollution</b> .....	<b>2</b>
1.1 Les différents types de pollution .....	3
1.1.1. La pollution atmosphérique .....	3
1.1.2. La pollution du sol .....	3
1.1.3. La pollution de l'eau .....	4
1.2. La pollution par les pesticides .....	5
<b>2. L'agriculture intensive</b> .....	<b>6</b>
2. 1. Définition des pesticides .....	7
2.2. Classification des pesticides .....	7
2.2.1. Classification selon la cible biologique .....	8
2.2.2. Classification selon la nature chimique .....	8
<b>2.2.2.1. Les organophosphorés</b> .....	<b>8</b>
<b>a. Le Chlorpyriphos-éthyl</b> .....	<b>9</b>
a.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action .....	9
a.2. Toxicité du produit .....	10
<b>3. Le stress oxydant</b> .....	<b>10</b>
<b>4. Les bio-indicateurs</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Rappel sur les protistes</b> .....	<b>12</b>
5.1. Taxonomie .....	13
5.2. Rappels sur la paramécie (Paramecium sp.) .....	14
5.2.1. Mouvement .....	16
5.2.2. Reproduction .....	16

5.2.3. Alimentation .....	16
5.2.4. Respiration .....	16
5.2.5. Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie .....	16
<b>6. Justification du choix de Paramecium sp. Comme modèle biologique .....</b>	<b>17</b>
<b>7. Objectif du travail .....</b>	<b>18</b>
<b><u>Chapitre II: Matériel et Méthodes</u></b>	
<b>1. Matériel .....</b>	<b>19</b>
1.1. Matériel biologique .....	19
1.2. Matériel chimique .....	19
<b>2. Méthodes .....</b>	<b>20</b>
2.1. Préparation de la culture de paramécies .....	20
2.1.1. Culture mixte .....	20
2.1.2. Préparation du milieu de culture .....	21
2.1.3. Incidence du milieu de culture sur la croissance des paramécies .....	21
2.1.4. Protocol de traitement .....	21
2.2 Paramètres mesurés:.....	22
2.2.1 Cinétique de croissance cellulaire .....	22
2.2.2. Pourcentage de réponse .....	23
2.2.3. Dosage des protéines totales .....	23
2.2.4. Dosage du glutathion (GSH) .....	24
2.2.5. Dosage de l'activité Catalase CAT .....	25
<b><u>Chapitre III: Résultats</u></b>	
<b>1. Cinétique de croissance des paramécies .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Pourcentage de réponse .....</b>	<b>28</b>
<b>3. Effet du Chlorpyriphos-éthyl sur le taux des protéines totales .....</b>	<b>29</b>
<b>4. Variation du taux du Glutathion (GSH) .....</b>	<b>30</b>
<b>5. Effet du Chlorpyriphos-éthyl sur l'activité Catalase .....</b>	<b>31</b>
<b><u>Chapitre IV: Discussion et conclusion</u></b>	
<b>Discussion .....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>38</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>40</b>

**Liste des abréviations**

**OC** : Organochlorés.

**OP** : Organophosphorés.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène.

**BBC**: Bleu brillant de Coomassie.

**GSH**: Glutathion.

**CAT**: Catalase.

**GST**: Glutathion-S-transférase.

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène.

**ROS**: Reactive Oxygen Species.

**CL50**: Concentration inhibitrice de 50% de la population.

**Liste des tableaux**

<b>Tableaux</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>01</b>	<b>Caractéristiques des composés de la famille du Chlorpyrifos</b>	<b>20</b>

**Liste des figures**

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Modes de propagation et devenir des pesticides dans l'environnement	04
02	un traitement chimique d'une parcelle	07
03	Structure d'une paramécie sous microscope	15
04	Emballage de l'insecticide étudié	18
05	Protocole expérimentale du dosage des protéine	24
06	Cinétique de croissance des paramécies témoins et traitées aux concentrations 0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l du Chlorpyriphos-éthyl	27
07	Pourcentage de réponse des paramécies traitées aux concentrations 0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l du Chlorpyriphos-éthyl	28
08	Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur le taux des protéines totales	29
09	Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur le taux de GSH	30
10	Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur l'activité Catalase	31

# **Introduction**

## **générale**

### Introduction

L'espèce humaine n'a jamais été aussi vulnérable par rapport à son environnement, et particulièrement par rapport aux perturbations qu'elle même y introduit (**Ampéwi, 2005**).

Les micro-organismes représentent l'une des composantes biologiques fondamentales de notre planète. Leur diversité témoigne des premières formes de vie et de 3,8 milliards d'années d'adaptations aux changements globaux majeurs comme à des phénomènes de moindre ampleur. L'accroissement démographique et des activités humaines (industrie, agriculture et autres) ont donné naissance à de nouvelles forces sélectives qui ont eu une incidence globale sur nos paysages et sur la diversité biologique. Les micro-organismes comme la vaste majorité des espèces biologiques ont été affectés par ce phénomène. Il est fort probable que ces activités aient mené à des changements dans la structure des communautés microbiennes (**Kenneth, 2005**).

L'environnement (atmosphérique, terrestre et aquatique) est soumis à une pression croissante des activités industrielles, agricoles et humaines dont les effets se font rapidement sentir (**Ngoufack, 2010**).

Cet environnement physique est assimilable au niveau de ces trois compartiments : l'air, le sol et l'eau. En raison des échanges permanents qui existent entre ces compartiments. Un pesticide introduit dans l'un d'entre eux peut contaminer les deux autres (**Jamet, 1988**).

C'est ainsi que certains produits phytosanitaires peuvent affecter non seulement la cible pour laquelle ils sont utilisés mais également des organismes non cibles (**Rouabhi, 2006 ; Sbartai, 2009**). Certains insecticides évoluent après une exposition au soleil, cette photo dégradation peut conduire à des composés plus toxiques, que l'hydrolyse et l'oxydation peuvent conduire à des molécules très toxiques ainsi que la métabolisation par les enzymes de la phase I et de la phase II (**Boucenna, 2010**).

Notre travail de recherche qui constitue une contribution à l'étude du comportement des micro-organismes en l'occurrence les protistes ciliés d'eaux douce, particulièrement « *Paramecium sp.* » vis-à-vis d'un polluant de l'environnement un insecticide à base de Chlorpyrifos-éthyl

# Chapitre I : **introduction**

## **1. La pollution :**

Le problème de la pollution n'est pas un phénomène récent ou accidentel, mais compte en réalité parmi les plus antiques. La consommation domestique, l'activité professionnelle ou la production agricole et industrielle libèrent des déchets qui sont à la fois un risque et une ressource. Éliminés sans précautions, ils risquent non seulement de dégrader les paysages mais aussi de polluer l'environnement et d'exposer l'homme à des nuisances et à de graves dangers. Quelle ait des conséquences sanitaires, écologiques, esthétiques, industrielles ou agricoles (et le plus souvent les cinq à la fois), la pollution est un phénomène qui a des répercussions économiques et sociales graves (**Gaujous, 1995**).

Ces polluants sont émis dans l'atmosphère, évacués dans les eaux usées ou épandus sur les sols, sous forme de gaz, de substances dissoutes ou de particules. La plupart finissent par rejoindre les milieux aquatiques. Comment font-ils ? Grâce à l'eau ! Capable de dissoudre des quantités de substances, l'eau est en effet, au cours de son cycle, le véhicule privilégié de la pollution. Des voies diverses peuvent être empruntées: déversement direct d'effluents industriels et d'eaux d'égouts (dans les pays ne disposant pas d'infrastructures d'assainissement), retombées sur les sols de polluants atmosphériques entraînés par la pluie, lessivage des sols pollués par ruissellement et/ou infiltration souterraine des eaux de pluie....

Depuis l'avènement des pesticides de synthèse, la contamination de l'environnement s'est accentuée à un point tel que la surface terrestre, dans son ensemble recèle des molécules de cette nature sans en avoir nécessairement subi des traitements directs (**Regnault-Roger, 2005**).

Ces dernières années on prend de plus en plus conscience que les pesticides n'agissent pas seulement contre la cible pour laquelle ils sont homologués, mais aussi sur l'ensemble de l'écosystème (**Calvet, 1983**).

Toutefois, les polluants perturbent l'équilibre et le flux énergétique de l'écosystème. Ils peuvent empoisonner les organismes et occasionner des changements rapides et nuisibles dans l'environnement. Ces changements peuvent stresser certaines espèces, les rendre plus vulnérables. Il est important de noter que la perte d'une espèce peut avoir un effet marqué sur

l'écosystème en mettant en danger les relations complexes qui existent entre tous les membres de la chaîne alimentaire.

### **1.1 Les différents types de pollution :**

Fort utilisé de nos jours, le terme de pollution recouvre bien des acceptations et qualifie une multitude d'actions qui, d'une façon ou d'une autre dégradent le milieu naturel. La classification des pollutions n'est pas une entreprise aisée car on peut la réaliser à partir de nombreux critères, mais aucun n'est entièrement satisfaisant (une même substance peut présenter diverses modalités d'action) .

On peut donc grouper les polluants selon:

- leur nature: physique, chimique et biologique
- le milieu dans lequel ils sont émis: air, eaux, sols
- la voie de contamination (point de vue toxicologique): inhalation, ingestion, par contact...etc. (**Ramade, 2005**).

#### **1.1.1. La pollution atmosphérique :**

L'air est pollué lorsque la présence d'une substance étrangère ou une variation importante dans la proportion de ses constituants est susceptible de provoquer un effet nuisible ou de créer une gêne. Les principales causes naturelles de la pollution de l'atmosphère sont: le transport éolien des particules du sol et du pollen, les incendies de forêt et les émissions volcaniques (**Ramade, 1995; Nriagu, 1989**). Le rejet intempestif de substances diverses dans l'atmosphère constitue sans aucun doute la plus évidente des dégradations de l'environnement par l'homme. Ainsi la pollution de l'air et l'éventualité d'un réchauffement climatique font partie des grands problèmes environnementaux actuels (**Ramade, 1995**).

#### **1.1.2. La pollution du sol :**

A l'opposé de la pollution atmosphérique, qui, en dépit de son ubiquité, sévit avec le maximum d'intensité dans les zones urbaines et industrielles, la pollution des sols affecte, elle,

de façon plus particulière, les zones rurales. Elle résulte de nombreuses causes, en particulier des retombées de polluants atmosphériques, provenant d'industries chimiques et métallurgiques, de l'usage des combustibles fossiles et, de plus en plus fréquemment, d'incinérateurs de déchets urbains et surtout de l'usage systématique des engrais et des pesticides en agriculture (**Ramade, 2005**).

La présence d'un polluant dans le sol n'est pas, en soi, un danger. Le risque apparaît dès lors que ce polluant peut être mobilisé et agir sur l'environnement (faune, flore) ou sur l'homme (**Dubey et Dwividi, 1988**).



**Figure1** : Modes de propagation et devenir des pesticides dans l'environnement  
(Lissalde, 2010)

### 1.1.3. La pollution de l'eau :

La crise de l'eau sévit, déjà depuis longtemps car la contamination des eaux continentales et océaniques exerce ses méfaits de façon sans cesse accrue, depuis parfois plus d'un siècle à une échelle globale. Elle affecte aussi bien les pays industrialisés et les mers qui les entourent que bien des régions du Tiers-monde où, outre la pollution chronique

des eaux continentales, la production agricole voit son expansion limitée par le manque d'eau dans celles à climat aride (**Falkenmark et al., 1991; Postel, 2001**).

Les pollutions des eaux sont des déversements, écoulements, rejets, dépôts directs ou indirects de matières de toute nature et, plus généralement tout à fait susceptibles de provoquer ou d'accroître la dégradation des eaux, en modifiant leurs caractéristiques physiques, chimiques, biologiques ou bactériologiques, qu'il s'agisse d'eaux superficielles, souterraines ou des eaux de mer, dans la limite des eaux territoriales (**Faurie et al., 1999 ; Rodier et al., 1996**).

Des agents polluants, comme les plastiques, les métaux et certains pesticides, ne sont pas ou sont peu biodégradables : le processus d'auto-épuration est alors inopérant et ces substances s'accumulent dans l'écosystème, intoxiquant les espèces vivantes qui les ingèrent. Certaines de ces substances, de surcroît, comme les métaux lourds ou les pesticides, s'accumulent dans les organismes, se concentrant dans certains tissus ou organes à des doses parfois bien supérieures à celles mesurées dans l'eau, un phénomène appelé " bio-accumulation".

