

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



520 206

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Microbiologie - Ecologie
Spécialité : Santé, Eau et Environnement

17/05

Thème

**Evaluation in vitro de l'effet du pesticide (cas
d'un insecticide : Téfluthrine) sur la cinétique
de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Présenté par : ASSANE SALEY A. Razak

DIALLO Modibo

HAMIDOU SEYBOU Assiatou



Devant le jury composé de :

Président : Mr. HOUHAMDI Moussa (Pr)

Examineur : Mr. MERZOUG Abd El Ghani (M.A)

Encadreur : Mr. DJEKOUN Mohamed (M.A)

Juin 2011

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements vont en premier lieu à Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour concrétiser notre travail.

Nous voudrions adresser nos sincères remerciements et notre gratitude la plus profonde à tous ceux qui nous ont aidés à l'accomplissement de ce Travail. Parmi eux Nous remercions chaleureusement monsieur Djekoun Mohamed. Notre encadreur de nous avoir reçue au sein de son équipe, de la confiance qu'il nous a accordée, et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail; merci d'avoir cru en nous et en notre travail.

Nous sommes très reconnaissants à Messieurs les membres du jury, Mr Houhamdi Moussa président du jury et Mr Merzoug Abd Elghani examinateur. pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nos remerciements vont à l'endroit de Mme Djorji Houria gérante du laboratoire de Microbiologie pour son soutien, son effort, sa volonté lors de la réalisation de la partie pratique de ce mémoire.

Nous ne terminerons ces remerciements sans oublier nos collègues Berkani Asma et Bouzeghouf Karima.

Notre souhait est que ce mémoire puisse apporter un meilleur stimulant à tous les biologistes (étudiants, chercheurs, ingénieurs, techniciens...) afin de mener à bien leurs travaux de recherche.

Enfin un grand remerciement à tous les enseignants du département de biologie de l'université de Guelma.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE I : *Saccharomyces cerevisiae*

1. Généralités sur les levures.....	1
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
2.1 Intérêt biologique.....	3
2.2 Morphologie et anatomie.....	4
2.3 Systématique.....	5
2.4 Cycle de vie.....	5
2.4.1 Croissance.....	5
2.4.2 Reproduction.....	6
2.4.2.1 Reproduction asexuée.....	6
2.4.2.2 Reproduction sexuée.....	7
2.5 Physiologie des levures.....	8
2.5.1 Besoins nutritifs.....	8
2.5.2 Conditions physico-chimiques.....	10
2.6 Métabolisme.....	11
2.6.1 Métabolisme oxydatif.....	11
2.6.2 Métabolisme fermentaire.....	11
2.6.3 Effet glucose.....	12
2.6.4 Effet pasteur.....	12

2.6.5 Effet Crabtree.....	12
3. Biomarqueur.....	13
4. Biomicateur.....	13

CHAPITRE II : TEFLUTHRINE

1. Généralité sur les pesticides.....	15
1.1 Historique.....	15
1.2 Définition.....	15
1.3 Composition.....	15
1.4 Classification.....	15
1.5 Impact des pesticides dans l'environnement.....	18
1.5.1 Sol.....	18
1.5.2 Air.....	18
1.5.3 Eau.....	19
1.5.4 Effet sur la biodiversité.....	19
1.5.5 Effet sur la santé.....	20
1.6 Relation entre levure et pesticide.....	20
1.7 Bioaccumulation et dégradation des pesticides.....	21
2. Téfluthrine.....	22
2.1 Description.....	23
2.2 Propriétés physico-chimiques.....	24
2.3 Source d'exposition.....	24
2.3.1 Expositions professionnelles.....	25
2.3.2 Exposition extra-professionnelles.....	25

2.4 Mode d'utilisation.....	25
2.5 Mode d'action.....	25
2.6 Devenir et comportement dans l'environnement.....	26
2.7 Evaluation des risques ecotoxicologiques.....	26
2.7.1 Toxicité aiguë.....	26
2.7.2 Toxicité chronique.....	27
2.7.3 Toxicité sur les organismes aquatiques.....	27
2.7.4 Toxicité sur les organismes terrestres.....	27
2.8 Limite maximale des résidus dans les aliments.....	28

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.....	29
1.1 Matériel biologique.....	29
1.2 Matériel expérimental.....	29
1.2.1 Appareillage.....	29
1.2.2 Verrerie.....	29
2. Méthodes.....	30
2.1 Culture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.2 Les tests.....	30
2.2.1 Principe.....	30
2.2.2 Mode opératoire.....	31
2.2.2.1 Effet de la téfluthrine sur la cinétique de croissance.....	31
2.2.2.2 Mesure de la catalase.....	33
2.2.2.3 Dosage des protéines.....	36

3. Etude statistique.....	36
---------------------------	----

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Biomasse.....	37
1.1 Dénombrement sur milieu solide.....	37
1.2 Dénombrement sur milieu liquide.....	38
1.3 Dosage des protéines	39
1.4 Activité enzymatique (Catalase).....	40
2. Discussion.....	41

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PERSPECTIVES

RESUME

Produced with ScanTOPDF

LISTE DES ABREVIATIONS

μg	Microgramme
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CO_2	Gaz carbonique
CL_{50}	Concentration létale à 50 %
CE_{50}	Concentration efficace à 50 %
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Glucose
DO	Densité optique
DL_{50}	Dose létale � 50 %
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
IC_{50}	Concentration inhibitrice à 50%
K_{oe}	Coefficient de partage <i>n</i> -octanol-eau
K_{co}	Coefficient de partage du carbone organique
Kg	kilogramme
LMR	Limite maximale de r�sidual
mPa	milliPascal
mg	milligramme
OMS	Organisation mondiale de la santé
Pa	Pascal
pH	$-\log_{10}$ de la concentration d'ions hydrogène
ppm	partie par million
TD_{50}	temps de dissipation à 50 %

TD_{90}	temps de dissipation à 90 %
UFC	Unités formant des colonies
UV	Ultraviolet
λ	longueur d'onde

Produced with ScanTOPDF

LISTE DES FIGURES

Figures	Titres	Pages
Fig. 1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Fig. 2.	<i>Cellule de levure (Saccharomyces cerevisiae)</i>	4
Fig. 3.	<i>Paroi de S. cerevisiae</i>	5
Fig. 4.	<i>Bourgeonnement</i>	7
Fig. 5.	<i>Différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de formes au cours du bourgeonnement</i>	7
Fig. 6.	<i>Cycle de vie chez S. cerevisiae</i>	8
Fig. 7.	<i>Contamination de l'environnement par les pesticides</i>	19
Fig. 8.	<i>Cadavres de buses et de renards</i>	20
Fig. 9.	<i>Formule développée</i>	23
Fig. 10.	<i>Protection de la racine des plantes par la Téthluthrine</i>	25
Fig. 11.	<i>Cellule de Mallaséz</i>	31
Fig. 12.	<i>Colonies à l'état frais</i>	31
Fig. 13.	<i>Numération sur cellule de Mallaséz</i>	32
Fig. 14.	<i>Gélose Sabouraud</i>	33
Fig. 15.	<i>Colonies de levures obtenues après 24h d'incubation</i>	33
Fig. 16.	<i>Molécule de catalase</i>	34
Fig. 17.	<i>Homogénéiseur ultra-son et Centrifugeuse réfrigérée</i>	35
Fig. 18.	<i>Spectrophotomètre à UV</i>	35
Fig. 19.	<i>Concentration inhibitrice 50%</i>	37
Fig. 20.	<i>Variation de la biomasse en fonction des différentes concentrations de téthluthrine</i>	38
Fig. 21.	<i>Variation du taux de protéine en fonction des différentes concentrations de téthluthrine</i>	39
Fig. 22.	<i>Variation de l'activité enzymatique (catalase) en fonction des différentes concentrations de téthluthrine</i>	40

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tab. 01.	<i>Différents types de pesticides et leurs cibles</i>	17
Tab. 02.	<i>Description de la téthluthrine</i>	23
Tab. 03.	<i>Propriétés physico-chimiques de la téthluthrine</i>	24
Tab. 04.	<i>Toxicité aiguë de la téthluthrine</i>	27
Tab. 05.	<i>Toxicité sur les organismes aquatiques de la téthluthrine</i>	27

Dès que l'homme a cultivé le sol, il s'est heurté aux problèmes de protection des récoltes, c'est ainsi qu'Homère décrit l'emploi du soufre comme désinfectant et Pline l'Ancien écrit sur l'utilisation d'arsenic comme insecticide. Le pyrèthre (goudron végétal) est l'un des premiers insecticides organiques utilisés au cours de la deuxième moitié du XVIII^e siècle. C'est à cette époque que débute l'utilisation d'insecticides minéraux à base de cuivre et d'arsenic. À partir de 1930, les produits phytosanitaires de synthèse se développent de manière exponentielle.

De nos jours, l'intensification de l'agriculture a engendré une utilisation croissante des fertilisants et des produits phytosanitaires due au progrès dans le domaine de la chimie organique de synthèse. Les produits phytosanitaires, de synthèse ou naturels, sont destinés à limiter la prolifération des parasites (mauvaises herbes, insectes, champignons, rongeurs, acariens) dans le but d'améliorer les rendements.

Malgré leurs atouts non négligeables, ces composés ne sont pas anodins : fortement actifs biologiquement, ils sont toxiques et ils représentent un risque potentiel pour la santé humaine, la faune et l'environnement (Gavrilescu, 2005 ; Kordel et al., 1997).

Ce risque est maintenu à un niveau acceptable grâce à l'ensemble des études menées dans le cadre de l'homologation des produits qui préconise l'utilisation et en limite leur usage. Cependant, malgré les réglementations, ces composés restent encore trop souvent mal ou abondamment utilisés et se retrouvent dans le milieu écologique.

Les contrôles très récents indiquent une présence permanente et préoccupante de résidus et multirésidus contaminant les denrées diverses. Par conséquent l'examen de ces résidus et de leurs effets demeure une nécessité.

L'objectif de ce travail n'est pas de faire un inventaire de tous les effets connus de la téfluthrine mais bien d'illustrer à l'aide de quelques manipulations, les mécanismes qui permettent d'expliquer certains effets toxiques, plus significatifs observés chez la levure dite de brasserie ou de boulangerie qui est devenue un objet scientifique remarquable pour l'étude des mécanismes à la base du fonctionnement des cellules eucaryotes.

Au delà de son intérêt industriel ou de la curiosité de naturaliste que l'on peut avoir pour un petit champignon dont la physiologie est, en effet, fascinante, la levure *Saccharomyces cerevisiae* se place au premier rang des modèles biologiques (bioindicateur)

que la distinction entre organismes procaryotes et eucaryotes rapproche de la cellule humaine (Thuriaux ; 2004).

Par sa sensibilité aux polluants notamment les pesticides comme la téfluthrine, *Saccharomyces cerevisiae* peut être utilisé comme un signal d'alarme dans les conditions de perturbation en rendant ainsi le développement d'un bioindicateur important et ouvrant la voie à une surveillance plus large et écologique intégrant les effets sur l'homme et l'environnement grâce à des organismes sentinelles.

Pour répondre à l'objectif du présent travail, le mémoire se compose de quatre principaux chapitres présentés ci-après :

Notre premier chapitre est consacré à l'étude de la biologie de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le deuxième chapitre sera consacré aux généralités sur la téfluthrine dont nous allons synthétiser les informations sur les caractéristiques physicochimiques, toxicologiques et écotoxicologiques.

Dans le troisième chapitre nous aborderons la partie sur le matériel et les méthodes utilisées tout au long de ce travail.

Le quatrième chapitre traite des résultats et leurs discussions.

Chapitre I

*Saccharomyces
cerevisiae*

Produced with ScanTOPDF

1. Généralités sur les levures :

6000 ans avant notre ère les Sumériens et les Babyloniens consommaient déjà la bière. Ils la fabriquaient sans pour autant savoir ce qui est réellement à la base de cette boisson. Ces hommes considéraient ça comme un miracle. Soucieux de percer ce mystère, A. van Leeuwenhoek observa les levures pour la première fois au microscope dans les années 1680, l'année pendant laquelle il les dessina. Au XIX^{ème} siècle à la suite de ces travaux sur les levures, Pasteur contribua à la fondation de la microbiologie (Didier Pol, 1996).

Les levures peuvent être définies comme étant des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou fission (Kreger, Van Rij, 1984). Elles sont ubiquistes dans l'environnement et peuvent donc adapter leur métabolisme à des sources nutritives très variées. Cette flexibilité métabolique est due en majeure partie à une large gamme d'enzymes extra et intracellulaires capables de dégrader des biopolymères complexes tel que l'hydroxylation, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, de stéroïdes et d'alcane.

Leur facilité de culture et l'innocuité d'un grand nombre d'espèces en ont fait les microorganismes les plus utilisés pour la production de boissons alcoolisées et de produits de boulangerie, mais aussi comme source de protéines et de vitamines en alimentation humaine et animale (Leveau et Bouix ; 1993).