Cette accumulation, qui s'amplifie à chacun des maillons de la chaîne alimentaire, peut prendre parfois une ampleur inquiétante (**Ramade, 1995**).

### **1.2. La pollution par les pesticides :**

Les pesticides (insecticides, raticides, fongicides, et herbicides) sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques, utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux ou les plantes jugés nuisibles aux plantations.

Malheureusement, tous les pesticides épandus ne remplissent pas leur emploi. Une grande partie d'entre eux est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols sur lesquels ils ont été répandus.

Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols d'où ils sont ensuite drainés jusque dans les milieux aquatiques par les eaux de pluie (ruissellement et infiltration).

Les pesticides sont ainsi aujourd'hui à l'origine d'une pollution diffuse qui contamine toutes les eaux continentales : cours d'eau, eaux souterraines et zones littorales.

Westlake et Gunther en 1966 soulignaient que les eaux souterraines et les rivières sont dorénavant exposées en permanence au déversement des déchets industriels provenant de la fabrication des pesticides (**Ramade, 2005**).

En outre, le stockage de masses énormes de tels résidus et les pollutions accidentelles provoqueront par le jeu des infiltrations une contamination des nappes phréatiques voire des aquifères profonds (**IFEN, 1999**).

## **2. L'agriculture intensive :**

L'agriculture intensive est caractérisée par une mécanisation poussée et l'usage d'engrais chimiques, de pesticides, fongicides, herbicides... afin de maximiser la production. Ce mode de production assure un rendement des cultures important, ce qui permet de nourrir une population mondiale toujours plus nombreuse ; mais il met en péril la biodiversité et la santé humaine, en étant responsable de la pollution des sols, des nappes phréatiques et cours d'eau souterrains.

Les eaux polluées par les substances chimiques et organiques utilisées dans l'agriculture intensive s'infiltrent dans le sol, ruissellent, pour atteindre les nappes phréatiques, les cours d'eau souterrains et les rivières avoisinantes. Le traitement des eaux, très coûteux, ne peut pas anéantir toutes les substances chimiques ou organiques utilisées dans l'agriculture intensive, qui se retrouvent au final dans l'environnement. L'eau est durablement polluée, dégrade voire détruit la biodiversité présente dans les sols et les cours d'eau, et ne peut pas être consommée par l'homme sans être traitée, sous peine de maladies graves, qui peuvent s'avérer mortelles.

L'agriculture intensive contribue à la désertification des sols. Les haies, les petits bois, les talus, les prairies, les forêts sont détruits pour favoriser la plus grande surface agricole possible ce qui accentue la déforestation.

Le recours à l'agriculture intensive apparaît cependant indispensable, notamment afin de contribuer à la résolution de la crise alimentaire mondiale qui sévit depuis 2007. Elle doit

cependant être utilisée avec la perspective durable de nourrir le plus grand monde, et non de réaliser un maximum de profit au détriment de l'environnement et des pays en voie de développement. En effet, les exploitations pratiquant ce type d'agriculture appartiennent majoritairement à de grands propriétaires terriens, qui perçoivent des subventions agricoles élevées pénalisant les pays en voie de développement, et dont l'activité défavorise voire anéantit les petits paysans et les cultures vivrières. L'alternative écologique à l'agriculture intensive est l'agriculture biologique [1].



**Figure 2:** un traitement chimique d'une parcelle [1].

### **2. 1. Définition des pesticides :**

sont définis comme des composés chimiques utilisés par les agriculteurs pour lutter contre les animaux (insectes, rongeurs) ou les plantes (champignons, mauvaises herbes) jugés nuisibles aux plantations. Si les pesticides sont d'abord apparus bénéfiques, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence. Leur toxicité, liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas en effet aux seules espèces que l'on souhaite éliminer. Ils sont notamment toxiques pour l'homme (Calvet, 2005 ; Khopkar, 2007).

### **2.2. Classification des pesticides :**

Il existe plusieurs types de classifications des pesticides. Parmi elles, il existe la classification basée selon leur cible biologique et celle basée selon leur nature chimique (Garcia et al., 2012).

### **2.2.1. Classification selon la cible biologique :**

- **Les fongicides**

Leur rôle est de combattre les maladies cryptogamiques (protection contre le développement des champignons microscopiques). Les fongicides agissent en perturbant le métabolisme glucidique, la biosynthèse de l'ADN et de l'ARN tout en inhibant la respiration ainsi que la division cellulaire (**Periquet et al., 2004**).

- **Les herbicides**

Les herbicides sont des pesticides couramment utilisés dans le monde (**Samuel, 2001**). Leur rôle est de détruire les plantes adventices (végétation indésirable) qui détournent les ressources organiques et minérales du sol des cultures. Ils peuvent agir de différentes façons sur les plantes, tel qu'en inhibant la division cellulaire et la synthèse des acides aminés, de la cellulose ainsi que des lipides ou encore en perturbant la photosynthèse et la régulation de l'auxine qui est l'hormone de croissance des végétaux (**Periquet et al., 2004**).

- **Les insecticides**

Leur rôle est de protéger les plantes contre les insectes en entraînant des actions neurotoxiques, régulatrices de croissance et inhibitrices de la respiration. Les principes actifs des produits de cette classification sont généralement des organochlorés (**Periquet et al., 2004**). Parmi les insecticides figurent le Perméthrine et le Chlorpyrifos (**Baldi et al., 2013**).

### **2.2.2. Classification selon la nature chimique :**

Les trois principales familles de cette classification sont les organochlorés (OC), les carbamates et les organophosphorés (OP) (**Baldi et al., 2013**).

#### **2.2.2.1. Les organophosphorés :**

Les pesticides de cette famille sont des esters de l'acide phosphorique. Leurs substances actives sont chimiquement instables et se terminent généralement par « phos » ou « thion ». ils se divisent en trois groupes : Les organophosphorés aliphatiques, les dérivés phényles et les hétérocycles (**Periquet et al., 2004**).

Les OP agissent sur les plantes de deux manières : soit par un effet systémique, lorsqu'il y a distribution du produits dans la plante après sa pénétration ; soit par une action de surface, lorsque le produit n'est pas véhiculé dans le végétal (**Periquet et al., 2004**).

Ces composés sont distribués dans tout l'organisme et ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Parmi eux, les plus liposolubles sont stockés dans les graisses, ce qui conduit à leur redistribution, et donc, à l'apparition de symptômes retardés et d'évolutions prolongées (**Testud et Grillet, 2007**).

Les OP, que cela soit chez l'animal ou chez l'homme, inhibent l'activité des enzymes qui assurent le fonctionnement du système nerveux, essentiellement l'acétyl-cholinestérase (**Noworyta-Glowacka et al., 2012**).

Cette dernière module le taux d'un neurotransmetteur appelé acétylcholine. Cette inhibition est possible par la phosphorylation de sérine du groupe hydroxyle dans le site actif de l'enzyme, ce qui a pour conséquence la perturbation de l'influx nerveux (**Garcia et al., 2012**).

### **a. Le Chlorpyriphos-éthyl :**

#### **a.1. Caractéristiques physico-chimiques et mode d'action :**

Le Chlorpyriphos-éthyl (CAS no 2921-88-2) ou O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, est un insecticide non systémique, à large spectre, commercialisé par Dow AgroSciences depuis 1965. Il appartient à la famille des organophosphorés et agit au niveau du système nerveux, en inhibant l'acétylcholine estérase qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur majeur (**Doran et al., 2001; Barata et al., 2004 ; Buchwalter et al., 2004 ; Lukaszewicz-Hussain, 2010 ; Čolović et al., 2011**).

Les seuls usages rapportés pour le Chlorpyriphos-éthyl sont liés à son action de pesticide (EPA, 2000) et il est appliqué directement sur le feuillage ou le sol pour le contrôle des parasites vivant dans le sol agricole ou urbain.

Il est utilisé pour lutter contre les moustiques, les fourmis, les cancrelats, les puces et les poux. Il est aussi efficace comme insecticide sur le cotonnier, les fruits et les légumes. Il agit sur les parasites comme un poison de contact avec une certaine action nocive sur leur estomac. La dose d'emploi est de 25 ml pour 15 litres d'eau (**Fabre et Truhaut, 1954**).

### **a.2. Toxicité du produit :**

Après son application, le Chlorpyrifos-éthyl se retrouve à la fois dans les compartiments atmosphérique (**Peck et al., 2005 ; Hageman et al., 2006 ; Yao et al., 2008 ; Zhou et al., 2010**), aquatique ( [2] ; **Coupe et Blomquist, 2004**) et dans les sols.

Dans le sol, le chlorpyrifos se dégrade lentement, avec un temps de demi-vie estimé à 35 jours (**Gouzy et al., 2005**).

Les pesticides organochlorés subissent une dégradation naturelle dans l'environnement, accentuée par la lumière et par la présence de métaux dissous, de substances humiques et de microorganismes (**Dannenberg et Pehkonen, 1998 ; Pehkonen et Zhang, 2002 ; Kralj et al., 2007 ; Theriot et Grunden, 2011**).

Chez certains animaux et chez l'Homme, le Chlorpyrifos-éthyl est généralement absorbé par voies respiratoire, orale et/ou cutanée. Il affecte les systèmes respiratoire, cardiovasculaire et principalement nerveux par inhibition de l'acétylcholinestérase avec pour conséquences des convulsions, des paralysies et même la mort (**Fabre et Truhaut, 1954**).

### **3. Le stress oxydant:**

Le métabolisme cellulaire normal produit en permanence des espèces oxygénées réactives (ERO). Par exemple, au cours de la respiration, chaque cellule réduit l'oxygène en eau. Parfois, une partie de cet oxygène échappe à la transformation complète et donne une forme d'oxygène très réactive: l'anion superoxyde (**caractéristique des radicaux libres**).

D'autres radicaux libres sont générés en chaîne à partir des diverses réactions chimiques de notre organisme. Ces molécules, très agressives, sont normalement éliminées par des systèmes de défense enzymatiques ou biochimiques. En outre, Il existe aussi des systèmes réparateurs chargés de corriger les effets toxiques des radicaux libres (**Boveris et al., 1972**).

Les radicaux libres peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour aller altérer des composants cellulaires éloignés de leur site de production ou encore pour atteindre d'autres cellules (**Boveris et al., 1972**).

De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (**lipides, protéines ou glucides**) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équipement antioxydant tissulaire efficace pour stopper cet enchaînement radicalaire, le phénomène de dégradation connaît une progression rapide, qui, après interaction avec les autres systèmes tissulaires, devient très vite exponentielle. Cette transmission extrêmement rapide peut alors conduire au transfert de l'agression radicalaire sur plusieurs centimètres au sein d'un tissu en une fraction de seconde (**Neuzil et al., 1993**).

### ✓ La défense anti-oxydante :

Lorsque des ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, les peroxy-rédoxines... (**Morel et Barouki, 1998; Delattre, 2005**). Dans un premier temps, la cellule ne modifie pas ses propriétés biologiques. Si les ERO continuent à s'accumuler, une adaptation plus consistante de la cellule est nécessaire avec l'induction de gènes codant des enzymes anti oxydantes, des protéines chaperons, des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines. On observe aussi une répression des systèmes susceptibles de libérer des ERO, notamment la chaîne respiratoire, les cytochromes P450 et la NADPH oxydase (**Morel et Barouki, 1999 ; Barouki et Morel, 2001**).

Dans ces conditions, nous pouvons parler de stress dans la mesure où la cellule a adapté ses fonctions biologiques, notamment son expression génique, aux modifications de son environnement (**Desaint et al., 2004**).

#### **4. Les bio-indicateurs :**

Les bio-indicateurs sont des espèces animales ou végétales qui, en raison de leurs spécificités écologiques, jouent le rôle d'indicateurs précoces (organismes sentinelles) de modifications d'origine anthropique, biotiques ou abiotiques de l'environnement (**Burgeot, 1998**).

Les bio-indicateurs sont particulièrement utilisés en écotoxicologie pour la surveillance de l'environnement. On distingue deux types : certaines espèces sont des bio-indicateurs d'effets écologiques d'une catégorie de polluants. D'autres espèces sont des bio-indicateurs qui bioconcentrent les polluants, facilitant leur étude dans l'environnement. (**OECD, 2002**).

Les indications de la pollution peuvent être apportées par la disparition de certaines espèces plus ou moins sensibles ou, au contraire, par la survenue d'autres espèces dites résistantes. (**Burgeot, 1998 ; OECD, 2002**).