Actuellement, elles sont les microorganismes eucaryotes dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée. Ceci tient à leurs activités biochimiques exploitées sur le plan industriel, mais aussi à la simplicité de leur organisation unicellulaire et à leur croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire, qui en font un modèle expérimental particulièrement commode (Bocquet 1993).

2. *Saccharomyces cerevisiae* :

Saccharomyces cerevisiae est un champignon monocellulaire appartenant au phylum des ascomycètes (figure 01). C'est un microorganisme utilisé pour sa fermentation alcoolique ainsi appelé levure de bière (*cerevisiae*), mais aussi et surtout dans le domaine des boulangeries la où elle est appelé « levure de boulanger ». Due à son mode de reproduction, elle est également nommée « levure à bourgeon » ou « levure bourgeonnante ».

Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIX^{ème} siècle soit reconnue comme étant le petit champignon (-*myces*) se nourrissant de sucre (*saccharo-*) responsable de la fermentation. Elle fut logiquement appelée *Saccharomyces cerevisiae* (Thuriaux, 2004).

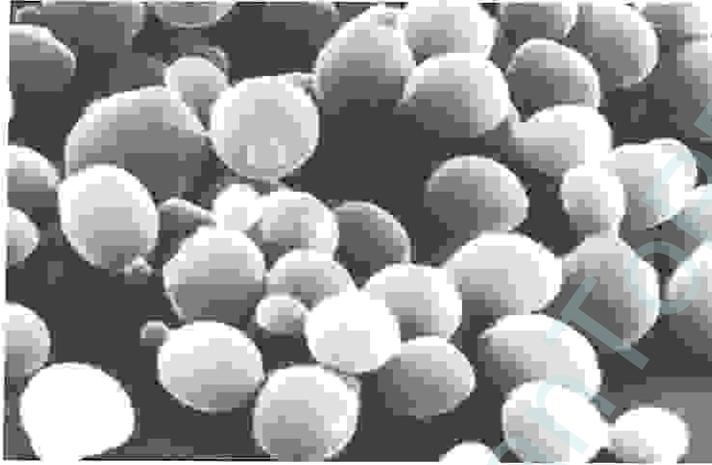


Figure 01 : *Saccharomyces cerevisiae* [1].

2.1. Intérêt biologique :

L'engagement de ces microorganismes dans divers phénomènes naturels a toujours soulevé un intérêt scientifique considérable à leur égard.

Elles sont un outil précieux et indispensable en ingénierie génétique. Manipulations, recombinaisons, caractérisation et expression de gènes d'origine homologue et hétérologue, obtention et sélection de mutants et de souches améliorées, et fusion de protoplastes, ont tous contribué à l'immense développement de la méthodologie génétique et à la mise en place de nouveaux procédés pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique (Magdolen *et al.*, 1990).

En outre, elles sont de plus en plus exploitées comme système modèle en matière de cytotoxicité et génotoxicité de substances chimiques et toxines naturelles (Averbeck *et al.*, 1993). Ceci rejoint la tendance mondiale de limiter l'utilisation des animaux et assurer le développement et la mise au point de tests rapides, efficaces, et peu coûteux.

Elles sont donc proposées comme test complémentaire et même alternatif dans les études de toxicité pour l'évaluation de la toxicité et la recherche des mécanismes d'action de diverses molécules, surtout les fongicides (Doignon *et al.*, 1993 ; Morace *et al.*, 1997).

Le développement spectaculaire des techniques moléculaires chez les levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, fait que cette levure est actuellement l'organisme de

référence en biologie cellulaire et moléculaire des eucaryotes (Lacour *et al.*, 1996). Ainsi, les techniques du génie-génétique ont permis d'utiliser des levures pour la production de protéines animales et humaines, comme la présure, l'hormone de croissance humaine ou le vaccin contre l'hépatite B (Leveau et Bouix, 1993).

2.2. Morphologie et Anatomie :

Les cellules de *S. cerevisiae* sont arrondies, plus ou moins ovalaires (figure 02). Elles ont la forme d'un ellipsoïde de révolution dont le grand axe atteint une longueur d'environ 5µm chez les cellules haploïdes et 7 à 8µm chez les cellules diploïdes. La paroi fait environ 20% du poids sec de la levure. Ce réseau poreux d'environ 200 nm de large (trois fois plus large que la membrane cytoplasmique) laisse passer les petites molécules et détermine la forme et la rigidité des cellules. Elle est composée de polysaccharides (β -1,3 et β -1,6 glucane), de glucomannoprotéines et de mannoprotéines (figure 03).

Ces mannoprotéines résidant dans l'espace périplasmique ont une activité hydrolase (invertase, phosphatase acide, amylase, β -glucosidase), sans que l'on sache toujours bien s'il s'agit de protéines pariétales ayant un domaine périplasmique avec une activité hydrolase (Thuriaux, 2004).

Le noyau, généralement en position centrale à un diamètre d'environ 2 µm chez les cellules haploïdes. Le nombre haploïde de chromosomes est de 16. Le cytoplasme contient des vacuoles en nombre variable qui fusionnent le plus souvent chez les cellules âgées.

On trouve également dans le cytoplasme des inclusions de glycogène et des microvésicules, les peroxysomes contenant notamment la catalase. Lorsque les levures sont en aérobiose, on trouve des mitochondries qui disparaissent en anaérobiose. La plupart des constituants cellulaires peuvent être distingués au microscope sur la base de leur affinité sélective pour tel ou tel colorant.

Malgré leur petite taille, le microscope optique permet d'obtenir diverses informations sur les levures en particulier si l'on utilise des techniques de coloration. L'observation d'organites caractéristiques permet de situer les levures dans la classification (Didier Pol, 1996).

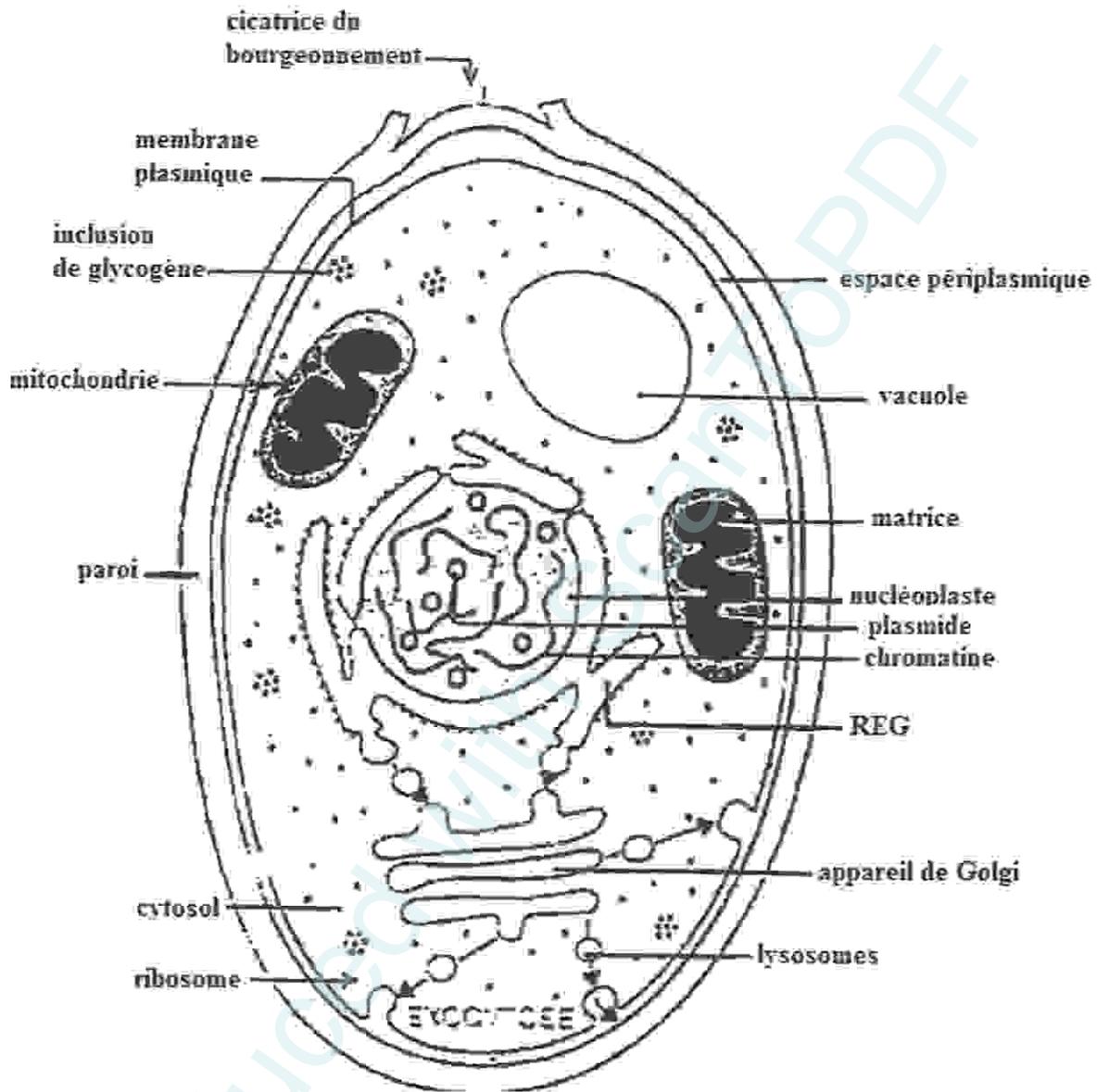


Figure 02 : Cellule de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) [BENALLAOUA et al., 1995].

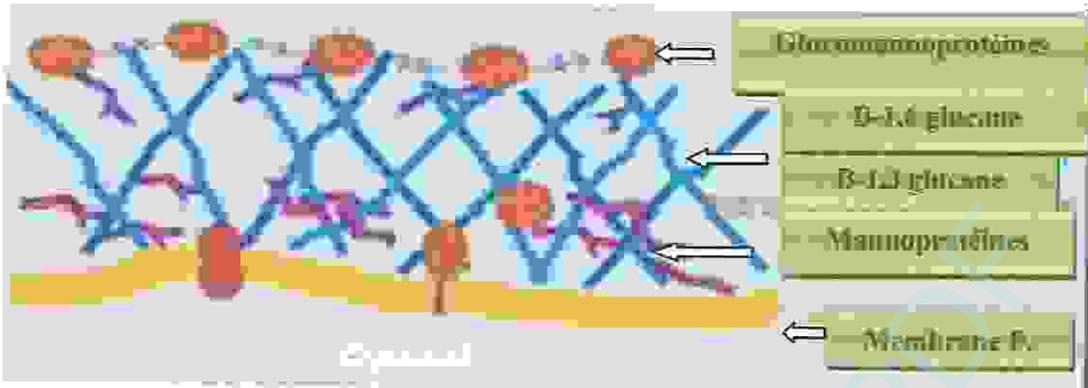


Figure 03 : Paroi de *S. cerevisiae* [2].

2.3. Systématique :

Règne :	<i>Fungi</i>
Division :	<i>Ascomycota</i>
Sous-embranchement :	<i>Saccharomycotina</i>
Classe :	<i>Hemiascomycete</i>
Ordre :	<i>Saccaromycetales</i>
Famille :	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre :	<i>Saccharomyces</i>
Espèce :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.4. Cycle de vie:

Le cycle de vie chez *Saccharomyces cerevisiae* est haplodiplophasique. A la phase haploïde, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a 16 Chromosomes et 32 chromosomes à la phase diploïde.

2.4.1. Croissance

La croissance d'un microorganisme est pratiquement synonyme de multiplication, elle correspond à l'augmentation du nombre d'individus.

Le cycle de croissance consiste en 3 phases principales :

Il commence par une phase de croissance exponentielle au cours de laquelle le temps de génération prend sa valeur minimale et la population croît considérablement, suivie d'une phase quasi stationnaire caractérisée par un taux nul de croissance, enfin une phase de déclin ayant un taux de mortalité élevé dû à l'épuisement du substrat et l'accumulation de métabolites toxiques (Bocquet, 1993 ; Jackson, 1994). Une phase de latence peut précéder ces 3 phases, il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise certaines de ses enzymes (Bouix et Leveau, 1993 ; Jackson, 1994 ; Wright *et al.*, 1995).

Pratiquement, la cinétique de la fermentation s'écarte du schéma théorique, la phase exponentielle de croissance est absente et la conversion du sucre en éthanol est due en sa majorité à une population levurienne en phase stationnaire ou en déclin (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996). En effet, au début de la phase stationnaire, tout au plus la moitié du sucre est métabolisé, le reste est fermenté durant les 2 phases stationnaire et de déclin qui constituent 80% de la durée de la fermentation (Jackson, 1994 ; Sablayrolles *et al.*, 1996). Donc, l'activité levurienne en fermentation alcoolique est la synthèse de 3 types de réactions : croissance, production et maintenance, et les deux premières n'évoluent pas de pair. (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996).

La croissance levurienne peut être l'objet de nombreuses inhibitions, par les substrats, les produits, ou des composés « extérieurs ». Ces derniers peuvent perturber le fonctionnement de divers réactions enzymatiques par des mécanismes d'inhibition compétitive ou non compétitive, ou encore altérer le fonctionnement normal de certaines structures cellulaires comme les membranes ; l'exemple typique est celui des pesticides (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996 ; Cuinier, 1996 ; Šajbidor *et al.*, 1999).

2.4.2. Reproduction

Les levures se multiplient par bourgeonnement (reproduction asexuée) ou par reproduction sexuée (fusion des germes de signes différents).

2.4.2.1. Reproduction asexuée :

La multiplication asexuée s'effectue chez *Saccharomyces cerevisiae* par une forme de division cellulaire atypique : « le bourgeonnement » (Didier Pol, 1996).

- **Bourgeonnement :**

Les cellules de *S. cerevisiae* ont un mode de division cellulaire assez exceptionnel chez les eucaryotes, le bourgeonnement (figure 04), qui crée une différence dans la durée individuelle des cycles. En effet, le bourgeon est plus petit que la cellule mère à l'issue de la division, d'où une période de croissance plus longue avant qu'il ne produise lui-même un nouveau bourgeon, faute de quoi les cellules deviendraient plus petites à chaque division. Pour éviter une telle « catastrophe mitotique », la cellule issue du bourgeon a donc une phase préréplicative (G1) plus longue (70min) que celle de la cellule mère (30min), et ne déclenche la réplication de son ADN (qui coïncide à peu près avec la formation du nouveau bourgeon) que lorsqu'elle a atteint une taille critique appropriée. La phase S (20 min) et les phases G2 et M (50 min) complètent le cycle, de sorte que le bourgeon et sa mère ont, respectivement, un cycle de

division long (140 min) et court (100 min), avec une valeur moyenne de 120 min pour l'ensemble de la population cellulaire (figure 05) (Thuriaux, 2004).

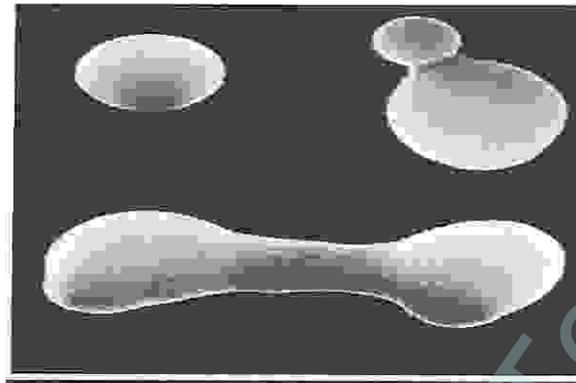


Figure 04: Bourgeonnement [2].

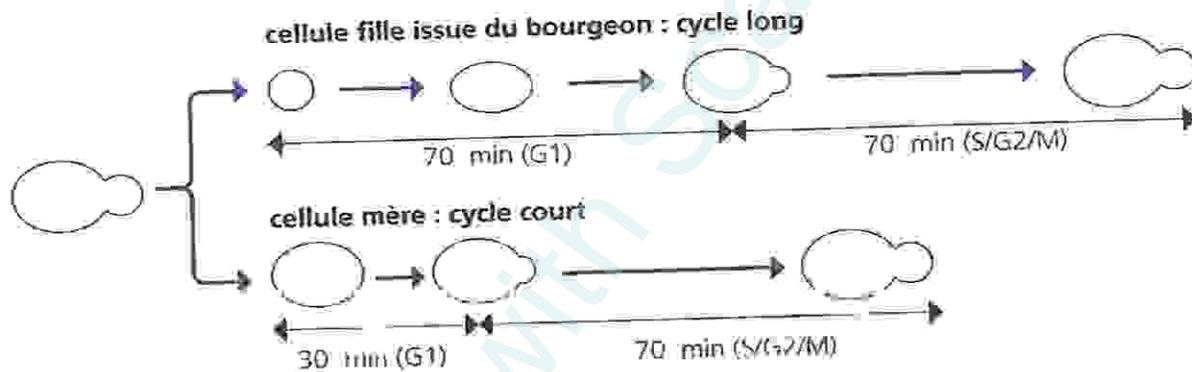


Figure 05 : Différentes étapes du cycle cellulaire mettant en avant les changements de formes au cours du bourgeonnement [Thuriaux ; 2004].

2.4.2.2. Reproduction sexuée :

Chez *S. cerevisiae*, les spores issues de la méiose germent pour donner des cellules haploïdes qui, en milieu riche, produisent en permanence la phéromone sexuelle correspondant aux haplotypes *MATa* et *MATa*. Ces cellules s'engagent donc spontanément dans un processus de fécondation qui produit un zygote où les deux noyaux fusionnent immédiatement, formant un diploïde *MATa/MATa* qui est certes compétent pour la méiose, mais où celle-ci ne se produit que dans des conditions de carence sévère, et pour autant que les cellules soient compétentes pour la respiration. La présence d'acétate favorise fortement la méiose, pour des raisons inconnues (Thuriaux, 2004).

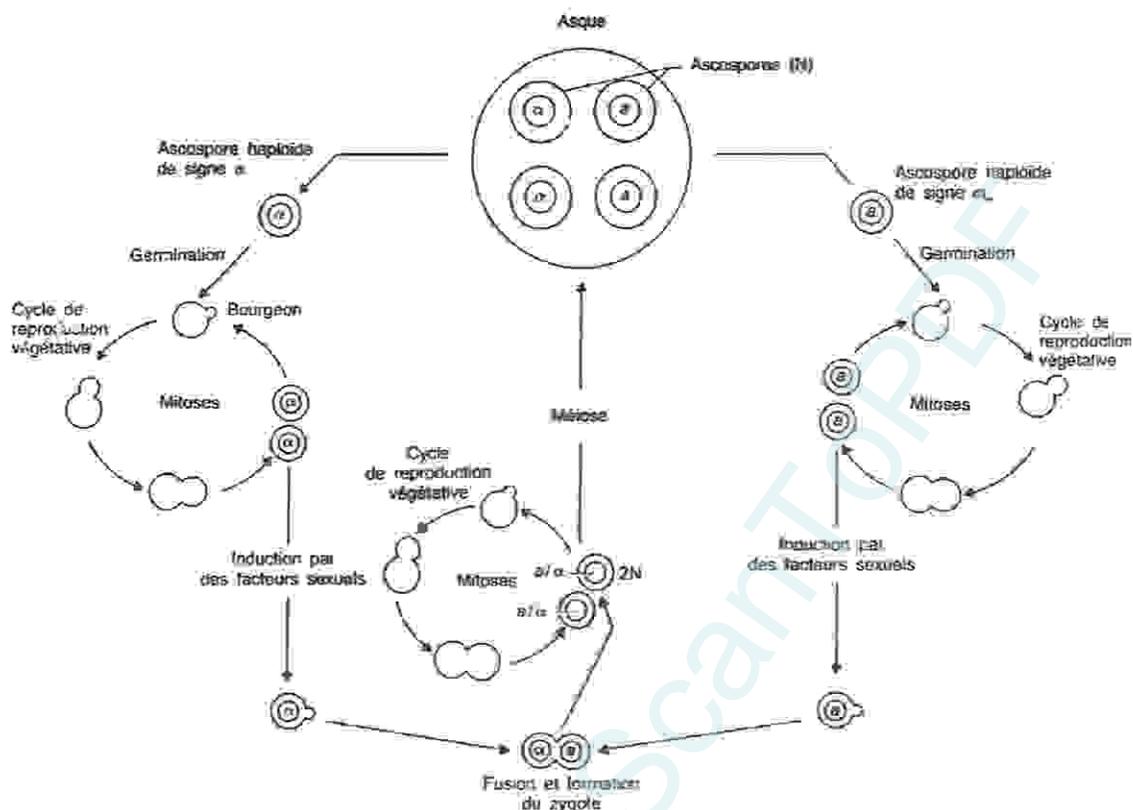


Figure 06 : Cycle de vie chez *S. cerevisiae* [3].

2.5. Physiologie des levures :

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

2.5.1. Besoins nutritifs :

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

- **Nutrition carbonée**

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

Les glucides sont les plus utilisés : glucose, fructose et mannose sont consommés par plus de 400 espèces décrites (Botton, 1991), *Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'utiliser

les pentoses alors que certaines espèces de *Metschnikowia* peuvent convertir le D- Xylose en éthanol (Bouix et Leveau, 1993).

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

- **Nutrition azotée**

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

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

- **Nutriments spécifiques**

Certaines substances sont nécessaires à des concentrations assez faibles.

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

Les facteurs de croissance agissent sur la multiplication et l'activité cellulaire, leur carence perturbe le métabolisme (Bocquet, 1993). La thiamine joue un rôle dans le métabolisme respiratoire, le métabolisme des lipides, la glycolyse et la fermentation alcoolique (Bouix et Leveau, 1993), et les déficiences en pyridoxine et acide pantothénique (incorporé dans les coenzymes A) peuvent altérer le métabolisme levurien (Jackson, 1994).

- **Facteurs de survie**

La notion de facteurs de survie concerne le mode d'action des stérols et de certains acides gras insaturés à longue chaîne sur l'activité des levures. Ces composés constitutifs des membranes cytoplasmiques permettent à la levure de faire le transfert des nutriments et de s'adapter à la présence de l'éthanol (Charpentier, 1993). En leur absence, l'activité de

croissance dans un premier temps et de fermentation dans un deuxième va ralentir et stopper (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996).

2.5.2. Conditions physico-chimiques :

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

• Oxygène

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

Une anaérobiose partielle augmente l'utilisation du glucose par la levure et améliore sa production de biomasse et sa capacité fermentaire, en permettant la biosynthèse des stérols et des acides gras insaturés à longues chaînes constitutifs des membranes (Charpentier, 1993 ; Venturin *et al*, 1994).

• Ethanol

Selon les souches et l'état physiologique de la culture, l'éthanol est toxique pour des concentrations de 8 à 18 % en volume et peut entraîner la mort des cellules (Charpentier, 1993). Les molécules d'éthanol vont se substituer aux molécules d'eau à l'intérieur de la membrane plasmique, réduisant ainsi sa fluidité et sa perméabilité et entraînant une inhibition du transport de substrat (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996). Toutefois, les levures ont la possibilité de corriger l'action de l'éthanol en augmentant la proportion d'acides gras insaturés à longue chaîne et des stérols membranaires (Charpentier, 1993).

D'une façon générale, les levures survivent à un large spectre de type environnemental:

- Gamme de tolérance de température: de 0° à 55°C
- Température de prolifération: de 12° à 40°C
- Tolérance au pH: croissance possible à un pH = 3-8.
- Tolérance presque complète vis à vis de la dessiccation (levures sèches)
- Tolérance vis à vis de la pression osmotique: les levures peuvent pousser et fermenter jusqu'à des concentrations en sucre de l'ordre de 3M.
- Tolérance alcoolique: jusqu'à 20% d'alcool [1].

2.6. Métabolisme :

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a la particularité de présenter un métabolisme mixte en présence d'oxygène: respiration (production oxydative de biomasse) et fermentation (production fermentaire d'éthanol) [4].

En aérobiose, lorsque l'apport en glucose est faible, le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* est purement oxydatif. Les seuls produits synthétisés par le micro-organisme sont la biomasse et le CO₂ ; le rendement en biomasse est alors maximum et égal à 0,5 g de biomasse par g de glucose (Blom *et al.*, 2000 ; Flikweert *et al.*, 1999). Lorsque l'apport de glucose dépasse un certain seuil, le métabolisme devient oxydo-réductif. Dans ce cas-là, les produits synthétisés sont la biomasse, le CO₂, le glycérol, l'acétate et l'éthanol et le rendement en biomasse est fortement réduit. Cette bascule métabolique est appelée transition respiro-fermentaire ou effet Crabtree.

2.6.1. Métabolisme oxydatif :

Le métabolisme oxydatif du glucose est une oxydation complète de la molécule de sucre en eau et en gaz carbonique à travers les voies métaboliques de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Deux conditions sont nécessaires à ce métabolisme.

Outre la présence d'oxygène, la concentration en glucose doit rester faible, pour éviter un changement métabolique. Chez *S. cerevisiae* comme chez d'autres organismes eucaryotes, les différentes enzymes qui catalysent les réactions du cycle de Krebs sont situées dans la mitochondrie (Nielsen et Villadsen, 2003).

Le bilan énergétique théorique maximale de cette voie métabolique est de :



En plus de la production de coenzymes réduits sous forme de NADH et FADH₂, le cycle de Krebs sert à former de nombreux précurseurs pour la synthèse de macromolécules de la composition cellulaire. La phosphorylation oxydative régénère les coenzymes réduits NADH et FADH₂ en NAD⁺ et FAD. Les électrons ainsi libérés sont transférés à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau. Les protons exportés permettent le maintien du potentiel transmembranaire entre l'espace inter membranaire et la matrice de la mitochondrie. Ainsi, l'entrée des protons à l'intérieur de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i grâce à l'ATPase membranaire. (Mouret, 2006).

2.6.2. Métabolisme fermentaire :

Le métabolisme fermentaire peut être défini comme l'ensemble des réactions qui se réalisent en l'absence d'oxygène comme accepteur final d'électron.