Parmi les autres indications fournies par les bio-indicateurs, on peut parler des espèces indicatrices de contaminations diffuses ou chroniques. Il s'agit surtout d'espèces qui se révèlent de précieux auxiliaires pour mesurer ou suivre des phénomènes comme la bioaccumulation dans les chaînes alimentaires. Les organismes aquatiques filtreurs peuvent concentrer suffisamment un produit libéré à l'état de traces indécélables dans un milieu ou un rejet (**Beek, 1999**).

#### **5. Rappel sur les protistes :**

En systématique, selon la classification classique, le terme Protiste (du grec Protos = premier) désigne l'un des règnes du vivant regroupant tous les êtres vivants mobiles et unicellulaires.

Le règne des Protistes se divise généralement en deux parties: les Protozoaires et les Protophytes.

Les Protozoaires sont des organismes unicellulaires, formant une entité paraphylétique, ils possèdent une cellule Eucaryote très différenciée qui remplit de nombreuses fonctions nécessaires à la vie et comportant des organites complexes : "vacuoles pulsatiles", "cils", "flagelles" (**Patterson, 1999**).

On leur distingue cinq sous-embranchements selon Adel et al ; (2005):

- Les Actinopodes qui émettent de fins pseudopodes rayonnants.
- Les Cnidosporidies sont des parasites dont le stade initial est un germe amiboïde et le stade final une spore pourvue d'un filament évaginable.
- Les Rhizoflagellés qui comprennent les rhizopodes et les flagellés.
- Les Sporozoaires (ou Apicomplexes) sont dépourvus à l'état adulte d'appareil locomoteur. Ce sont des parasites des cellules animales pourvus d'un complexe apical et se reproduisant par sporogonie.
- Les infusoaires ou infusoires sont des Protistes de grande taille (jusqu'à 300 µm pour la paramécie). Ils sont munis d'un macronucléus et d'un micronucléus. On y distingue:
  - \*Les Holotriches (paramécie).
  - \*Les Spirotriches ayant une ciliature buccale en spirale à droite (Stylonichia).
  - \*Les Péritriches ayant une ciliature buccale en spirale à gauche (vorticelle).
- Les Protophytes sont des organismes végétaux unicellulaires ou à cellules peu différenciées.

### 5.1. Taxonomie :

Les différentes espèces de paramécie ont été connues depuis plusieurs années, mais c'est en 1950 et grâce aux contributions de Fauré-Fremiet (1924) que le genre *Paramecium* doit sa position systématique en tant que cilié. Ses observations ont été confirmées par Corliss (1961) et Roque (1961).

D'après Müller, 1773 (**Cudmore et al, 1977**), les paramécies appartiennent au :

Règne : *Protista*

Embranchement : *Ciliophora*

Classe : *Oligohymenophora*

Ordre : *Peniculida*

Famille : *Parameciidae*

Genre : *Paramecium*

## 5.2. Rappels sur la paramécie (*Paramecium* sp.) :

Les paramécies sont des organismes unicellulaires (Protozoaires), de forme oblongue, dont le corps uniformément couvert de cils (ciliés, holotriches) est fréquemment visible à l'œil nu; en effet, leurs dimensions sont, selon les espèces prises en considération, comprises entre 70 et 350 $\mu$ .

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 (**Beaumont et Cassier, 1998**).

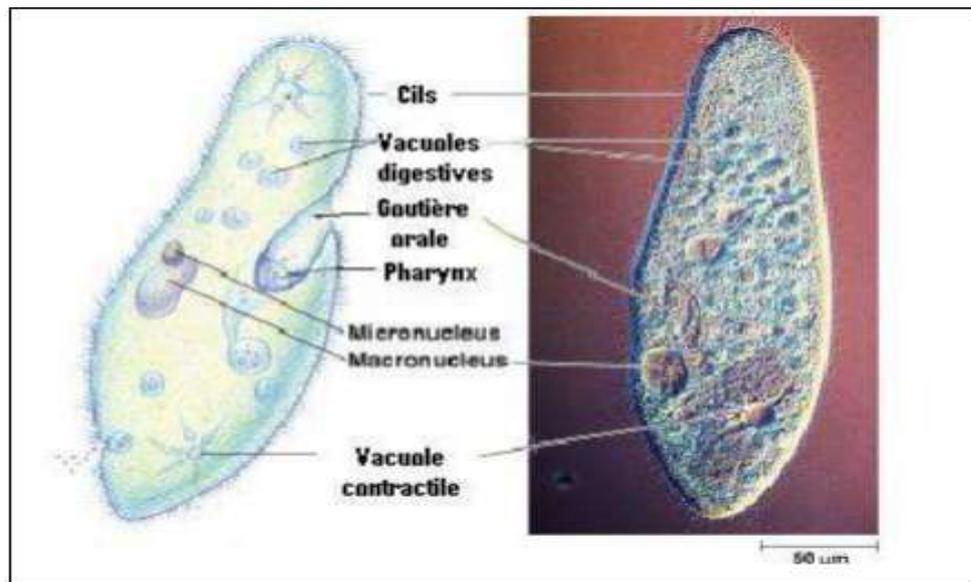
Par leur grande taille et l'extrême facilité de leur élevage, les paramécies constituent un matériel de choix pour l'étude morphologique, cytologique et cytochimique des protozoaires ciliés.

Leur cytoplasme limité par une mince cuticule présente une zone périphérique hyaline et visqueuse, cette cuticule est résistante, souple, et élastique, limite l'amplitude des déformations du corps de la paramécie, elle s'oppose à l'émission de pseudopodes. Après toute déformation, grâce à la présence de cette différenciation superficielle le corps de la paramécie reprend sa forme initiale (**Beaumont et Cassier, 1998**).

Vivant dans un milieu hypotonique par rapport à son cytoplasme, la cellule absorbe constamment l'eau de son environnement par osmose. L'excès d'eau dans le cytoplasme est alors évacué grâce à des vacuoles pulsatiles, où le cytoplasme se contracte périodiquement pour expulser l'eau à travers la membrane plasmique.

La paramécie possède deux noyaux contenant le matériel génétique à fonctions complémentaires :

- **Le macronucléus** : volumineux, polyploïde, ovoïde dont la fonction est indispensable à la survie de la cellule car il assure toutes les fonctions végétatives. Il se forme à chaque génération sexuelle par des réarrangements programmés de tout le génome germinal, qui aboutissent à des chromosomes redessinés pour l'expression des gènes.
- **Le micronucleus** : sphérique, de taille réduite, diploïde et souvent difficile à observer. Il subit la méiose et transmet l'information génétique à la génération sexuelle suivante (Cohen, 2007).



**Figure 3:** Structure d'une paramécie sous microscope (Génoscope, 2007).

**Cils vibratoires:** cils minuscules entourant la paramécie et lui permettant de se déplacer.

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

**Vacuole digestive:** cavité de la paramécie responsable de la digestion. **Petit noyau:** un des organites centraux moins importants de la paramécie. **Gouttière orale:** canal de la paramécie responsable d'aspirer les nutriments.

**Pharynx:** cavité du pharynx.

**Ectoplasme:** partie superficielle vitreuse de la paramécie.

**Endoplasme:** partie centrale de paramécie.

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

**Trichocyste:** racine du cil vibratile de la paramécie.

### 5.2.1. 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 (Cohen, 2007).

### 5.2.2. Reproduction :

Les paramécies se reproduisent par :

- **Division cellulaire** : les micronucleus se divisant par mitose, le macronucléus se divisant simplement en deux micronucleus fils.
- **Conjugaison** : la conjugaison des paramécies est un processus sexuel de recombinaison génétique (des paramécies individuelles échangent un micronucleus pendant la recombinaison), mais ce n'est pas un processus de reproduction. Les deux mêmes cellules débutent et achèvent le processus et aucune nouvelle cellule n'est créée (Purves et al., 2000).

### 5.2.3. Alimentation :

La paramécie possède un mécanisme d'alimentation permanent constitué par une cavité buccale (péristome) prolongée vers l'arrière : le vestibule; c'est une cavité tubulaire invaginée dans l'endoplasme (l'endoplasme contient les organites de la nutrition: le péristome et les vacuoles digestives) où les aliments sont collectés par la combinaison de l'action des cils couvrant le corps et les autres cils couvrant le vestibule, les paramécies se nourrissent des organismes comme les bactéries et autres protozoaires (Samworth et Morgan, 2000).

### 5.2.4. Respiration :

Les paramécies sont avides d'oxygène, leur respiration se fait par des échanges gazeux avec l'environnement exclusivement par la surface corporelle (Wehner et Gehring, 1995).

### 5.2.5. Génomique et mécanismes d'évolution de la paramécie :

La paramécie est l'un des premiers organismes unicellulaires à avoir été observé lors de l'invention du microscope au dix-septième siècle. Depuis lors, sa facilité de culture, sa grande taille, et la facilité d'observation de ses fonctions cellulaires variées en ont fait un modèle

d'étude privilégié pour les scientifiques. Depuis 50 ans, une petite communauté de biologistes américains, européens et japonais l'utilise pour l'étude de l'organisation cellulaire et de l'hérédité, en particulier des phénomènes épi génétiques.

Des chercheurs du CNRS et du Génoscope ont réalisé le décryptage du génome somatique de la paramécie et découvert qu'il possède près de 40000 gènes, contre "seulement" 25000 pour l'homme. Ils ont ensuite démontré que ce patrimoine exceptionnel résultait d'au moins trois duplications successives de tout le génome.

Les duplications de génome sont des évènements rares mais qui se sont produits de manière récurrente au cours de l'évolution des eucaryotes. Depuis longtemps, on postulait qu'elles pouvaient être à l'origine de transitions évolutives majeures, car le doublement du nombre de gènes offre un large potentiel d'innovation, et donc d'adaptation des espèces (Cohen, 2007).

### **6. Justification du choix de *Paramecium* sp. Comme modèle biologique :**

Afin d'être largement utilisables, les tests de toxicité doivent être simples, rapides, sensibles, répétables et peu chers (Giesy et al., 1989). Les espèces utilisées lors de ces tests sont choisies afin de répondre au mieux à ces critères, qui se traduisent par les contraintes suivantes :

- Sa distribution géographique est large (Bennett et al., 1992).
- Il joue un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème (Kosmala et al., 1999).
- Sa culture et sa manipulation sont simples.
- Son habitat naturel correspond au compartiment aquatique testé (Taylor et al., 1991)
- Il est sensible au produit testé (Mc Pherson et al., 2000).
- Il est possible d'étudier les effets aigus et chroniques du produit et éventuellement sa bioaccumulation (Chapman, 2001).

*Paramecium* sp. est l'un parmi de nombreux genres qui soit susceptibles de satisfaire au moins partiellement ces critères. En effet, cette espèce eucaryote unicellulaire est, d'une part, facile à cultiver, sa taille permet de suivre, à faible grossissement, le cycle cellulaire, la conjugaison, le comportement, sécrétion, la morphogenèse, ainsi que d'autres critères. Plusieurs particularités biologiques en facilitent l'étude biochimique. D'autre part, le

processus d'autogamie, qui produit des clones 100% homozygotes et simplifie l'analyse toxicologique. L'ensemble de ces données expérimentales nous ont donc conduits à choisir *Paramecium sp.* Comme modèle d'étude ( **Benbouzid ,2012** ) .

### **7. Objectif du travail :**

C'est à partir de ces éléments bibliographiques que s'est construite notre problématique, celle-ci consiste à développer et à analyser de nombreux aspects liés à la toxicité d'un insecticide à base de «chlorpyrifos-éthyl» sur les protistes ciliés (*Paramecium sp.*)

# Chapitre II :

# **Matériel et**

# **méthodes**

## 1. Matériel :

### 1.1. Matériel biologique :

Le modèle cellulaire utilisé est un microorganisme unicellulaire, courant dans les eaux douces et les eaux stagnantes. Un genre bien connu des protozoaires ciliés qui est: *Paramecium sp.* ou paramécie.

### 1.2. Matériel chimique :

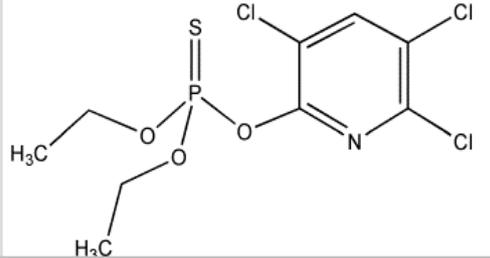
Le matériel chimique utilisé est un insecticide contenant uniquement le Chlorpyrifos-éthyl comme substance active.