Le niveau de sensibilité est variable selon le type de levure considéré. Certaines levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, sont fortement Crabtree positives et produisent déjà de l'éthanol au-delà de 1 g.l⁻¹ de glucose tandis que pour d'autres, la synthèse d'éthanol ne commence pas avant 20 à 50 g.l⁻¹ de glucose (Ratledge, 1991). Les levures pour lesquelles la respiration n'est pas réprimée par la présence de glucose sont dites Crabtree négatives [4].

3. Biomarqueur :

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al., 1997).

Les différents types de biomarqueur sont :

- **Biomarqueur d'exposition** : Ils permettent la mise en évidence d'une exposition actuelle ou passée à un polluant d'un organisme. Par exemple les adduits d'ADN sont utilisés comme biomarqueurs d'exposition à des cellules cancérogènes ou génotoxiques (Timbrell et al., 1994).
- **Biomarqueur d'effet** : Ils sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus, les populations ou les écosystèmes.
- **Biomarqueur de sensibilité** : Ce sont des composés qui traduisent les variations de la sensibilité.

4. Bioindicateur :

Un bioindicateur est un indicateur constitué par une espèce végétale, fongique ou animale ou par un groupe d'espèces (groupe éco-sociologique) ou groupement végétal dont la présence (ou l'état) renseigne sur certaines caractéristiques écologiques (c'est-à-dire physico-chimiques, microclimatique, biologiques et fonctionnelle) de l'environnement, ou sur l'incidence de certaines pratiques. On les utilise notamment pour la bioévaluation environnementale (suivi de l'état de l'environnement, ou de l'efficacité de mesures compensatoires ou restauratoires) [1].

Son principe est d'observer des effets biologiques ou écosystémiques, au niveau de l'individu et/ou de populations ou écosystèmes (à l'échelle de la biosphère ou de grands biomes éventuellement).

Ces effets doivent être mesurables via l'observation de divers degrés d'altérations morphologiques, comportementales, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction), conduisant dans les cas extrêmes à la mort de ces individus ou à la disparition d'une population.

✓ **Propriétés d'un bioindicateur :**

- Il doit être suffisamment (normalement ou anormalement) répandu sur le territoire concerné et y être relativement abondant, et si possible facilement détectable.
- Sauf dans le cas où l'on veut mesurer la mobilité d'espèces, il doit être le plus sédentaire possible pour refléter les conditions locales.
- Il doit avoir une taille rendant possible l'étude de ces différents tissus et de leurs composantes (muscles, os, organes dans le cas d'un animal...).
- Il doit tolérer les contaminants avec des effets sub-létaux.
- Il doit aussi survivre hors du milieu naturel et tolérer différentes conditions de laboratoires (pH, température...).
- Une relation entre la concentration en contaminants dans le milieu externe et la concentration dans l'organisme doit exister.

Certains bioindicateurs sont aussi des biointégrateurs ; ils peuvent être doublement utiles dans le cadre de programmes de biosurveillance.

Chapitre II

TEFLUTHRINE

Produced with ScanTOPDF

1. Généralité sur les pesticides :

1.1. Historique :

Dès les débuts de l'agriculture, l'homme a recherché à protéger les récoltes. De l'Antiquité au XIXe siècle, l'utilisation du soufre comme fongicide (Homère, 1000 ans av JC), l'utilisation de l'Arsenic comme insecticide (Pline, 50 ans av JC), développement de produits organiques d'applications agricoles dans l'après-guerre (beaucoup d'insecticides): DDT (Diphényl-Dichloro-Trichloroéthane) (1939) ; Parathion (1941) ; Carbamates (1950) ; Diquat, Paraquat (1960) ; Pyréthrinés (1970) ; Thiazoles (1980)...

1.2. Définition :

Le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 1994) définit comme pesticide toute substance destinée à prévenir, détruire, attirer, repousser ou lutter contre tout élément nuisible, plante ou insecte, pendant la production, l'entreposage, le transport, la distribution et la transformation de denrées alimentaires, de produits agricoles ou d'aliments pour animaux [5].

Les pesticides sont des substances dont la terminaison du nom en « cide » indique qu'ils ont pour fonction de tuer des êtres vivants nuisibles (pestes) à un ou plusieurs facteurs dont on veut protéger [6].

1.3. Composition :

Un pesticide est composé de deux substances :

- **Une ou plusieurs matières actives** : Ce sont des matières actives qui confèrent au produit l'effet poison désiré. Leur composition et leur efficacité varie d'un pesticide à un autre.
- **Un ou plusieurs additifs** : Ces additifs renforcent l'efficacité et la sécurité du produit.

1.4. Classification :

D'un point de vue réglementaire, on distingue ceux utilisés pour la protection des végétaux, appelés produits phytosanitaires ou phytopharmaceutiques, de ceux utilisés pour préserver la santé humaine et animale, appelés biocides.

D'après leur cible, les pesticides sont divisés en herbicides, insecticides, fongicides, acaricides, molluscicides, nématocères, rodenticides et corvicides.

Selon leur structure chimique, ils peuvent être organochlorés, organophosphorés, organostaniques, carbamates, benzimidazoles, triazoles, pyréthrinoides de synthèse, pyrimidines et autres.

Vu leurs propriétés toxicologiques, ubiquité, persistance, présence et concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger, et sont actuellement considérés parmi les principaux polluants environnementaux, à l'origine de résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau (Urban et Cook/EPA, 1986; Watanabe-Akanuma *et al.*, 2005). Leur utilisation massive dans les secteurs agricoles, industriels et médicaux constitue donc une réelle menace mondiale.

Catégorie d'usage	Cibles visées	Exemples de cibles
Acaricide	Acariens	Acarien des poussières Phytopte de l'érable Tétranyque à deux points
Avicide	Oiseaux	Pigeon
Insecticide	Insectes	Blatte Doryphore de la pomme de terre Punaise velue Tordeuse des bourgeons de l'épinette
Herbicide	Plantes indésirables	Chénopode Chiendent Herbe à la puce Plantain
Fongicide	Champignons microscopiques causant des maladies des plantes	<i>Diplocarpon rosae</i> causant la tâche noire du rosier <i>Pucciniastrum epilobii</i> causant la rouille des aiguilles du sapin <i>Venturia inaequalis</i> causant la tavelure du pommier
Piscicide	Poissons	Meunier noir
Rodenticide	Rongeurs	Rat Souris
Molluscicide	Mollusques terrestres	Escargot Limace
Nématocide	Nématodes causant des maladies des plantes	<i>Meloidogyne hapla</i> causant la nodosité des racines chez la carotte

Tableau 01 : Différents types de pesticides et leurs cibles [6].

1.5. Impact des pesticides dans l'environnement :

Le risque phytosanitaire consiste à caractériser d'une part l'écotoxicité du produit, d'autre part les possibilités de contact des organismes avec le produit en fonction de leur mode d'action, de leur persistance et de leur capacité de bioaccumulation.

Ces produits peuvent être responsables des pollutions diffuses et chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur fabrication, transport, utilisation ou lors de l'élimination de produits en fin de vie.

On retrouve des résidus de pesticides partout: dans l'eau bien sûr, mais aussi dans l'air, les brouillards, l'eau de pluie et le sol.

1.5.1. Sol :

Il précise que le sol est une source potentielle de contamination par les pesticides pour les autres compartiments environnementaux (air-eau) par la voie de phénomène comme le ruissellement. La plus part de ces produits vont également toucher d'autres organismes que ceux visés au départ, de manière directe (absorption, ingestion, respiration, etc.) ou indirecte (via un autre organisme contaminé, de l'eau polluée etc.). Cela peut avoir un effet nocif sur la fertilité du sol. En effet, les vers de terre sont des agents actifs de la fertilité et la circulation de l'eau. Ils sont atteints par les pesticides via l'eau polluée qui imbibe le sol.

De plus ces substances dans le sol sont transformées en divers produits de dégradation dont la toxicité n'est pas toujours connue. La disparition de la substance active et des molécules dérivées est plus ou moins rapide selon le caractère biodégradable des molécules en cause, et selon les conditions du milieu (ORE ; 2002).

1.5.2. L'air :

Bien que la plupart des pesticides soient peu volatils, certains, disséminés dans l'atmosphère sur de grandes surfaces et pendant de longues périodes, peuvent être retrouvés à grande distance de leurs points d'application.

Hors périodes d'épandage, on trouve des pesticides dans l'air par relargage à partir du sol ou par volatilisation à partir des végétaux traités.

Ainsi cette contamination s'effectue :

- Par dérive au moment des applications.
- Par volatilisation de post-application à partir des sols traités.
- Par érosion éolienne sous forme adsorbée sur les poussières de sols traités.

1.5.3. Eau :

Les impacts des pesticides sur les systèmes aquatiques sont souvent étudiés en utilisant un modèle de transport de l'hydrologie pour étudier le mouvement et le devenir des produits chimiques dans les rivières et les ruisseaux.

Il existe quatre grands axes à travers lesquels les pesticides atteignent l'eau:

- Ils peuvent se balader à l'extérieur de la zone destinée quand il est pulvérisé.
- Ils peuvent s'infiltrer ou se lixivier, à travers le sol.
- Ils peuvent être mise à l'eau par ruissellement ou ils peuvent être déversés (accidentellement ou par négligence).
- Ils peuvent également être effectués par l'eau par l'érosion du sol [7].

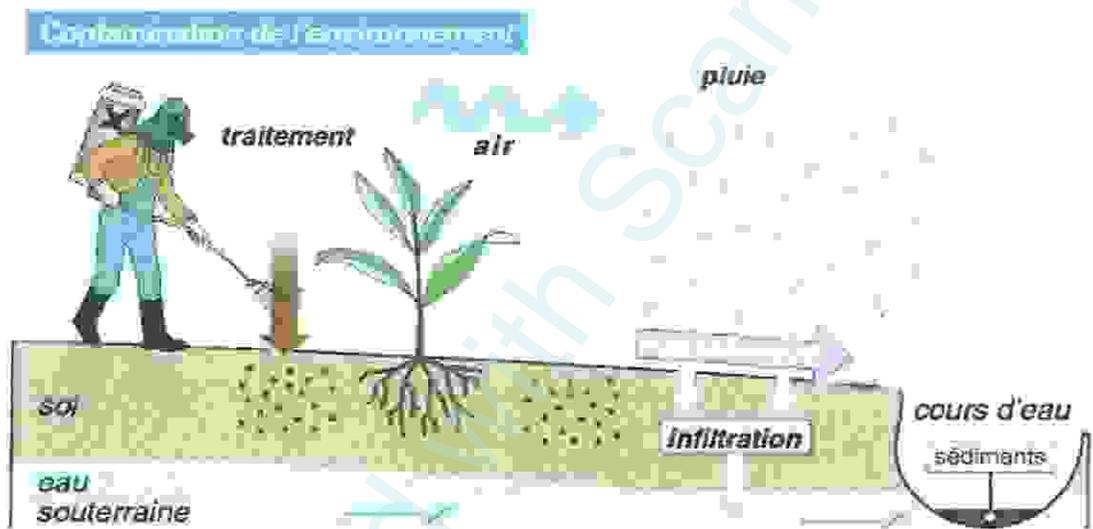


Figure 07: Contamination de l'environnement par les pesticides [7].

1.5.4. Effet sur la biodiversité :

Les effets sur la biodiversité, et notamment la flore et la faune terrestre et aquatique, sont donc indéniable. Ils peuvent parfois être observés longtemps après leur application, du fait de la persistance des produits ou de la perturbation des équilibres des écosystèmes. Ces effets sont entre autres :

- Des risques pour les organismes du sol intervenant dans le maintien de la fertilité du sol,
- Une diminution de la biodiversité des organismes du sol (même ceux dont l'utilité n'est pas connue aujourd'hui),

- Des risques de transfert, voire de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire" sauvage" (oiseaux, petits rongeurs, ...).



Figure 08 : Cadavres de buses et de renards [5].

1.5.5. Effet sur la santé :

Les pesticides sont présents dans nos aliments également : plus de 50% par l'agriculture intensive. Ils finissent dans nos organismes, apportés là par l'eau et les aliments consommés. Nos organismes hébergent ainsi des centaines de molécules toxiques qui posent un véritable problème de santé publique, et pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale.

1.6. Relation entre levure et pesticide :

La membrane plasmique des levures est le site d'action de nombreux antifongiques qui vont soit se complexer aux stéroïdes soit inhiber la synthèse de l'ergostérol et entraîner ainsi une désorganisation de la structure membranaire, et par la suite, un déséquilibre dans les échanges de la levure avec le milieu environnant ; suivi par différentes perturbations tel qu'une accumulation d'acides gras libres, une inhibition de la respiration et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et des déformations morphologiques notables (Buchenauer, 1987 ; Bonaly, 1991 ; Hargreaves *et al*, 1996). Or, à part leur fonction de barrière de perméabilité entre l'intérieur et l'environnement et la maintenance de la structure cellulaire, les membranes sont le milieu naturel de plusieurs protéines fonctionnelles essentielles au fonctionnement cellulaire. Ainsi, la grande accumulation de faibles concentrations de xénobiotiques lipophiles présents dans le milieu peut provoquer une altération des propriétés fonctionnelles des membranes, qui peut à son

tour avoir des conséquences néfastes très sévères sur la cellule en entier, mise à part la possibilité d'une réaction du toxique avec les composants intracellulaires du cytoplasme ou du noyau. Or, cette dernière possibilité est souvent à ne pas sous estimer, la toxicité des pesticides pouvant s'exercer directement envers des composants intracellulaires levuriens de différents compartiments cellulaires ; des actions cytotoxiques et génotoxiques diverses viennent alors s'ajouter et se combiner (Ahlers *et al*, 1991 ; Goin et Mayer, 1995 ; Wang *et al*, 2002 ; Sohn *et al*, 2004).