**Figure 4:** Emballage de l'insecticide étudié.

### ❖ Propriétés chimiques du Chlorpyrifos:

Le Chlorpyrifos est un solide cristallin de couleur ambre à blanche, faisant partie de la famille des organophosphorés (Mackay et al., 1999).

Substance chimique	Synonymes	Formule développée
Chlorpyrifos $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Chlorpyrifos <b>Chlorpyrifos ethyl</b> Trichlormethylfos	

**Tableau 1:** Caractéristiques des composés de la famille du Chlorpyrifos (ACTA, 2004).

- **Nom chimique:**  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$  ou diethoxy-sulfanylidene-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl) oxyphosphorane.
- **Formule moléculaire:**  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$  et la masse molaire est de 350,575 g/mol (Mackay et al., 1999).

## 2. Méthodes :

### 2.1. Préparation de la culture de paramécies :

#### 2.1.1. Culture mixte :

Du foin coupé en petit morceaux est infusé dans un récipient contenant de l'eau distillée. On laisse l'infusion dans un lieu tiède, sombre et bien aéré.

Après quelques jours, on observe au microscope optique les paramécies et sans coloration, dont ces derniers se nourrissent au dépend du voile bactérien.

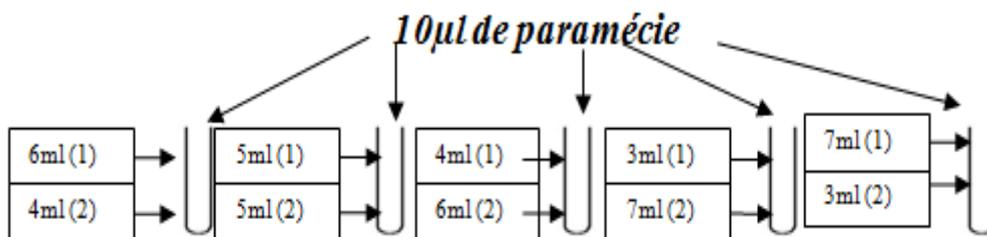
La culture des paramécies a été effectuée selon la méthode de (Beaumont et Cassier, 1998).

### 2.1.2. Préparation du milieu de culture :

On met du foin 7,5g, blé 7,5g, laitue 10g, concombre 5g, pomme de terre 5g, une pincée de levure et source de stérol végétal (2g de cacahuètes ou d'amendes). la mixture est bouillie dans 1,5 litre d'eau distillée pendant une heure. Le bouillon est filtré, stérilisé par ébullition à 100°C pendant 30 min dans un flacon thermorésistant et conservé à l'abri de la lumière (Azzouz et al., 2011).

### 2.1.3. Incidence du milieu de culture sur la croissance des paramécies :

A fin d'avoir une bonne croissance d'une culture de paramécie ont effectué des différentes dilutions du milieu de culture (Azzouz et al., 2011).



- (1) Eau distillée.
- (2) : milieu de culture.

On suit la croissance dans les différentes dilutions pendant une semaine, et on choisit pour notre étude la dilution qui donne la meilleure croissance.

On a trouvé que le tube qui donne la meilleure croissance est le tube 1 (contenant 6ml eau distillée et 4ml milieu de culture).

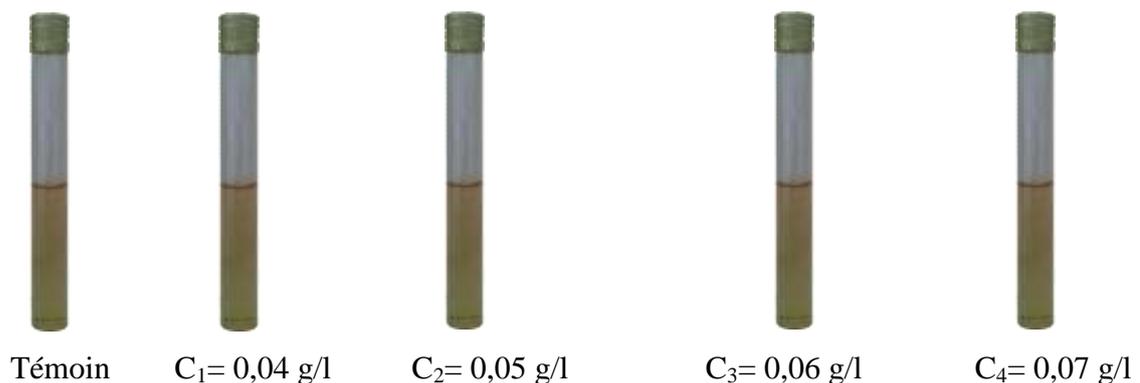
### 2.1.4. Protocol de traitement :

Nous avons opté pour un type de toxicité qui nous permet d'obtenir une réponse biologique en un temps assez court. De plus la recherche sur la toxicité sublétales est

nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux puisque ce sont ces effets qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution environnementale (Benosmane, 2015).

A partir du produit commercial, nous avons préparé une solution mère de 0,07 g de Chlorpyrifos à 2% dans un litre d'eau distillée, puis nous avons déterminé 04 concentrations ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  et  $C_4$ ) correspondant respectivement à 0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l et un échantillon témoin (T). Ces concentrations sont déterminées à partir d'une CL50 d'un essais de test de toxicité aiguë chez les poissons (*Oreochromis niloticus*) CL50 (24h)= 0.154 mg/l et des résultats de plusieurs tests d'une gamme de concentrations.

Les tests sont réalisés dans des tubes à essais de 10 ml de culture de paramécies selon le protocole suivant :



Les tests sont répétés 3 fois et les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne  $\pm$  l'écart type.

## 2.2. Paramètres mesurés :

### 2.2.1 Cinétique de croissance cellulaire :

La cinétique de croissance des paramécies est réalisée par dénombrement de cellules sous microscope photonique, en utilisant une goutte de Lugol pour immobiliser les protistes ciliés (Sauvant et al., 1999).

La cinétique de croissance est suivie en fonction des temps longs aussi bien pour les témoins que pour les traitées selon le protocole suivant :

L'observation microscopique est effectuée sous microscope photonique (OPTICA Axiom 2000) au grossissement  $\times 40$  pendant une semaine.

### 2.2.2. Pourcentage de réponse :

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis de l'insecticide, il est basé sur l'équation suivante :

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

Où :  $N_C$  : Nombre des cellules témoins.

$N_E$  : Nombre final des cellules traitées.

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

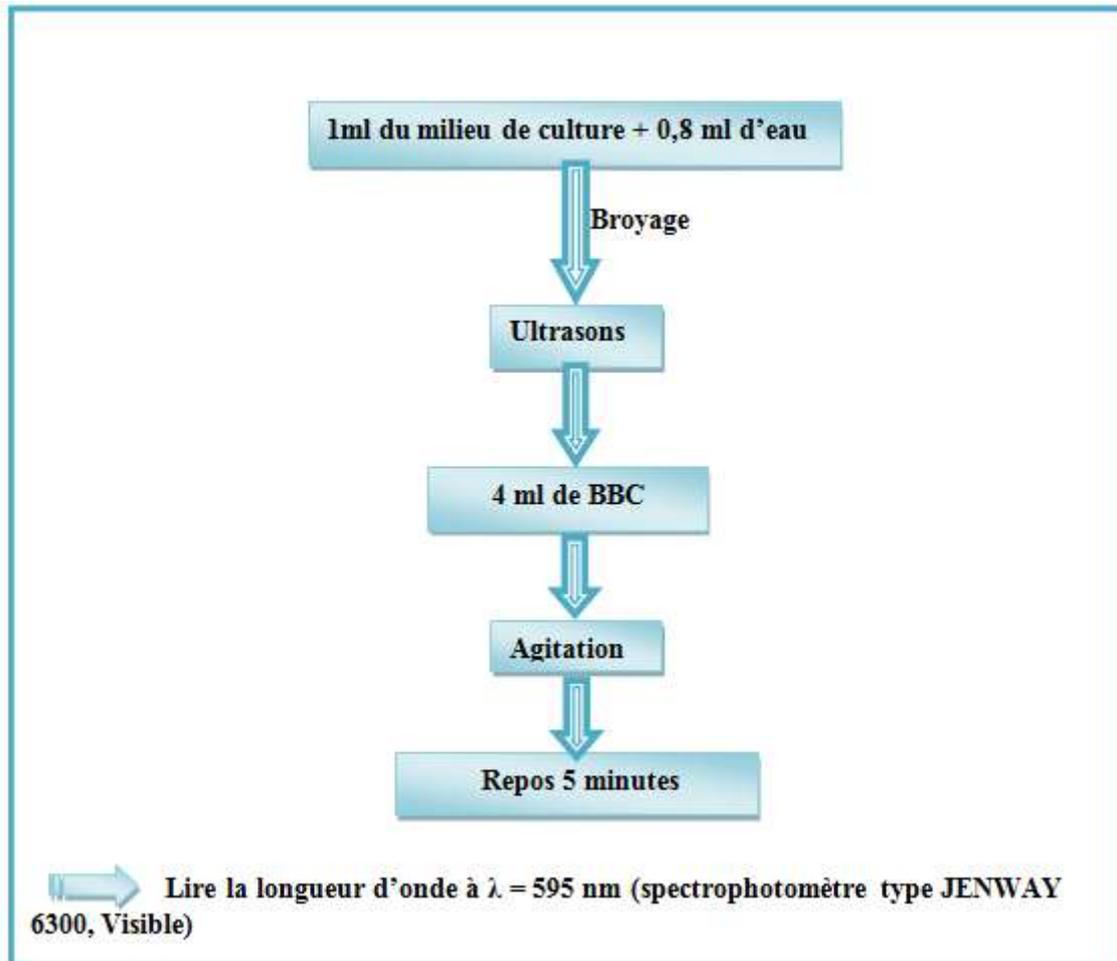
### 2.2.3. Dosage des protéines totales :

Les protéines sont mesurées par colorimétrie selon la méthode de Bradford (1976).

#### ➤ Principe de la méthode :

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur d'un colorant acide BBC (bleu brillant de Coomassie) après liaison sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques.

➤ **Technique du dosage des protéines :**



**Figure 5:** Protocole expérimentale du dosage des protéines.

2.2.4. **Dosage du glutathion (GSH) :**

• **Principe du dosage du GSH :**

Ce principe repose sur la mesure de la densité optique de l'acide 2-nitro-5mercapturique. Ce dernier résulte de l'action du réactif d'Ellman (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25% afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion (Weeckbeker et Cory, 1988).

• **Protocole expérimental :**

- Mettre 500µl de milieu de culture individuellement (témoins et traités) en présence de 1ml de solution EDTA à 0,02M.
- Broyer les échantillons à l'ultrason (Sonifer B-30) pendant 10 secondes dans un bac de glace.
- Prélever 0,8 ml de l'homogénat auquel on y ajoute 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Passer au vortex et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000 tours pendant 5minutes.
- Ajouter au mélange: 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA; pH= 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à  $\lambda = 412$  nm (Spectrophotomètre JENWAY 6300, Visible).

La concentration en glutathion est obtenue après application de la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg}} \quad (\mu\text{M} / \text{mg})$$

1: Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.

1,525: Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).

13100: Coefficient d'absorbance (concernant le groupement (-SH) à  $\lambda = 412$  nm).

0,8: Le volume de l'homogénat.

0,5: Le volume du surnageant.

**2.2.5. Dosage de l'activité Catalase CAT :**

Le principe du dosage de catalase est effectué selon la méthode (**Regoli et Principato, 1995**) Par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  à une

longueur d'onde 240 nm.

La réaction est déclenchée par l'addition d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la décroissance de l'absorbance est enregistrée.

- Mg de protéines :
- 100 µl surnageant.
- 4 ml BBC.
- Lecture de Do à 595nm.
- 

L'activité Catalase (CAT) est exprimée en µmol d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute et par mg de protéines selon la formule suivante :

$$\text{CAT } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) = \frac{(\Delta D_0 \times 10)}{\epsilon \times L \times 0,05 \times \text{mg de protéine}}$$

**X** : µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minute et par mg de protéines

**Δ D<sub>0</sub>** : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

**ε**: Le coefficient d'extinction est de 0,0040 m M<sup>-1</sup>. Cm<sup>-1</sup>

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

**mg de protéines** : quantité de protéines exprimée en mg.

# Chapitre III :

# **Résultats**

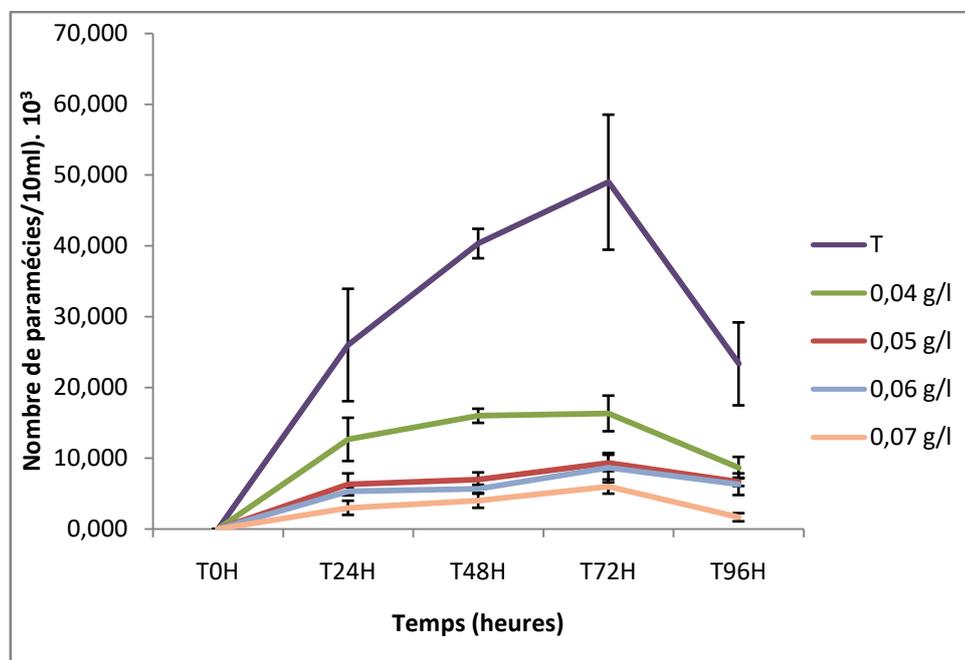
## 1. Cinétique de croissance des paramécies :

Les courbes de croissance offrent des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée.

**La figure 6** représente l'effet de concentrations croissantes (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyriphos-éthyl sur les variations de la croissance cellulaire durant 4 à 5 jours.

Nous constatons une stimulation de la croissance cellulaire du 1er jour au 3<sup>ème</sup> jour, c'est la phase exponentielle de croissance. Après le 3<sup>ème</sup> jour, nous remarquons une phase de déclin qui se poursuit jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour.

Chez les témoins, le maximum est atteint vers 72h avec un nombre de cellules d'environ 5000 paramécies/ml, alors que chez les traités à la même heure ce nombre n'est que d'environ 1600 cellules/ml pour la plus faible concentration de 0.04 g/l et diminue de manière dose-dépendante à la plus forte concentration (0,07 g/l) avec 600 paramécies/ml.

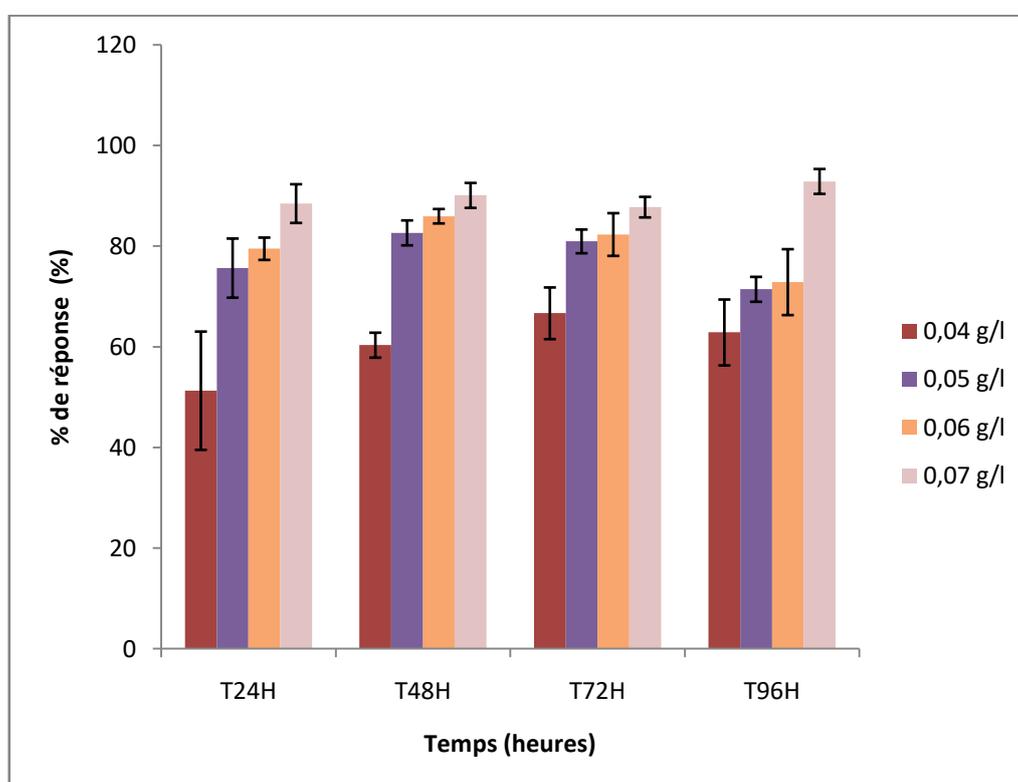


**Figure 6 :** Cinétique de croissance des paramécies témoins et traitées aux concentrations 0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l du Chlorpyriphos-éthyl.

## 2. Pourcentage de réponse :

Le pourcentage de réponse permet d'évaluer les effets du Chlorpyriphos-éthyl sur la viabilité des paramécies et confirmer ainsi les résultats obtenus avec la cinétique de croissance du protiste.

La **Figure 7** montre que le pourcentage de réponse des paramécies évolue d'une manière dose-dépendante et proportionnelle aux concentrations croissantes de l'insecticide. On constate qu'il est dans l'intervalle de 51 à 63% pour la plus faible concentration qui est de 0.04 g/l et atteint 88 à 93% pour la plus forte concentration (0.07 g/l) et cela du début jusqu'à la fin de la période de traitement.

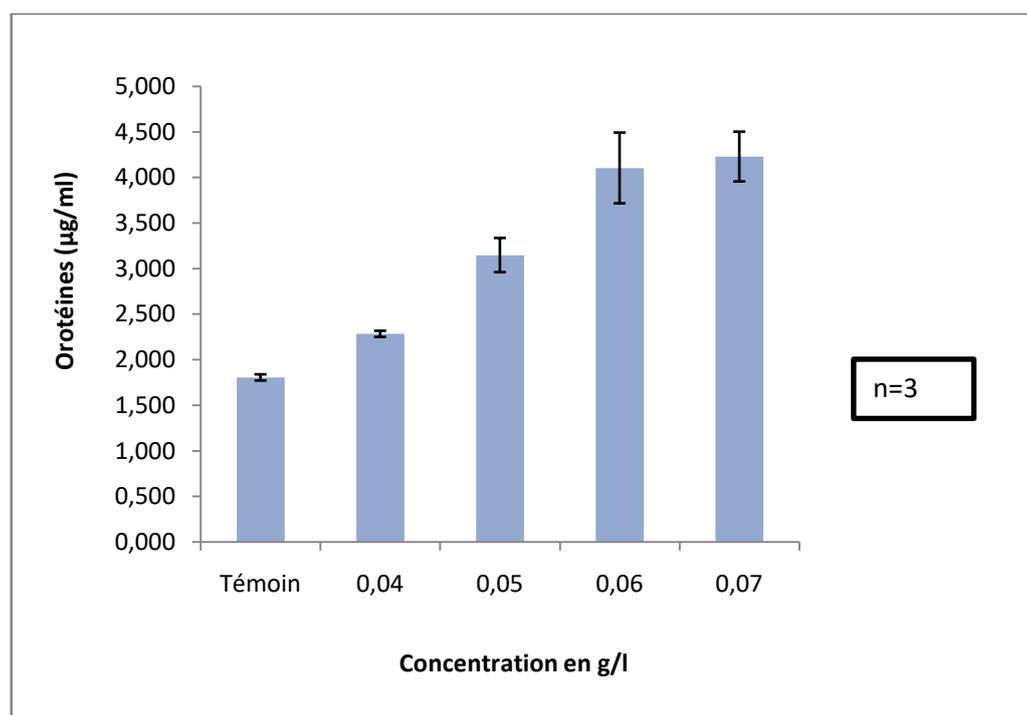


**Figure 7** : Pourcentage de réponse des paramécies traitées aux concentrations 0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l du Chlorpyriphos-éthyl.

### 3. Effet du Chlorpyrifos-éthyl sur le taux des protéines totales :

La Figure 8 montre l'effet des différentes concentrations du Chlorpyrifos-éthyl sur le taux de protéines totales des paramécies.

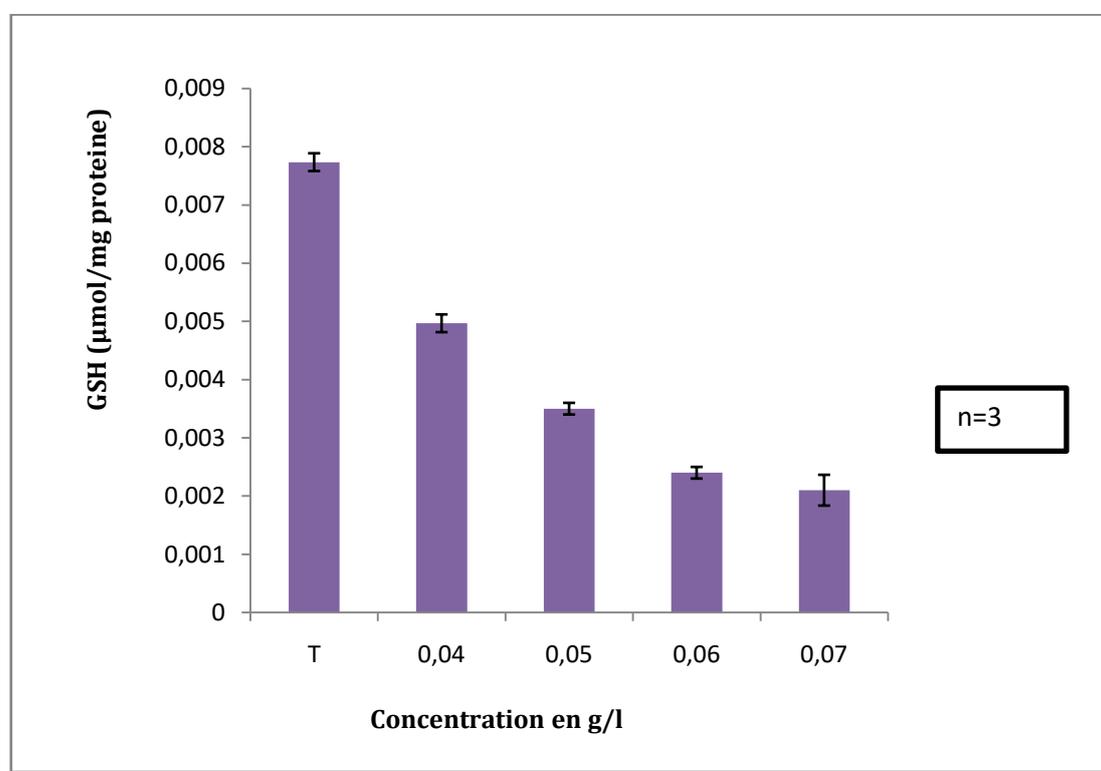
Nos résultats montrent qu'en présence du xénobiotique, le taux de protéines totales tend à augmenter de manière dose-dépendante chez les paramécies traitées par rapport aux témoins. En effet, cette dernière est de l'ordre de 42% chez les traités à la plus forte concentration (0,07 g/l) de Chlorpyrifos par rapport aux témoins.