Par ailleurs, l'estimation du danger environnemental et sanitaire de plus de 100000 substances chimiques fabriquées par l'Homme, sans augmenter l'expérimentation avec les animaux supérieurs, implique logiquement la combinaison de plusieurs méthodes, tel que les tests utilisant des microorganismes.

1.7. Bioaccumulation et dégradation des pesticides :

Récemment, l'aptitude des microorganismes à accumuler et/ou métaboliser certains pesticides a été le centre d'attention à cause de la persistance environnementale et la toxicité de ces substances chimiques. Une variété de microorganismes peuvent utiliser les pesticides comme source unique de carbone ; cependant, dans certains cas ce métabolisme microbien des contaminants peut produire des métabolites toxiques, et souvent l'adsorption se présente comme le choix le plus prometteur. Ce mécanisme implique des processus indépendants du métabolisme tel que l'adsorption physique et chimique, l'échange d'ions, l'interaction électrostatique, la complexation, la chélation et la microprécipitation. Ces réactions se déroulent dans la paroi et la membrane cellulaires, contrairement aux biotransformations qui mettent en œuvre le métabolisme aérobique ou anaérobique (Aksu, 2005). La taille des cellules, leur morphologie et composition chimique, ainsi que le nombre et la distribution des sites actifs d'adsorption jouent un rôle déterminant dans la capacité d'adsorption (Aksu, 2005). La concentration du toxique dans la membrane plasmique peut être plusieurs fois supérieure à sa concentration dans le milieu extérieur et dans les compartiments intracellulaires hydrophiles (Ahlers *et al*, 1991).

Saccharomyces cerevisiae cultivée dans des milieux additionnés de téfluthrine est capable d'effectuer une bioaccumulation et une métabolisation de ce pesticide. La bioaccumulation réalisée est inversement proportionnelle à l'hydrosolubilité de cette substance. L'augmentation de la biomasse est si rapide que l'accumulation par unité de biomasse diminue au cours du temps malgré la bioaccumulation ininterrompue (Lal et Lal, 1987).

Pour conclure, on peut noter qu'en matière d'interaction avec les pesticides, le modèle levurien se montre comme un système approprié pour répondre à nombreuses hypothèses de cytotoxicité et génotoxicité directe ou indirecte. Ainsi, perturbation des systèmes membranaires, inhibitions enzymatiques, stress oxydatif, perte de chromosome, métabolites réactionnels électrophiles, et autres actions cytotoxiques et/ou génotoxiques sont relevés parallèlement à la baisse de la viabilité et la diminution de la croissance et de l'activité fermentaire des levures sous l'effet des pesticides. Donc, les levures peuvent être passives et subir l'action toxique, comme elles pourraient participer à cette toxicité par bioactivation des pesticides en métabolites réactifs électrophiles présentant une forte probabilité de liaison avec les macromolécules structurales et résultant en adduits, à l'exemple du métabolisme levurien de l'aflatoxine. Donc, là aussi le métabolisme peut jouer un rôle crucial qui peut être nuisible, ou protecteur lorsque les métabolites obtenus sont moins toxiques que le pesticide initial.

Mais, si les pesticides exercent une action toxique envers les levures, ces dernières peuvent à leur tour diminuer les résidus de pesticides par adsorption et/ou métabolisation des molécules toxiques. Cette vue d'ensemble ne peut que souligner l'efficacité du modèle levurien pour définir les bases cellulaires et moléculaires de la toxicité des pesticides.

2. Téfluthrine :

La téfluthrine est un insecticide à base de pyréthrianoïdes de synthèse qui est utilisé pour la suppression de la chrysomèle des racines du maïs (notamment la chrysomèle occidentale des racines du maïs), le ver-gris noir, les larves de taupin et la mouche des semis dans les cultures de maïs de grande culture, de maïs de semence et de maïs sucré.

C'est un insecticide qui agit sur le système nerveux des insectes en perturbant le fonctionnement neuronal par action sur le canal sodique. C'est un insecticide de contact.

2.1 . Description :

Nom commercial	Force
Nom commun de la matière active	Téfluthrine
Teneur en matière active	1,5G
Utilité	Insecticide
Famille chimique	Pyréthrinoïdes de synthèse
Numéro CAS	79538-32-2
Formule brute	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₇ O ₂
Numéro d'homologation	Dépend du produit

Tableau 02 : Description de la téfluthrine.

- Formule chimique développée: Selon IUPAC
(2, 3, 5,6-tétrafluoro-4-méthylphényl) méthyl (1R, 3R)-rel-3-[(1Z)-2-chloro-3, 3,3-trifluoro-1-propen-1-yl]-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate

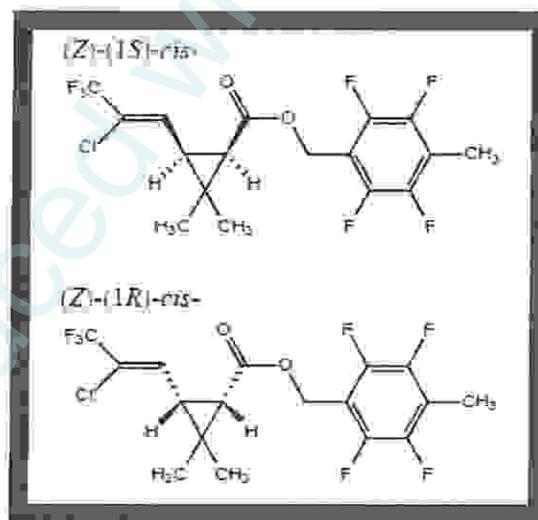


Figure 09 : Formule développée.

2.2 Propriétés physico-chimiques :

Point de fusion	39-43°C
Point d'ébullition	156°C
Masse volumique apparente	0,52 - 0,82 g/cm ³
Masse moléculaire	418,7
Pression de vapeur	0,00006 mmHg
pH	4 - 8
Inflammabilité	Pas facilement inflammable
Ultraviolet/spectre du visible	Pas d'absorption prévue à $\lambda > 300$ nanomètres
Solubilité dans l'eau (20°C)	0,02 mg/L
Coefficient de partage <i>n</i> -octanol-eau (K _{ow}) à 20 °C	Log K _{ow} = 6,5
Miscibilité	Miscible
Etat physique, odeur et couleur	Solide granulé, inodore, havane à brun rouge
Stabilité à l'entreposage	Stable dans des conditions d'utilisation et d'entreposage normales.
Incompatibilités	Agents oxydants puissants
Produits de décomposition dangereux	Peut se décomposer à des températures élevées et libérer des gaz toxiques, notamment du dioxyde de carbone, du monoxyde de carbone et, possiblement, des gaz irritants

Tableau 03 : Propriétés physico-chimiques de la téfluthrine.

2.3 . Source d'exposition :

Il y a plusieurs sources d'exposition à la téfluthrine, nous allons résumer ces sources en deux principales qui sont :

2.3.1 Expositions professionnelles:

Ces expositions concernent des personnes qui travaillent dans les endroits où son utilisation est très élevée.

Nous avons :

- Les usines de production de la téfluthrine
- Les champs (de culture de maïs en générale)

2.3.2 Exposition extra-professionnelles :

C'est la nourriture qui constitue la principale source pour les personnes qui ne sont pas exposées à cette substance chimique dans leur travail ensuite vient la pollution environnementale.

2.4 . Mode d'utilisation :

Force est appliqué aux semis/plantation/repiquage/après plantations à l'aide d'un semoir équipé de diffuseurs. Il peut être utilisé en traitement localisé (bande) ou en généralisé. Le produit doit être incorporé dans le sol à proximité des racines.

2.5 . Mode d'action :

- Action de vapeur au niveau du sol
- Élimine les insectes avant qu'ils n'aient occasionné des dégâts
- Renforce l'efficacité contre les insectes du sol.

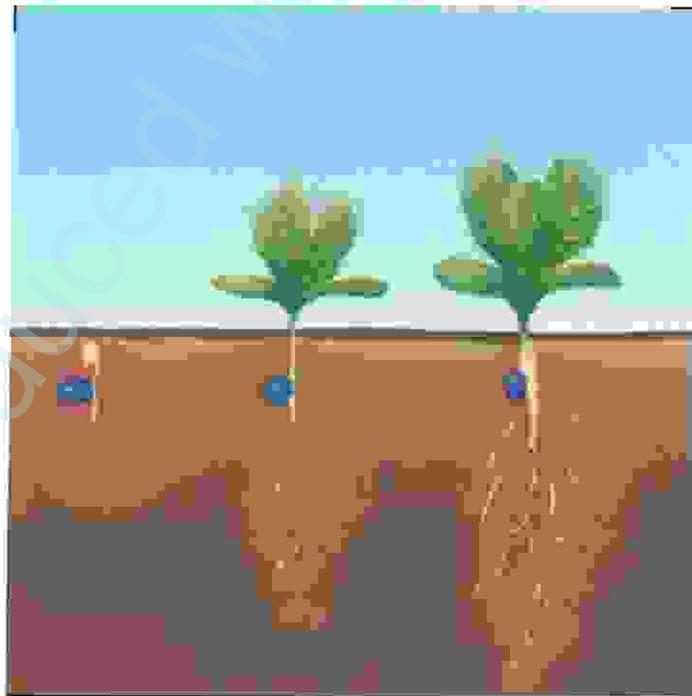


Figure 10 : Protection de la racine des plantes par la Téfluthrine [11].

2.6 . Devenir et comportement dans l'environnement :

La téfluthrine est une substance insoluble et de moyennement à fortement volatile (pression de vapeur de 8,4 mPa à 20 °C) qui se transporte rapidement hors de l'eau et des surfaces de sol humides (constante de la loi d'Henry $(1/H) = 10,4$ ($K = 234$ Pa m³/mol à 20 °C)). Elle est toutefois employée sous forme de granulé enfoui dans le sol, de sorte que sa volatilisation constitue une voie peu importante de dissipation.

Elle ne se dissocie pas dans l'eau. Son $\log K_{oc}$ est très élevé (6,4), ce qui est révélateur d'un fort potentiel de bioaccumulation.

Les mécanismes abiotiques tels que l'hydrolyse et la photolyse ne sont pas des voies importantes de transformation de la téfluthrine dans le sol ou dans l'eau. Toutefois, elle est phototransformée rapidement dans l'air, sa demi-vie s'y établissant à 0,94 jour. Sa biotransformation est sa principale voie de transformation dans le sol et dans les milieux aquatiques. Elle est modérément persistante dans le sol, son temps maximal de dissipation à 50 % (TD₅₀) et de dissipation à 90 % (TD₉₀) se chiffrant à 63 jours et à 163 jours, respectivement. Dans les systèmes eau-sédiments (systèmes complets), les chiffres sont de 146 jours et de 190 jours, respectivement. Aucun produit important de transformation (> 10 % de la matière active appliquée) n'a été décelé dans les études sur la biotransformation dans les sols en milieu aérobie.

Dans le sol, la molécule de téfluthrine se minéralise en CO₂ sans donner de produits de transformation importants. Dans les systèmes aquatiques, le seul produit de transformation important à être décelé était le composé IA dans l'eau (maximum de 22 % de la matière active appliquée). Dans les sédiments uniquement, la téfluthrine est persistante. Son TD₅₀ passe à 204 jours.

La téfluthrine étant très fortement adsorbée, elle est immobile dans le sol (coefficient d'adsorption carbone organique (K_{co}) entre 24 200 et 267 000) et ne devrait pas être entraînée par lessivage dans l'eau souterraine. Les études sur le lessivage dans des colonnes de sol vieilli confirment que la téfluthrine et ses produits de transformation ne sont pas mobiles dans le sol et ne sont pas entraînés par lessivage à plus de 5 cm de profondeur.

2.7 . Evaluation des risques ecotoxicologiques :**2.7.1 Toxicité aiguë :**

La toxicité aiguë représente une exposition de courte durée à de fortes concentrations de téfluthrine par voie orale ou cutanée. Ainsi nous pouvons constater le résultat de cette exposition chez les différents animaux sur lesquels on a testé cet insecticide.

Voie orale	DL ₅₀ femelle rat, 2.066 mg/kg
Inhalation	CL ₅₀ femelle/mâle rat, > 2,54 mg/l, 4 h
Pénétration cutanée	DL ₅₀ femelle/mâle rat, > 2.000 mg/kg
Irritation de la peau	Lapin: Modérément Irritant Peut provisoirement provoquer des démangeaisons, picotements, brûlures ou engourdissements de la peau exposée (paresthésie).
Irritation des yeux	Lapin: Modérément Irritant

Tableau 04 : Toxicité aiguë de la téfluthrine

2.7.2 Toxicité chronique :

La toxicité chronique représente des expositions prolongées et à de faibles doses survenant suite à une ingestion, une inhalation, ou par contact direct du produit avec la peau.