**Figure 8 :** Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur le taux des protéines totales.

#### 4. Variation du taux du Glutathion (GSH) :

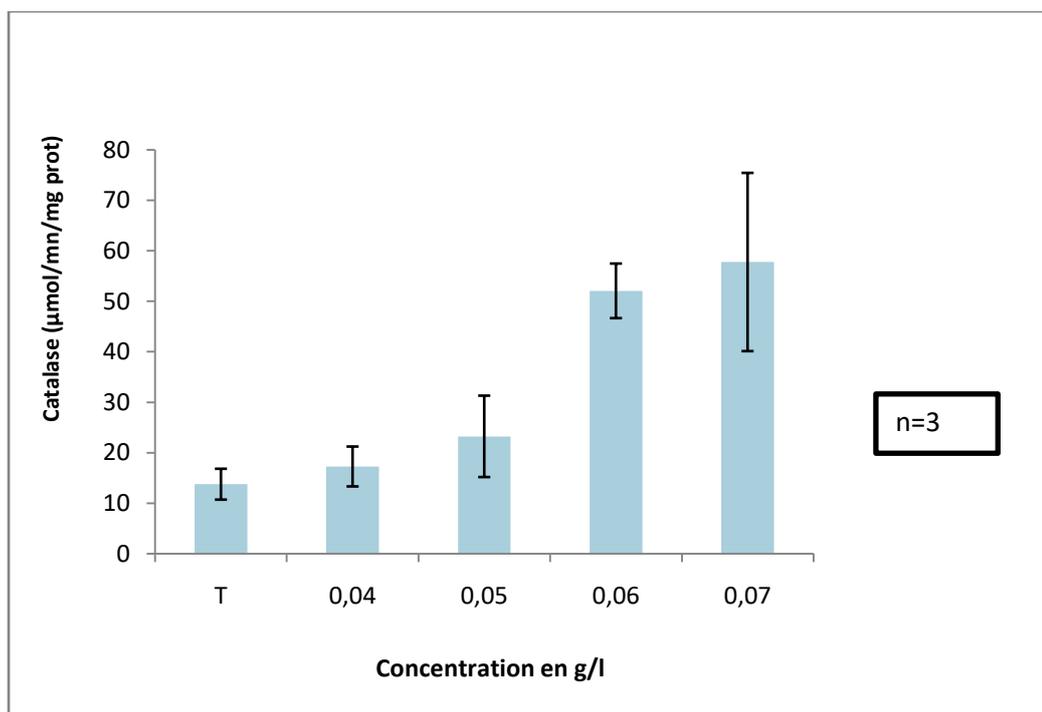
La Figure 9 représente les variations du taux de Glutathion des paramécies soumises aux différentes concentrations du Chlorpyriphos-éthyl. On constate que le taux de GSH des cellules à diminuer à partir de 0.005  $\mu\text{M}/\text{mg}$  protéine chez les cellules traitées par la plus faible concentration (0,04 g/l) jusqu'à en arriver à un taux de 0.002  $\mu\text{M}/\text{mg}$  protéine chez les traitées par la plus forte concentration (0.07g/l). Cette diminution est de manière dose dépendante.



**Figure 9** : Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur le taux de GSH.

## 5. Effet du Chlorpyriphos-éthyl sur l'activité Catalase :

La **Figure 10** représente les variations de l'activité catalase obtenus chez les paramécies traitées aux différentes concentrations du Chlorpyriphos-éthyl. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité de cette enzyme. Cette augmentation est de manière dose-dépendante.



**Figure 10:** Effet des différentes concentrations (0.04, 0.05, 0.06 et 0.07 g/l) du Chlorpyrifos sur l'activité Catalase.

# Chapitre IV :

# **Discussion et conclusion**

### Discussion

La qualité de l'eau est essentielle pour le maintien de la santé des organismes aquatiques et la présence de toxiques dans l'eau est une menace pour les organismes qui habitent ces masses d'eau. Le rapport de l'Agence de protection de l'environnement de 1990 donne à penser que la pollution des rivières et des étangs vient principalement de l'agriculture (**Cook et al., 1995**).

De nombreux pesticides sont utilisés par les agriculteurs indifféremment pour contrôler les insectes nuisibles. Ils sont susceptibles de polluer l'eau et d'affecter ainsi les organismes qui peuplent ces eaux (**UjwalaGarad et al., 2007**).

Cet aspect nous a conduit à les utiliser comme outils d'évaluation de l'impact des xénobiotiques sur l'environnement (**Sauvant et al., 1999**).

Ces contaminations peuvent donner naissance à de nouvelles forces sélectives qui peuvent avoir une incidence globale sur la diversité biologique. En effet, plusieurs travaux ont été effectués, et en 1978, Cairns suggère l'utilisation des protozoaires comme bio-indicateur de la pollution de l'eau.

Le fait que ces micro-organismes soient des eucaryotes dotés de toutes les structures d'une cellule de métazoaire permet l'extrapolation des moindres variations.

C'est pourquoi notre choix s'est porté sur ce modèle biologique afin d'étudier le mécanisme cellulaire de la toxicité du Chlorpyriphos-éthyl et cela durant 96 heures et sur certains paramètres biochimiques tels que les protéines totales, l'activité Glutathion et la Catalase.

Les microorganismes en présence de xénobiotiques, toxines ou composés peroxydés par exemple, ont la capacité de développer un processus de détoxification et ce processus est d'ordre biochimique (**Peccini et al., 1994 ; Massaya et al., 2002 ; Redouane-Salah, 2004**) .

En l'absence d'équipements cellulaires efficaces pour stopper les flux radicalaires, le phénomène connaît une progression géométrique rapide, qui, après interaction avec d'autres systèmes, devient très vite exponentielle (**Neuzil et al., 1993**) conduisant à la mort des cellules.

**Quels sont les effets du Chlorpyriphos-éthyl sur la croissance cellulaire et le pourcentage de réponse ?**

L'évaluation des effets cytotoxiques d'un xénobiotique peut être réalisée en utilisant différents paramètres, parmi lesquels la croissance cellulaire qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule (**Sauvant et al., 1999 ; Perez-Rama et al., 2001**).

Ces organismes sont d'une sensibilité telle que tout changement de leur milieu (pollution, PH, ...) peut engendrer une modification de leur comportement (**Azzouz, 2011; Benbouzid, 2012**). .

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la cinétique de croissance des paramécies en présence de concentrations croissantes du xénobiotique (Chlorpyriphos-éthyl).

Nos résultats montrent que les différentes concentrations du Chlorpyriphos-éthyl perturbent la croissance des paramécies d'une manière dose dépendante. Ainsi, l'insecticide testé est toxique pour les micro-organismes. Cette toxicité se manifeste en premier lieu par une perte de la mobilité accompagnée des mouvements désordonnés des protistes ciliés, ces résultats sont en accord avec ceux de **Bouaricha et al. (2011)**. Ceci nous amène à confirmer l'influx du xénobiotique à l'intérieure des cellules, malgré la présence de la membrane cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive du xénobiotique mais qui reste néanmoins perméable (**Beaumont et Cassie, 1998**). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Rouabhi, (2006)** qui ont mis en évidence une inhibition de la croissance des paramécies en prés traitement par deux pesticides (Diflubenzuron et le Flucyclohexuron) ainsi que ceux de Benbouzid, (2007) qui a étudié l'effet toxique de quatre insecticides (Tebufempyrad, Fumbutatin, Chlorfenapyr et Fenazaquin) sur le même modèle biologique.

Il en est de même pour les travaux de **Fukushima et al. (1979)** qui montrent que la paramécie est un micro-organisme très proche des organismes supérieurs et que sa croissance est inhibée en présence de plusieurs xénobiotiques ce qui en fait un excellent bio indicateur/ bio-marqueur de la pollution. Ces mêmes résultats sont confirmés par **Fenske et al. (2001)**. Il en est de même pour les travaux d'**Einicker-Lamas et al. (2002)** qui a étudié la toxicité du Zinc et du Cuivre sur *Euglenagracilis* (algue chlorophyllienne flagellée) (**Redouane-Salah, 2004**).

Le pourcentage de réponse (**Wong et al., 1999**) est un paramètre qui confirme l'évolution des courbes de croissance des paramécies traitées aux différentes concentrations du chlorpyrifos-ethyl utilisées, ainsi il semble clair que cet insecticide est inhibiteur de croissance des paramécies. Ces résultats abondent dans le même sens que ceux de **Benbouzid (2007)** **Bouaricha et al. (2012)** et **Sbartai et al. (2012)** qui avaient étudié le stress chimique. Le comportement des paramécies confirme cette inhibition de la croissance de ces protistes. Ces travaux sont en accord avec nos résultats.

### **Quels sont les mécanismes biochimiques enclenchés suite à une toxicité par le Chlorpyrifos-éthyl ?**

Lorsque les micro-organismes sont soumis à des changements de leur environnement, ils sont stressés.

Ce stress peut être intense, et provoque la mort de ces micro-organismes sans que ces derniers n'aient pu réagir, particulièrement lorsque leurs enzymes de détoxification sont en déplétion (**Lagadic et al., 1997**).

Il peut aussi être moins intense, permettent alors aux micro-organismes de déployer une batterie de réponses à travers l'activation de leurs mécanismes de détoxification, afin de lutter, de survivre et dans certains cas, de s'acclimater à ce nouveau paramètre (**Lagadic et al., 1997**; **Benbouzid, 2010**; **Azzouz, 2012**; **Sbartai, 2012**). Ce processus est d'ordre biochimique.

De nombreuses études confirment le rôle des protéines totales chez les microorganismes, en effet (**Redouane-Salah, 2004**); (**Bouaricha et al., 2012**) et (**Sbartai et al., 2012**) mettent

en évidence une augmentation significatives du taux de protéines sous l'effet d'un stress chimique chez les micro-organismes. Nos résultats vont dans le sens de ces travaux, puisque le dosage des protéines totales a confirmé une augmentation croissante et dose –dépendante de ces dernières en présence du xénobiotique testé.

Les perturbations des teneurs en protéines en présence de l'insecticide testé suggèrent une entrée massive à travers la membrane cellulaire constituée d'un assemblage de lipides et de protéines maintenues par des interactions non covalentes (**Alberts et al.,1986**) et que l'insecticide exerce son action dès le premier contact avec les micro-organismes.

Le stress chimique provoque une libération de radicaux libres dans l'organisme (**Aurousseau, 2002**), une altération des composants cellulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement. Tous les composants cellulaires peuvent être touchés: lipides, protéines et donc les membranes dans l'ensemble (**Radi et al., 1991**); (**Halliwell et Chirico, 1993**), glucides et ADN (**Wolff et dean, 1987**; **Halliwell et chirico, 1993**; **Jaeschke, 1995** ; **Meneghini,1997**).

Comme le suggèrent **Elmafda (1987)**, **Witt et al. (1992)**; **Huang et Fwu (1993)** et **schelling et al. (1995)** qui stipulent que les effets typiques d'une attaque radicalaire se manifestent à l'échelle cellulaire par une peroxydation des protéines et induisent des perturbations prononcées du fonctionnement cellulaire (**Halliwell et Gutteridge, 1984**); (**Radi et al., 1991**) ce qui confirme nos résultats.

Il est évident que le taux des protéines totales à lui seul ne fournit pas une explication suffisante sur les mécanismes de désintoxication / biotransformation mis en branle par les paramécies en présence du xénobiotique, c'est alors qu'on a étudié l'effet du Chlorpyriphos-éthyl sur le taux du GSH et de l'activité Catalase.

Les bio marqueurs sont des variations biochimiques et physiologiques, mesurées chez des êtres vivants exposés à des conditions de stress liés à la présence de substances chimiques dans le milieu (**Huggett et al., 2004**).

Parmi ces bio marqueurs, on peut citer le système glutathion qui est assuré par le glutathion lui-même (GSH) en présence de plusieurs enzymes qui constituent les éléments essentiels de ce système dont la plus importante est la glutathion S-transférase (GST) qui intervient dans les réactions de conjugaison des électrophiles (**Kammenga et al., 2000**).

Le glutathion est le thiol cellulaire le plus abondant impliqué dans le métabolisme, dans les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes y compris les ROS (**Dickinson et Forman, 2002**).

En interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD, outre son rôle essentiel d'agent réducteur, il intervient également à un second niveau dans la défense anti-radicalaire par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion -S- transférase (**Barillet, 2007**).

Le GSH joue un rôle central dans le processus de défense intracellulaire (**Arrigo, 1999**), il neutralise le peroxyde organique, élimine les hydrocarbures par conjugaison au groupement thiol, et se lie aux ions des métaux lourds (**Adam et al., 2005**). Le glutathion existe sous deux formes, oxydée GSSG et réduite GSH, et ces enzymes comprennent la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion S-transférase (GST) qui sont impliqués dans la détoxification (**Kizek et al., 2004**). Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif (**Droge, 2002**).

Dans notre étude, les faibles teneurs en GSH enregistrées en présence du xénobiotique, impliquent le déclenchement du système de détoxification. D'un autre côté, et selon **Sevanian et al. (1991)** ; **Yu (1994)** ; **Chan et Decker et al. (1994)** et **Ha et al. (1998)** la capture directe des radicaux oxygénés libres, causée par ces xénobiotiques est assurée par des composés piègeurs de radicaux ou par des systèmes enzymatiques situés au voisinage du lieu de production initial. Ces radicaux peuvent être piégés par le glutathion, certains dipeptides, les protéines riches en groupes thiols (-SH), les acides aminés, les acides gras insaturés non estérifiés et les phospholipides.

Nos résultats abondent dans le même sens que ceux **Salama et al. (2005)** avec une espèce de gastéropode *Helixaspersa.*, après traitement au Méthomyl et au Chlorpyrifos, il en est de même pour les travaux de (**Grara et al., 2012**; **Saib et al., 2014**) qui ont mis en évidence un épuisement significatif du contenu en GSH des paramécies par des

polyméthacrylate de méthyle (une résine dentaire) et à l'amidophosphonate (un insecticide organophosphoré) respectivement.

Les catalases (CAT) sont des enzymes péroxysomales dont le rôle est de prévenir les peroxydations des molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. Elles sont sensibles à certains contaminants inducteurs de stress oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, comme les HAP, les PCB, certains pesticides (**Livingstone et al., 1993**) et les métaux (**Labrot et al., 1996**), mais ceci de façon irrégulière in vivo, les résultats montrant tantôt une augmentation de cette activité (**Di Giulio et al., 1993**), tantôt une baisse (**Labrot et al., 1996**).

Dans notre travail nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité catalase chez les *Paramecium* sp. traitées par le chlorpyrifos-ethyl.

Des résultats similaires ont été observés par **Salama et al. (2005)**, chez une espèce de gastéropode après exposition au Méthomyl et au Chlorpyrifos ainsi que ceux de **Bouaricha (2013) et de Sbartai (2013)**, qui ont enregistré une intensification de l'activité de la CAT dans les cellules de *Paramecium* traitées au Bifénazate et au Proclamer.

### Conclusion

Les pesticides sont des produits chimiques de nature organique ou métallique qui sont actuellement présents sous forme de résidus dans tous les compartiments de l'environnement. Bien que des solutions alternatives à leur utilisation intensive soient en développement (cultures biologiques, « vaccination » des plantes grâce à l'application de stimulateurs de défenses naturelles...), elles ne remplaceront probablement pas, ni dans l'immédiat ni totalement, les applications de pesticides. Le problème de la contamination se pose donc encore pour de nombreuses années. Le nombre de molécules disponibles sur le marché étant considérable, toutes ne font pas l'objet d'une évaluation approfondie. Aussi, de nombreuses données manquent sur les quantités résiduelles réellement présentes dans les différents milieux, sur leur comportement et leur devenir dans ces compartiments et sur leur devenir et leur toxicité pour les organismes.

Le protiste cilié utilisé dans notre travail occupe une position privilégiée dans les écosystèmes aquatiques, notamment par ce qu'il constitue à la fois l'un des éléments de base des réseaux trophiques et un modèle alternatif de choix pour l'étude de l'impact de la pollution sur notre environnement.

Cette étude montre l'intérêt de *Paramecium sp.* comme modèle cellulaire pour l'évaluation de la toxicité du Chlorpyrifos-éthyl. Le xénobiotique testé est cytotoxique. Cette toxicité se manifeste par une inhibition de la croissance cellulaire. Au niveau intracellulaire, nous avons mis en évidence une perturbation du taux de protéines totales, du glutathion et de l'activité catalase.

Au terme de cette étude, il convient de préciser que des relations doses-réponses ont été obtenues. Pour l'ensemble des paramètres, les réponses sont fonction de la dose et de la durée d'exposition. Les résultats les plus significatifs sont obtenus avec la dose la plus élevée. Toutes les observations convergent vers une induction d'un stress oxydatif

## **Perspectives**

En perspectives, il serait intéressant :

- D'élargir les tests de cyto-toxicité sur d'autres type de cellules.
- De faire des tests de génotoxicité sur ces protistes.
- De rechercher l'impact de cet insecticide sur la neurotoxicité de ces organismes.
- D'entreprendre des études de la molécule sur la capacité de reproduction d'autres modèles d'animaux.

# Liste des références

**Références bibliographiques**

**ACTA (Association de Coordination Technique Agricole). 2004.** Index phytosanitaire, 40ème édition. p: 804.

**Adam V., Petrlovà J., Potesil D., Lubal P., Zehnàlek J., Sures B. and Kizek R. 2005.** New electrochemical biosensor to determine platinum cytostatic to DNA structure. Chemistry Listy. 99: 353-393.

**Adl S. M., Alastair G. B., Simpson, Mark A., Farmer, Robert A., Andersen O., Roger Anderson, John R., Barta, Samuel S., Bowser, Guy Brugerolle, Robert A., Fensome, Suzanne Fredericq, Timothy Y., James, Sergei Karpov, Paul Kugrens, John Krug, Christopher E., Lane, Louise A., Lewis, Jean Lodge, Denis H., Lynn, David G., Mann, Richard M., Mccourt, Leonel Mendoza, Øjvind Moestrup, Sharon E., Mozley-Standridge, Thomas A., Nerad, Carol A., Shearer, Alexey V., Smirnov, Frederick W., Spiegel, and Max F. J. R.; Taylor. 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. Journal of Eukaryotic Microbiology. 52: 399-451.

**Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J. 1986.** Biologie moléculaire de la cellule. Edition Flammarion. pp: 256- 286.

**Ampéwi N. 2005.** Vers un sens de la vie. Merlin: Québec, Canada. pp: 29.

**Arrigo A.P. 1999.** Gene expression and the thiol redox state. Free Radical Biology & Medicine. 27: 936-944.

**Arousseau B. 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux: Conséquence sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Prod. Anim. 15(1): 67-82.

**Azzouz Z., Berrebbah H. et 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.

**Baldi I., Cordier S., Coumoul X., Elbaz A., Gamet-Payrastre L., Lebailly P., Multigner L., Rahmani R., Spinosi J. and Maele-Fabry G.V. 2013.** Pesticides - Effets sur la santé. Paris : Institut national de la santé et de la recherche médical (Inserm). pp: 1-146.

**Barata C., Solayan A. and Porte C. 2004.** Role of  $\beta$ -esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 66: 125-139.

**Barillet S. 2007.** Toxicocinetique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*) . Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, France, pp: 476.

**Barouki R. and Morel Y. 2001.** Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61: 511-516.

**Beaumont et Cassier. 1998.** Travaux Pratiques de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie. 3ème édition DUNOD. pp: 123-143.

**Beek B. 1999.** Bioaccumulation New Aspects and Developments. Springer. pp:284.

**Benbouzid H. 2007.** Stress chimique et comportement microbien: Cas de *Paramecium* sp. Mémoire de Magister Université Badji Mokhtar Annaba. pp: 71.

**Benbouzid H. 2010.** Evaluation et étude de la toxicité d'une famille d'acaricides sur des protistes ciliés . Thèse de doctorat . Université Badji Mokhtar . Annaba . Algérie. pp: 114.

**Bennett J. and Cabbage J. 1992.** Evaluation of Bioassay Organisms for Freshwater Sediment Toxicity Testing. Washington Dept. of Ecology. Olympia. WA. pp: 29.

**Benosmane S . 2015 .** Impact d'un mimétique œstrogène (MOS) sur un organisme bio indicateur de pollution : *R. saharica* . thèse de doctorat . Université Badji Mokhtar Annaba. pp: 108.

**Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the Principe of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 278-254.

**Bouaricha H., Gheraibia H., Omri N., Djebar H. et Djebar M.R. 2011.** Etude de l'effet d'un insecticide à base d'Emamectine Benzoate sur des protistes ciliés d'eau douce *Paramecium sp.*: 4.

**Bouaricha H., Berrebbah H., Grara N. and Djebar M.R. 2012.** Response of *Paramecium sp.* with respect to an insecticide (Proclaim): growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. *Journal of Applied Sciences Research.* 8(8): 4172-4180.

**Bouaricha H. 2013.** Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helixaspersaet Parameciumsp.*)Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba, Algerie. pp: 148.

**Boucenna M. 2010.** Evaluation de la toxicité des poussières métalliques rejetées par les acières 1 et 2 du complexe sidérurgique sur un modèle bioaccumulateur*Helixaspersa*.Thèse de doctorat. UniversitéBadjiMokhtar Annaba. pp: 156.

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

**Buchwalter D.B., Sandahl J.F., Jenkins J.J. and Curtis L.R. 2004.** Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in fourth instar Chironomousriparius (Meigen). *AquaticToxicology.* 66: 149-157 .

**Burgeot T. 1998.** Bioindicateurs et biomarqueurs: des outils pour la surveillance du milieu aquatique. Edit. Chimie et Ecologie. pp: 51.

**Calvet R. 1983.** Absorption of organicchemicals in soils. *Environnemental Health Perspectives.* 85: 145-177.

**Calvet R. 2005.** Les pesticides dans le sol: Conséquences agronomiques et environnementales. France. Agricole Editions. pp:637.

**Chan K.M. and Decker E.A. 1994.**Endogenous skeletal muscle antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 34: 403-426.

**Chapman P.M. 2001.**Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. Hydrobiologia. 463:149–169.

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

**Čolović M.B., Krstić D.Z., Ušćumlić G.S. and Vasić V.M. 2011.** Single and simultaneous exposure of acetylcholinesterase to diazinon, chlorpyrifos and their photodegradation products. Pesticide Biochemistry and Physiology. 10: 16-22

**Cook J.L., Bauman P., Jackman J.A. and Stevenson D. 1995.** Pesticide Characteristics that affect water quality. Farm Chemical Handbook, 95. Meister Publishing Co. Willoughby OH. pp:429.

**Coupe R.H. and Blomquist J.D. 2004.** Water-soluble pesticides in finished water of community water supplies. J. AWWA. 96: 56-58.

**CudmoreLarison D. & C. and Newton A. 1977.** The Center of Life, A Natural History of the Cell.

**Dannenberg A. and Pehkonen S.O. 1998.** Investigation of the heterogeneously catalyzed hydrolysis of organophosphorus pesticides. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46: 325-334.

**Delattre J., Beaudeau J.L. and Bonnefont-Rousselot D. 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. Editions Tec & Doc. pp: 549.

**Desaint S., Luriau S., Aude J.C., Rousselet G. and Toledano M.B. 2004.** Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. J. Biol. Chem. 279: 31157-63.

**Dickinson D.A. and Forman H.J. 2002.** Cellular glutathione and thiols metabolism Biochemical pharmacology. 64: 1019-26.

**Di Giulio R.T., Habig C. and Gallagher E.P. 1993.** Effects of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. Aquatic Toxicology. 26: 1-22.

**Doran W.J., Cope W.G., Rada R.G. and Sandheinrich M.B. 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in the threeridge mussel (*Amblemaplicata*) by chlorpyrifos : implications for biomonitoring. Ecotoxicological and Environmental Safety. 49: 91-98.

**Droge W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews. 82: 47-95.

**Dubey R.C. and Dwividi R.C. 1988 .**Effect of heavy metals on growth and survival of *Macrophominaphaseolina* (Tassi) Goid, Biology and fertility of soils. 6:311-314.

**Einicker-Lamas M., AntunesMezian G., BenevidesFernandes T., Silva F.L.S and Guerra F. 2002.** *Euglena gracilis* as a model study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> toxicity and accumulation in eukaryotic cells. Environmental Pollution. Vol: 120. pp:779-786.

**Elmafda I. 1977.** Vitamin E (tocopherol). ErnährungsUmschau. 3: 67- 71.

**EPA. (USA Environmental Protection Agency) 2000.** Registration eligibility science chapter for Chlorpyrifos : fate and environmentalassessmentchapter. pp: 94.

**Fabre R. et Truhaut R. 1954.** Toxicologie des Produits Phytopharmaceutiques. Société d'Édition d'Enseignement Supérieur - SEDES: Paris. pp: 272.