Cette toxicité n'a pas montré d'effets cancérogènes, tératogènes ou mutagènes lors des expérimentations animales à la téfluthrine.

2.7.3 Toxicité sur les organismes aquatiques :

La toxicité sur les organismes aquatiques est due principalement au ruissellement des eaux de pluies dans les différents cours d'eaux.

Poisson	CL ₅₀ Oncorhynchus mykiss (Truite arc-en-ciel), 0,42 mg/l, 96 h
Daphnie	CE ₅₀ Daphnia magna, 0,54 mg/l, 48 h
Algues	CE ₅₀ Pseudokirchneriella subcapitata (algues vertes), > 100 mg/l, 96 h Dérivé des composants

Tableau 05 : Toxicité de la téfluthrine sur les organismes aquatiques

2.7.4 Toxicité sur les organismes terrestres :

Puisque la téfluthrine est un insecticide en granulé qui est enfoui dans le sol, les abeilles et les autres insectes utiles risquent peu d'y être exposés. On ne prévoit pas qu'elle puisse présenter de risque pour les végétaux.

Une évaluation des risques pour les autres organismes terrestres s'appuyait sur l'examen de données sur sa toxicité pour le lombric (toxicité aiguë), pour les oiseaux (toxicité aiguë par voie orale et sur le plan de la reproduction), pour les mammifères (toxicité aiguë par voie orale et sur le plan de la reproduction).

2.8 Limite maximale des résidus dans les aliments :

Elle représente selon le Codex les résidus acceptables sur le plan toxicologique, elle est fondée sur les données des Bonnes Pratiques Agricoles et est destinée à être appliquée dans le commerce international. Donc, c'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées alimentaires restent commercialisables, elle s'exprime en milligramme de résidus par kilogramme de produit alimentaire (Cluzeau *et al.*, 2000).

Présentement la *Loi sur les produits antiparasitaires* a fixé à 0,001 ppm les LMR de téfluthrine dans le lait. Elle est 0,02 chez la canne à sucre et 0,01 chez les aliments provenant d'autres plantes (données européens).

Les données fournies sur les résidus dans ou sur le maïs permettent d'établir que leur concentration ne devrait pas dépasser 0,06 ppm (données canadiens), soit la limite combinée de quantification au moyen des méthodes d'analyse des résidus appliquées à la détermination du composé d'origine, la téfluthrine, et de son métabolite dans le maïs.

Chapitre III

MATERIEL ET METHODES

Produced with ScanTOPDF

1. MATERIEL :

1.1 Matériel biologique :

Les levures, en tant qu'eucaryotes sont potentiellement un modèle pertinent pour représenter les organismes eucaryotes supérieurs dans les études de toxicités. La croissance, la physiologie, la biochimie et la génétique des levures, surtout *S. cerevisiae*, ont été considérablement étudiées, ce qui les rend un matériel convenable pour l'expérimentation. D'un point de vue pratique elles présentent de nombreux avantages puisqu'elles sont facilement cultivées et maintenues dans les conditions du laboratoire. En plus, les levures peuvent survivre dans les conditions anaérobies permettant de réaliser des tests non praticables avec les organismes supérieurs (Galzy, 1993 ; Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996). Ce qui justifie notre choix de ce bio-indicateur pour notre travail.

1.2 Matériel expérimental :

1.2.1 Appareillage :

- Agitateur magnétique INTERLABS et barreau aimanté.
- Anse de Platine.
- Autoclave SANO CLAVE WOLF 73337.
- Balance EXPLORER PRO.
- Bec Bunsen.
- Centrifugeuse réfrigérée SIGMA 2-16 K.
- Cellule de MALLASSEZ.
- Etuve INCUCELL.
- Four Pasteur MEMMERT.
- Homogénéiseur ultra-son VIBRA CELL 75186.
- Microscope optique ZEISS.
- Pompe à oxygène.
- Réfrigérateur LIEBHERR.
- Spectrophotomètre visible et UV/visible JENWAY 6305.

1.2.2 Verrerie :

- Becher de 200ml.
- Boîtes de Pétri.
- Flacons en verre stériles.
- Lames et lamelles.
- Micropipette à embout bleu (100 à 1000 μ L).

- Pipette graduée de 25mL.
- Pipettes Pasteur.
- Portoir tube à essai.
- Seringues de 5CC.
- Tubes à hémolyse stérile.
- Tubes à vis stérile.
- Tubes Eppendorf de 1,5ml.
- Verre de montre et spatule.

2. METHODES :

Cette étude a été réalisée au laboratoire du département de biologie de l'université de Guelma. Elle consiste à tester l'effet toxique de l'insecticide FORCE[®] (téfluthrine) sur *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons procédé d'abord à une culture du matériel biologique puis aux expérimentations.

2.1 Culture de *Saccharomyces cerevisiae* :

Nous avons commencé par le lavage de notre levure (puisque elle est conditionnée en pâte) pour la débarrasser de toute trace de substrat.

Le lavage se fait comme suit :

- Peser et verser 1g de levure de boulanger dans un bécher de 200mL de volume
- Ajouter 100mL d'eau physiologique
- Placer le tout sur l'agitateur magnétique en aérant avec la pompe à oxygène pendant 3h environ

Nous avons cultivé ensuite la levure dans la gélose Sabouraud et le Sabouraud liquide.

2.2 Les tests :

2.2.1 Principe :

Ces différents tests ont été réalisés afin d'évaluer l'effet de l'insecticide FORCE[®] (téfluthrine) sur notre bio indicateur (*Saccharomyces cerevisiae*) et aussi pour comprendre les mécanismes de défenses de la cellule vis-à-vis des xénobiotiques.

Nous avons ainsi réalisé les tests suivants :

- Effet du pesticide sur la cinétique de croissance.
- Mesure de l'effet sur l'activité enzymatique (catalase).
- Dosage des protéines.

2.2.2 Mode opératoire :

2.2.2.1 Effet de la téfluthrine sur la cinétique de croissance :

❖ Dénombrement en milieu liquide (Sabouraud liquide) :

- Préparer une solution mère de téfluthrine en raison de 1g de téfluthrine pour 100mL d'eau distillée
- Préparer ensuite cinq dilutions pour les concentrations suivantes: 25mg/L ; 50mg/L ; 100mg/L ; 150mg/L et 200mg/L
- Stériliser et étiqueter six tubes à vis à proximité du bec Bunsen
- Mettre dans le tube témoin 1CC de la levure lavée et 5CC de Sabouraud liquide
- Dans les cinq autres tubes mettre 1CC de levure ; 5CC de Sabouraud liquide et 1CC de chaque concentration de téfluthrine
- Incuber à 28°C pendant 24h
- Après incubation passer à la lecture au microscope optique sur cellule de Mallassez (figure 11).



Figure 11 : Cellule de Mallassez [8].

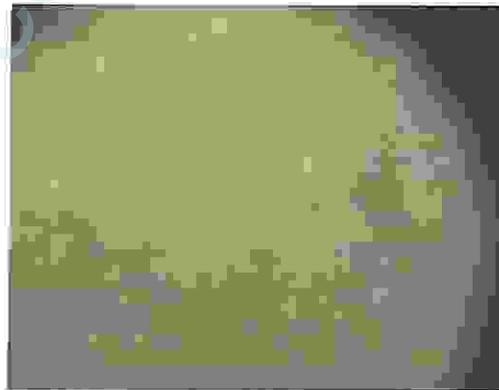


Figure 12 : Colonies à l'état frais.

- Numération sur cellule de Mallassez.
- Diluer les suspensions à 10^{-2}
- Ajouter quelques gouttes de bleu de méthylène dans chaque dilution
- Placer la cellule sur le microscope
- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle
- Déposer la lamelle sur les rebords
- Placer l'extrémité de la micropipette contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.
- Compter le nombre de cellule.
- Le nombre total de cellules est donné par la relation :

Nombre de cellules	=	nombre de cellules comptées	x facteur de dilution
$\frac{\text{Unité de volume}}{\text{Unité de volume}}$		$\frac{\text{volume du comptage}}{\text{volume du comptage}}$	

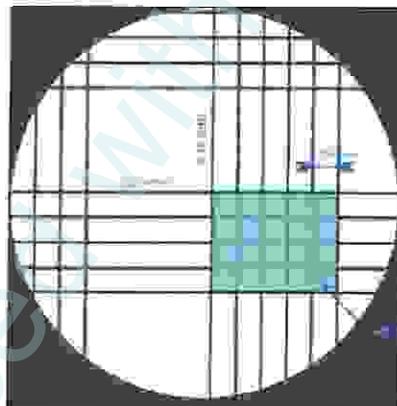


Figure 13 : Numération sur cellule de Mallassez [8].

❖ **Dénombrement des levures sur gélose Sabouraud :**

La gélose Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

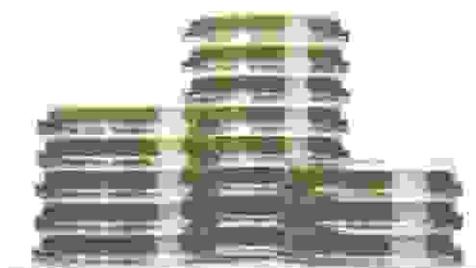


Figure 14 : *Gélose Sabouraud* [9].

- Couler, refroidir et marquer six boîtes de Pétri à proximité du bec Bunsen
- Eliminer le surnageant de la levure lavée qu'on aura au préalable fait décanter
- Ajouter 50mL de Sabouraud liquide au culot et agiter
- Ensemencer par stries la première boîte (témoin) avec cette préparation
- Repartir ensuite le restant de la préparation (mélange Sabouraud+levure) dans cinq tubes étiquetés
- Mettre 1CC de chaque concentration de pesticide dans ces tubes
- Ensemencer les boîtes de Pétri avec 100 μ L de chaque concentration correspondante
- Incuber à l'étuve pendant 24h à 28°C
- Après incubation, faire le dénombrement des colonies
- Les résultats s'exprimeront en nombre d'UFC.ml⁻¹



Figure 15 : *Colonies de levures obtenues après 24h d'incubation.*

2.2.2.2 Mesure de la catalase :

La catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en dioxygène (O₂) et eau (H₂O) selon l'équation bilan :



Cette enzyme existe chez tous les organismes aérobies chez lesquels elle participe, comme la peroxydase, à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène.

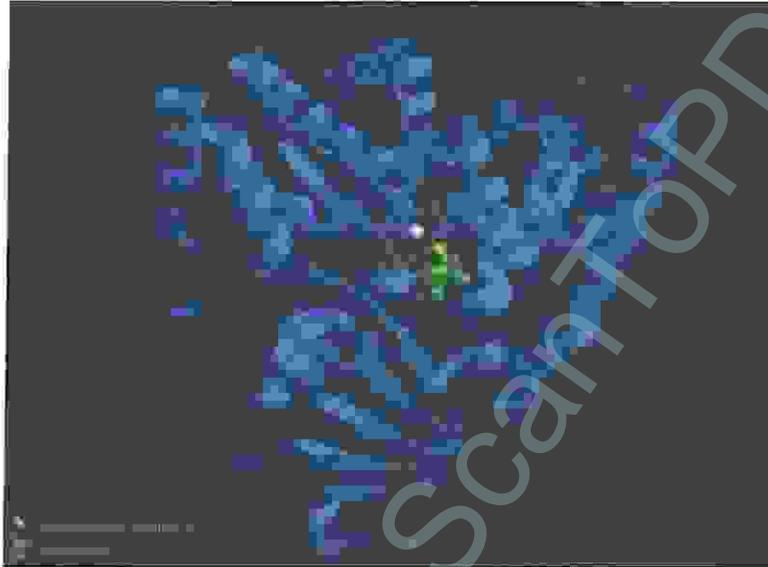


Figure 16 : Molécule de catalase [10].

❖ **Protocole :**

On débute d'abord par l'extraction du cytosol à partir des colonies de levures, puis on prépare une solution tampon phosphate pH=7,4 et enfin on mesure l'absorbance au spectrophotomètre à 240nm.

Extraction du cytosol :

- A partir des colonies obtenues, préparer des suspensions levuriennes avec 4CC de Sabouraud liquide et 1CC de chaque concentration de pesticide
- Incuber ces suspensions à 28°C pendant 24h.
- Après incubation, mettre 1CC de chaque concentration de suspension dans des tubes Eppendorf bien étiquetés
- Placer ces tubes dans des morceaux de glace et éclater les cellules à l'aide de l'homogénéiseur ultra-son
- Mettre ensuite ces tubes à centrifuger à 5000 rpm pendant 15mn à -10°C.

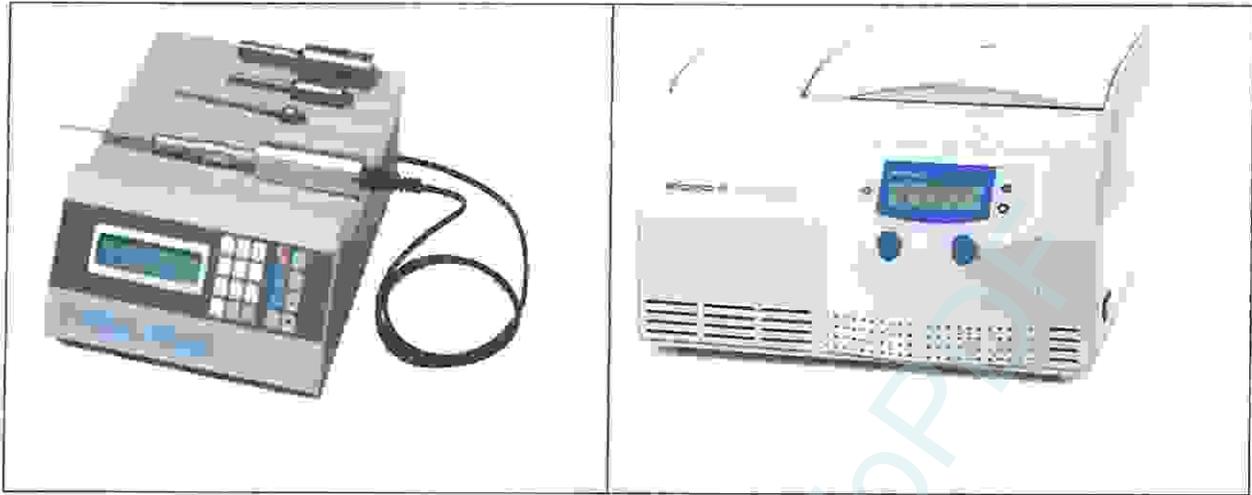


Figure 17 : Homogénéiseur ultra-son et Centrifugeuse réfrigérée.

Lecture au spectrophotomètre

- Mettre dans la cuve en quartz 750mL de tampon Phosphate ; 200mL d'eau oxygénée et 50mL du cytosol de chaque concentration
- Placer la cuve dans le spectrophotomètre et lire l'absorbance à 240nm

	$\Delta DO/mn$
Activité catalase ($\mu\text{moles}/mn/mg$ protéines) =	_____
	$0.040 \times mg$ protéines dans la cuve



Figure 18 : Spectrophotomètre à UV.

2.2.2.3 Dosage des protéines :

Ce dosage permet de normaliser les résultats obtenus à l'issue des dosages enzymatiques en fonction d'une quantité totale de protéines présente dans les échantillons.

❖ Principe du dosage :

La technique retenue dans le cadre de ce travail est celle décrite par Bradford (1976). IL s'agit d'une méthode de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu de Coomassie G250.

Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines (la forme anionique est en effet stabilisée par des interactions hydrophobiques et ioniques, ce colorant réagissant avec des restes de l'arginine et en moindre importance avec de l'histidine, la lysine, la tyrosine, la trypsine et la phénylalanine). Par conséquent, il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible.

❖ Protocole :

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéine standard : la BSA (albumine de sérum bovin). Cette gamme comprend 5 points : 0, 50, 100, 200 et 400 mg/L. Elle est préparée dans un tampon phosphate à 100 mM pH 7,8 (désigné par convention dans ce document par le sigle Tp(P)) dont la préparation est réalisée à partir de deux solutions : une solution A de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 26,8 g/L et une solution B de KH_2PO_4 à 13,6 g/L (l'ajustement de la solution A à pH 7,8 se faisant à l'aide de la solution B).

Suivant la concentration protéique des échantillons, des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Ainsi, pour les fractions S9 du cytosol, trois dilutions sont réalisées par défaut sur les échantillons : 1/10, 1/20 et 1/40.

Tous les tests ont été répétés trois fois.

3. Etude statistique :

Pour les études statistiques, nous les avons effectuées en grande partie avec l'Excel 2007 mais la partie de toxicité aiguë est traitée à l'aide d'un logiciel dénommé : BioStat 2008 par la méthode de Finney (distribution log normal). C'est grâce à ce logiciel que nous sommes parvenus à déterminer la létalité de 50% de la population (CL_{50}) soumise au test. En plus nous avons utilisés le logiciel Minitab 15 pour l'analyse de la variance (ANOVA).

Chapitre IV

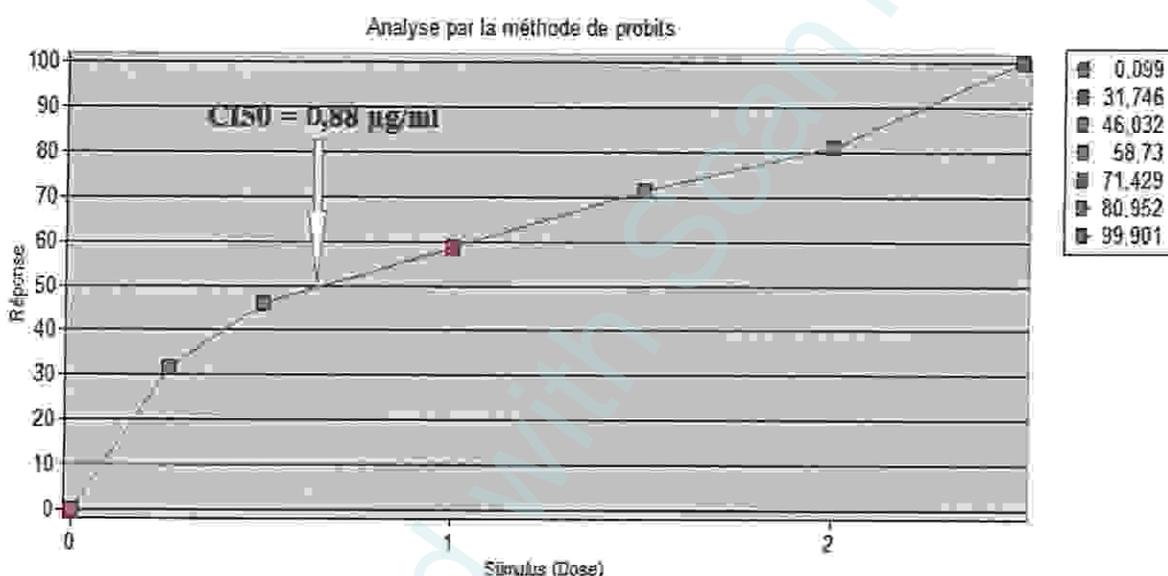
**RESULTATS ET
DISCUSSIONS**

Produced with ScanTOPDF

1. Biomasse :

1.1 Dénombrement sur milieu solide :

Analyse par la méthode de probits							
Dose (Stimulus)	Pourcentage réel (%)	Probit (Y)	Poids (Z)	X*Z	X*X*Z	Y*Z	X*Y*Z
0	0,001	1,9071	1	0	0	1,9071	0
0,25	0,3175	4,5258	4,5258	1,1314	0,2829	20,4811	5,1203
0,5	0,4602	4,9005	4,9005	2,4503	1,2252	24,0159	12,008
1	0,6873	5,2202	4,7798	4,7798	4,7798	24,9515	24,9515
1,5	0,7143	5,5656	4,3689	6,5533	9,8293	24,3162	36,4728
2	0,8095	5,875	3,748	7,496	14,9919	22,0232	44,0454
2,5	0,999	6,0928	1	2,5	6,25	0,0929	20,2322
		Summe	24,3228	24,9107	37,3526	125,7669	142,9311
LD (concentration létale)50	0,879	LD (concentration létale)75	0,0331	Beta	1,1821		
Erreur standard LD (concentration létale)50	0,0331	LD (concentration létale)84	1,725	Alpha	3,9609		
LD50 LCL (plus faible concentration létale)	0,8129	LD (concentration létale)100	2,148	Erreur standard Beta	0,2905		
LD50 UCL (plus forte concentration létale)	0,9452	Niveau de signification	0,05				
LD (concentration létale)91	0,2063						



Analyse par la méthode de probits (Méthode de Finney [distribution log normale])

Figure 19 : Concentration inhibitrice 50%.

Cette figure 15 nous montre la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à la téfluthrine en fonction des différentes concentrations ($C_1=0,25\mu\text{g/ml}$, $C_2=0,5\mu\text{g/ml}$, $C_3=1\mu\text{g/ml}$, $C_4=1,5\mu\text{g/ml}$, $C_5=2\mu\text{g/ml}$).

En effet la sensibilité de *Saccharomyces cerevisiae* à la téfluthrine s'est révélée dès les plus faibles concentrations ($<0,25\mu\text{g/ml}$). On constate que plus la concentration de la téfluthrine augmente, plus le taux de mortalité (*Saccharomyces cerevisiae*) augmente.

L'étude statistique exhibe que la différence entre la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) témoin et traité sont hautement significative ($p < 0,001$) avec un coefficient de corrélation faible ($r = 0,0645$).

1.2 Dénombrement sur milieu liquide :

Cette figure 16 met en évidence la variation de la biomasse en fonction des concentrations de téfluthrine sur milieu liquide.

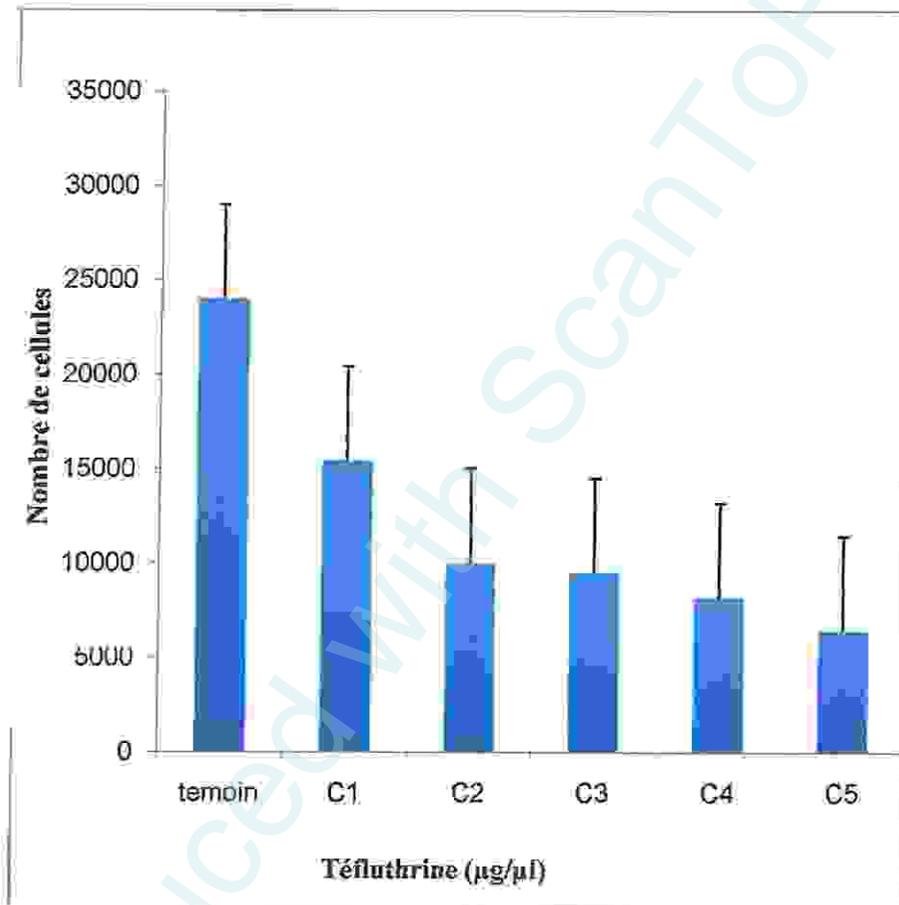


Figure 20 : Variation de la biomasse en fonction des différentes concentrations de téfluthrine.

Tandis que la concentration de la téfluthrine augmente, le nombre de cellule vivante (biomasse) diminue progressivement.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) témoins et traitées sont hautement significatives ($p < 0,001$) ainsi que la corrélation enregistrée entre les cellules vivantes (biomasse) et les différents traitements de téfluthrine est faible ($r = 0,0596$).