**Falkenmark M., Lundqvist J. and Widstrand C. 1991** .Water scarcity: an ultimate constraint in third world development. Tema V, Report n°14, Dep. Water and Environmental studies, Linköping, Suède, University of Linköping.

**Faurie C., Ferra A., Medori P. and Devaux J. 1999** . Ecologie : Approche scientifique et pratique. 4<sup>ème</sup>Ed., Lavoisier TEC & DOC. pp: 298-300.

**Fenske C. and Gunther B. 2001**. Electro-fishing in the lab. A new method to detect acute effects of heavy metals and organic pollutants in invertebrate indicator organisms. Int. J. Hyg. Environ. Health. 204: 157- 163.

**Fukushima S., Shiota C., Ogawa H. and Sasagawa S. 1979**. Effects of heavy metals in Paramecium tetraurelia: Effects on cell division. Jap .J. Hyg . 34(5): 507-510.

**Garcia F.P., Cortés Ascencio S.Y., GaytanOyarzun J.C., Hernandez A.C. and Alavarado P.V. 2012**. Alejandra.Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. Journal of Research in Environmental Science and Toxicology. 1 (11): 279-293.

**Gaujous D. 1995**. La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. 2<sup>ème</sup> édition. Edition TEC et DOC . 59 : 125-140 .

**Génoscope. 2007** . Centre National de Séquençage. France.

**Giesy J.P. and Hoke R.A. 1989**. Freshwater Sediment Toxicity Bio assessment: Rationale for Species Selection. J. Great Lakes Res. 15: 539-569.

**Gouzy A., Farret R. et Le Gall A.C. 2005**. Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien: approche par hiérarchisation, Rapport INERIS n° DRC – 05 – 45936 – 95 – AGo.

**Grara N., Boucenna M., Atilia A., Berrebbah H. et Djebbar M.R. 2012**. Stress oxydatif des poussières métalliques du complexe sidérurgique d'Annaba (Nord-Est algérien) chez l'escargot *Helixaspersa*. Environnement, Risques & Santé. 11(3): 221-229.

**Ha H., Sirisoma N.S., Kuppusamy P., Zweier J.L., Woster P.M. and Casero R. A. Jr. 1998.** The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95: 11140-11145.

**Hageman K.J., Simonich S.L., Campbell D.H., Wilson G.R. and Landers D.H. 2006.** Atmospheric deposition of current-use and historic-use pesticides in snow at national parks in the Western United States. Environmental Science and Technology. 40: 3174-3180.

**Halliwell B. and Gutteridge M.C. 1984.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219: 1-14.

**Halliwell B. and Chirico S. 1993.** Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am. J. Clin. Nutr 57(suppl). pp: 715.

**Huang C.J. and Fwu M.L. 1993.** Degree of protein deficiency affects the extent of the depression of the antioxidative enzyme activities and the enhancement of tissue lipid peroxidation in rats. J. Nutr. 123: 803-810.

**Huggett R.J., Kimerie P.M., Mehrle JR. and Bergman H.L. & EDS. 2004.** Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Fla, Lewis Publishers. pp: 347.

**IFEN. (L'environnement en France) 1999-2000.** Dunod, Paris.

**Jaeschke H. 1995.** Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc, Soc, Exp, Biol. Med. pp: 209.

**Jamet P. 1988 .** Le comportement des Produits Agropharmaceutiques dans le Sol , Phytatrie Phytopharmacie. 28: 87-122.

**Kammenga J.E., Dallinger R., Donker M.H., Kohler H.R., Simonsen V., Triebkorn R. and Weeks J.M. 2000.** Biomarkers in terrestrial for ecotoxicological soil risk assesement. In

Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 164, G. W. Ware Edition. 175 Fifth Ave/ New York/ NY 10010, Springer-Verlag. pp: 93-147.

**Khopkar S.M. 2007.** Environmental pollution monitoring and control. Edit. New Age International. p: 494.

**Kizek R., Vacek J., Trnková L., Jelen F. 2004.** Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. Bioelectrochemistry. 63: 19-24.

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

**Kralj M.B., Franko M. and Trebše P. 2007.** Photodegradation of organophosphorus insecticides. Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AchE-thermal lens spectrometry bioassay. Chemosphere. 67: 99-107.

**Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., Narbonne J.F. 1996.** In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non mammalian species. Biomarkers. 1: 21-28 .

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

**Lukaszewicz- Hussain A. 2010.** Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. Short review. Pesticide Biochemistry and Physiology. 98: 145-150.

**Lissalde S. 2010.** Application et validation des échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'échantillonnage passifs des pesticide dans les eaux des bassin versant charentais . Thèse de Doctorat .Université de Poitiers.

**Livingstone D.R., Lemaire P., Matthews A., Peters L.D., Bucke D. and Law R.J. 1993.** Pro oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in

liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals. Marine Pollution Bulletin. 26: 602-606.

**Mackay D., Shiu W. Y. and Mak C. 1999.** Physical-chemical Properties and Environmental Fate Handbook. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.

**Massaya M., Yoshinobu H., Ai Y., Maki K. and Yasuo O. 2002.** Determination of cellular levels of nonprotein thiols in phytoplankton and their correlations with susceptibility to mercury. Journal of Phycology. 38 (5): 983.

**McPherson CA. and Chapman PM. 2000.** Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. Mar Pollut Bull. 40: 656-665.

**Meneghini R. 1997.** Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. Free Radic. Biol. Med:23. pp: 783.

**Morel Y. and Barouki R. 1998.** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. Med. Sci. 14: 713-21.

**Morel Y. and Barouki R. 1999.** Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem. J. 342: 481-96.

**Neuzil J., Gebicki J.M. and Stocker R. 1993.** Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibitions by chain breaking antioxidants. Biochem. J. 293: 601-606.

**Ngoufack C. 2010.** Le productivisme et le droit international de l'environnement . Mémoire Master . Université de Limoges. France .

**Noworyta- Glowacka J., Bańkowski R., Siennicka J., Wiadrowska B., Beresinska M. and Ludwicki J.K. 2012.** Influence of Chlorpyrifos on the profile of subpopulations of immunoactive cells and their phagocytic activity in an experimental in vivo model. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 19 (3) : 483-485.

**Nriagu J.O. 1989.** A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*. 338: 47-49.

**OECD. 2012.** Organisation for Economic Co-operation and Development . Consensus document on the biology of the brassica crops ( Brassica spp ). Series in Harmonisation of Regulatory oversight of Biotechnology , No 54, OECD, Paris. pp: 142 .

**Patterson D. J. 1999.** The diversity of eukaryotes. *American Naturalist*. 154: 96-S124.

**Peck A.M. and Hornbuckle K.C. 2005.** Gas-phase concentrations of current-use pesticides in Iowa. *Environmental Science and Technology*. 39: 2952-2959.

**Pehkonen S.O. and Zhang Q. 2002.** The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters : a critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol*. 32 : 17-72.

**Periquet A., Boisset M., Casse F., Catteau M., Lecer J.M., Leguille C., Laville J. et Barnat S. 2004.** Pesticides, risques et sécurité alimentaire. France : Comité Sécurité Alimentaire d'Aprifel. 1-216.

**Piccini E., Staudenmann W., Albergoni V., Gabrieli R.D. and Jamet P. 1994.** Purification and primary structure of metallothionins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyriformis*. *European Journal of Biochemistry*. 226: 853-859.

**Postel S. 2001.** Growing more food with less water. In *Scientific Amer.*, 224, n°2. p:34-37.

**Purves W.K., Orians G.H., Heller H.G. et Sadava D. 2000.** Le monde du vivant, 2ème édition Flammarion, pp: 552-577.

**Radi F., Beckman J.S., Bush K.M. and Freeman B.A. 1991.** Peroxynitrite oxidation of sulhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem*. 266 :4244-4250.

**Ramade F. 1995 .** Eléments d'écologie, écologie appliquée. 5ème édition. Edi science International. pp:183-231.

**Ramade F. 2005.** Eléments d'écologie, écologie appliquée. 6ème édition. Dunod Paris. pp: 60-376.

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

**Regnault-Roger C., Fabres G. et Philogène B.J.R., 2005.** Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Edition TEC & DOC. pp : 20-53.

**Regoli, F. and Principato, G. 1995.** Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 31 : 143-164.

**Rodier J., Bazin C., Frankreich H., 1996.** Analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer., 8 édition. Edition Dunod : 723-729-1321-1324.

**Rouabhi R., Djebbar H. and Djebbar M.R. 2006.** Toxicity evaluation of flucycloxyuron and diflubenuron on the cellular model, *Paramecium sp.* *African Journal of Biotechnology*. 5(1): 045-048.

**Rouabhi R. 2007.** Impact de deux pesticides le Diflubenuron et le Flucycloxyuron sur trois modèles cellulaires alternatifs : *Paramecium sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Tetraselmis suecica* et sur le développement embryonnaire de la poule domestique (*Gallus domesticus*). pp : 4-70.

**Saib A., Berrebbah H., Berredjem M. and Djebbar M.R., 2014.** Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia* . *Toxicol. Res.* 3: 395-399.

**Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A. and Soliman S.A. 2005.** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 8: 92-96.

**Samworth M. and Morgan M. 2000** . Article on pond life: Pramecium. MISCAP Article : Paramecium, Updated by the MISCAP Editor.

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

**Sevanian A., Muakkassah-Kelly S.F. and Montestruque S. 1991.** The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. Arch. Biochim. Biophys. 223 : 441-452.

**Sbartai I., Berrebbah H., Rouabhi R., Sbartai H., Guy S. and Djebbar MR., 2009.** Behaviour of Paramecium sp., Treated with Bifenazote with Special emphasis on Respiratory Metabolism, Protein and Generation Time, AEJTS. 1 (1):13-18.

**Sbartai I., Berrebbah H., Sbartai H., Djebbar M.R., 2012.**Evaluation of the toxicity of hydrazine (Bifenazate) and oxadiazine ( indoxacarb) observed in a unicellular eukaryotes:Paramecium sp. Advanced in Environmental Biology.6 (8):2249-2258 .

**Sbartai, I., 2013.** Toxicity of a hydrazine carboxylate (Bifenazte) and an oxadiazine (Indoxacarb) observed in a cellular freshwater model: *Paramecium sp.* Ph.D. Dissertation, BadjiMokhtar University, Annaba, Algeria.

**Taylor E.J., Maund S.J. and Pascoe D. 1991.** Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates Chironomus riparius Meigen (Insecta: Diptera) and Gammarus pulex (L.) (Crustacea: Amphipoda). Arch. Environ. Contam. Toxicol.21: 371–76.

**Testud F. and. Grillet J. P. 2007.**Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes de synthèse et divers. Paris : Toxicologie - Pathologie professionnelle. pp : 1-24.

**Theriot C.M. and Grunden A.M. 2011.** Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. Applied Microbiology of Biotechnology. 89 : 35-43.

**UjwalaGarad., Shanti DesaiN. And. PrakashDesai. V. 2007.** Toxic effects of monocrotophos on *Paramecium caudatum*. African Journal of Biotechnology Vol. 6 :(19), pp:2245-2250.

**Weeckbeker G. and. Cory G. 1988.** Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukaemia 1210 cells in vitro. Cacer letters.40: 257-264.

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

**Witt E.H., Reznick A.Z., Viguie C. A., Starke Reed P. and Packer L. 1992.** Exercise oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. J. Nutr. 122: 766- 773.

**Wong C.K., Cheung Ming-HoYo. 1999.** Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunalliella tertiolecta*. Environmental pollution. 105: 175183.

**Yao Y., Harner T., Blanchard P., Tuduri L., Waite D., Poissant L., Murphy C., Belzer W., Aulagnier F. and Sverko E. 2008.** Pesticides in the atmosphere across canadian agricultural regions. Environmental Science and Technology. 42: 5931-5937 .

**Yu B.P. 1994.** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev., pp : 74-139.

**Zhou Q., Sun X., Gao R., Zhang Q. and Wang W. 2010.** Mechanism study on OH-initiated atmospheric degradation of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 952: 8-15.

### Site web

[1] : <http://www.vedura.fr/economie/agriculture/agriculture-intensive>. (Consulté le **1 juin 2019** ).

2] :IFEN., 2002. Les pesticides dans les eaux : bilan annuel 2002. Etudes et travaux IFEN. no 36, 25 p. (<http://www.ifen.fr/publications/ET/pdf/et36.pdf>). (Consulté le **1 juin 2019**).