1.3 Dosage des protéines :

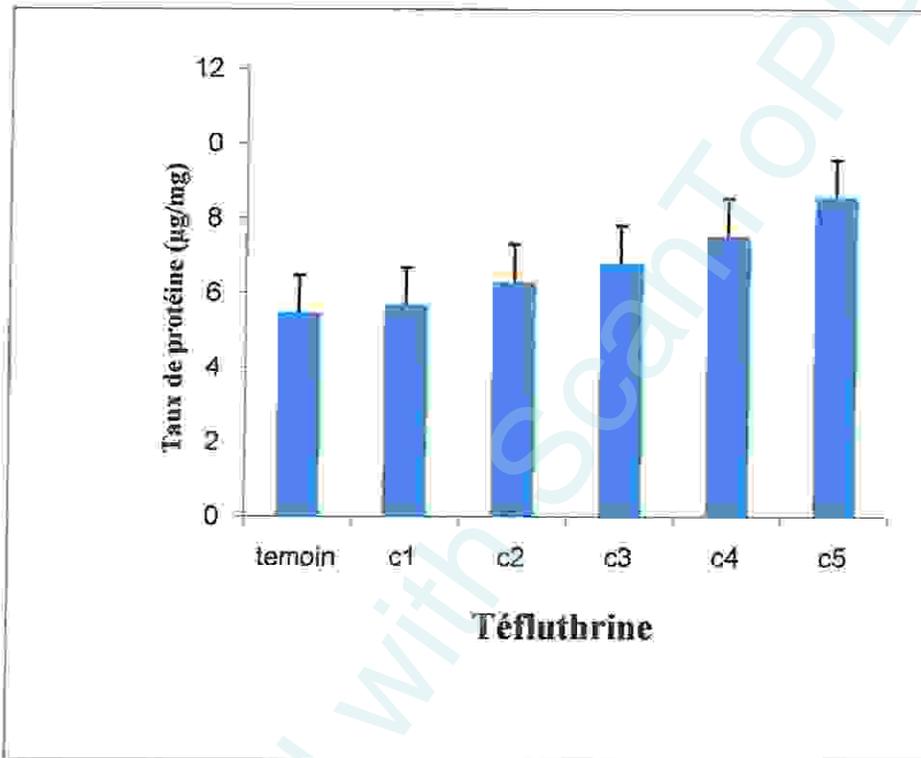


Figure 21 : Variation du taux de protéine en fonction des différentes concentrations de téfluthrine.

On remarque que le taux de protéines augmente en fonction des différentes concentrations de téfluthrine, il passe de 5,6µg/mg à 8,4µg/mg. Le taux de protéine enregistré une faible augmentation (d'environ 20%) chez les cellules traitées surtout avec la forte concentration de téfluthrine (200µg/ml) et ce par rapport au témoin, en fait il est de l'ordre de 3,2µg/mg.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) témoins et traitées sont fortement significatives $p < 0,001$ ainsi que la corrélation enregistrée entre le taux de protéine et les différents traitements avec la téfluthrine est forte ($r = 0,979$; $p > 0,05$).

1.4 Activité enzymatique (catalase) :

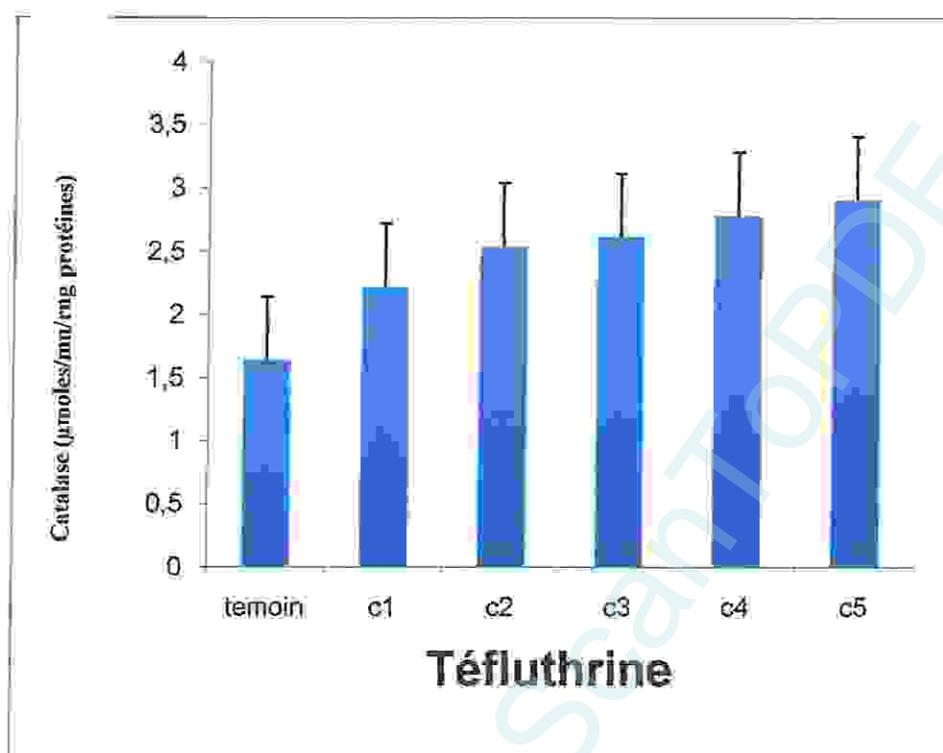


Figure 22 : Variation de l'activité enzymatique (catalase) en fonction des différentes concentrations de téfluthrine.

On constate une augmentation progressive de l'activité enzymatique (catalase) chez les cellules traitées avec les différentes concentrations de téfluthrine, il passe de 2,3 µg/mg à 2,9 µg/mg. La catalase enregistre une légère augmentation (d'environ 23%) chez les cellules viables traitées avec les fortes concentrations de téfluthrine (150 µg/l et 200 µg/l), en fait il est de l'ordre de 1,2 µg/mg par rapport au témoin.

L'étude statistique montre que les différences entre les levures (*Saccharomyces cerevisiae*) témoins et traitées sont moyennement significatives ($p > 0,017$) ainsi que la corrélation enregistrée entre l'activité enzymatique (catalase) et les traitements avec la téfluthrine est moyen ($r = 0,509$; $p = 0,017$).

2. Discussion :

Les résultats auxquels nous sommes parvenus mettent en exergue l'effet du pesticide (téfluthrine) sur la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) à travers certains biomarqueurs (biomasse, métabolisme et activité enzymatique).

L'influence des pesticides sur les levures a d'ailleurs été rapportée par plusieurs auteurs. Mais généralement son effet s'observe au niveau de la phase de latence, de la phase exponentielle et sur le rendement cellulaire en phase stationnaire. En effet, et comme l'a signalé Walker (1998), la durée de la phase de latence dépend de la présence de substances toxiques. Mais la souche s'adapte à ces nouvelles conditions et passe une phase exponentielle qui n'est pas toujours normale. D'autre part, après s'être exposée aux pesticides, les levures atteignent la phase stationnaire avec une concentration en biomasse relativement inférieure à celle du témoin. En effet, cette diminution de la concentration en biomasse peut être expliquée par le fait que la présence de résidus dans le milieu cause une diminution de l'activité des enzymes intervenant dans la production de biomasse (Sarshvili et Panasyuk, 1995). De même, une inhibition de la biosynthèse de stérol peut également être provoquée par la présence de ces résidus: les stérols étant des constituants importants de la membrane cytoplasmique qui contrôle les échanges entre les cellules et le milieu.

1. Les résultats obtenus sur la **figure 20** confirment ceux obtenus sur la **figure 19** (dénombrement sur milieu solide).

En effet la réponse de *Saccharomyces cerevisiae* dès les plus faibles concentrations de notre insecticide (téfluthrine), nous montre à quel point notre substance chimique est toxique. Nous sommes parvenus à déterminer la concentration inhibitrice 50% (**figure 19**) provoquant l'inhibition de la moitié de la biomasse à l'aide d'un logiciel statistique (BioStat 2008) par la méthode de Finney. Cette valeur est comprise entre les concentrations (C_2) et (C_3) qui correspond à $0,88\mu\text{g/ml}$ avec les erreurs standards et un intervalle de confiance de 95 %. Cette partie confirme les travaux de Boufalbi et Bougueffa (2008) concernant la réponse des daphnies à une substance xénobiotique et ceux de Gisèle (2001) concernant l'Influence des pesticides sur les levures de fermentation vinicole et cidricole.

2. Concernant la **figure 21**, le dosage des protéines est effectué pour mettre en évidence une réponse des cellules en présence de la téfluthrine. La cellule *Saccharomyces cerevisiae* étant confronté à une substance toxique, verra donc son taux de protéine augmenté en fonction de la concentration du téfluthrine.

Le dosage des protéines a également prouvé qu'en état de stress, la cellule synthétise des protéines qui réagissent au peroxyde d'Hydrogène en activant la transcription de la catalase, la thioredoxine et la peroxyredoxine. (Jerome, 2009). Ce résultat est en parfait accord avec ceux rapportés par (Vido et al., 2001) où en effet le traitement avec le pesticide (thiamethoxame) provoque une augmentation des protéines totales chez *S. cerevisiae*.

3. L'augmentation de l'activité catalase (**figure 22**) chez *saccharomyces cerevisiae* nous montre quant à elle les mécanismes de défenses que la cellule met en place pour résister à son environnement toxique. En effet la catalase existe chez tous les organismes aérobies chez lesquels elle participe, comme la peroxydase, à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène.

Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (lorsqu'il est présent en quantité importante dans la cellule) en eau et oxygène.

Les données de toxicité aiguë disponibles indiquent que la téfluthrine est faiblement à légèrement toxique par les voies d'exposition orale, cutanée ou par inhalation. Lorsque les règles d'utilisation sont respectées, il devrait y avoir peu de risque d'intoxication aiguë à cet insecticide. Or, il apparaît important que ces règles soient connues de la population qui utilise souvent les pesticides sans se soucier de leur exposition. Même quand ce sont des professionnels qui effectuent les tâches de contrôle antiparasitaire, il n'est pas rare de voir de jeunes enfants jouer sur les terrains peu de temps après l'application des produits d'une part et le non respect du mode d'emploi tel qu'indiqué sur l'étiquette qui engendre une forte exposition de ces derniers et une présence importante dans les aliments d'autre part.

Il serait imprudent d'exclure des effets potentiels de la téfluthrine sur le développement de la progéniture tant qu'une nouvelle étude multi-générationnelle sur la reproduction des rats n'aura pas été réalisée. Cette étude devrait également permettre de répondre aux préoccupations concernant une potentielle perturbation endocrinienne.

Malgré les efforts pour développer des méthodes alternatives, les pesticides sont toujours le moyen de lutte prédominant et leurs résidus constituent une menace potentielle (Tsakiris *et al.*, 2002). Il est donc pertinent que les pesticides soient examinés pour leur toxicité diverse.

Les études concernant les toxicités des pesticides exploitent des systèmes expérimentaux divers, notamment le système levurien considéré actuellement parmi les modèles cellulaires de base en expérimentation toxicologique (Ahlers *et al.*, 1991).

La dégradation des xénobiotiques par les mycètes est largement étudiée car elle possède non seulement une signification toxicologique, mais aussi environnementale. En effet, à part les études de toxicités, de nombreuses recherches se sont occupées du métabolisme des xénobiotiques chez les levures dans le cadre de la dépollution par les microorganismes, et ces études étaient parfois décourageantes à cause de la toxicité et la réactivité des produits de dégradation obtenus (Cerniglia, 1984).

Cette étude représente une contribution importante à l'évaluation correcte de l'ampleur du risque sanitaire dû à l'exposition aux résidus de pesticides, et souligne la robustesse du système expérimental levurien comme modèle cellulaire pour la définition des bases cellulaires et moléculaires des toxicités.

Les tests réalisés sur *Saccharomyces cerevisiae* ont porté fruits, car nous sommes parvenus aux résultats escomptés, à savoir : l'effet du pesticide (téfluthrine) sur la cinétique des levures.

Ce travail nous a permis non seulement d'évaluer l'état de nos connaissances mais aussi d'en comprendre l'approche biologique.

De ce constat, il nous semble indispensable d'adopter des mesures concernant les rejets et l'utilisation des pesticides dans l'environnement qui contribuent à assurer une sécurité optimale. Le risque encouru en cas d'accident et les conséquences qu'il en résulterait nous amène à dire qu'il vaut mieux s'orienter vers une politique de « **qualité de l'environnement** » pour être sûr que chacun se sente suffisamment responsable afin d'assurer une protection fiable de notre environnement.

PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude qui visait à identifier la toxicité des pesticides, plus particulièrement la téfluthrine, à l'aide d'un système expérimental levurien (*Saccharomyces cerevisiae*) et de confirmer ces résultats par un test du modèle cellulaire vis-à-vis de la substance toxique a été atteint.

La protection des ouvriers entrant en contact avec une culture après un traitement phytosanitaire passe par le respect des délais de réentrée établis sur la base de données de persistance et de toxicologie des produits et de la méthode d'application. Le port de gants et de vêtements longs s'avère d'autant plus indispensable que l'opérateur manipule des plants traités pendant une longue période.

Approfondir la surveillance de la qualité de l'environnement.

La sensibilisation des producteurs et des consommateurs des pesticides est un atout majeur.

La révision de l'homologation de l'utilisation de certains pesticides a grande échelle et surtout dans les endroits publics doit contribuer à la protection des gens les plus vulnérables (Femmes enceintes ou non et enfant).

L'approfondissement des connaissances dans le domaine de la science contribuera au développement des biopesticides et à la suppression des pesticides synthétiques.

Enfin cette étude nécessite d'être approfondie afin de faire une bonne biosurveillance de la santé de tous les écosystèmes, y compris celle de l'homme, et le maintien de la biodiversité dont l'importance n'est aujourd'hui méconnue de personne dans l'équilibre écologique.

Produced with Scantopdf

ANNEXE

Préparation du tampon phosphate à pH=7.4

- Préparer une solution (A) de Phosphate disodique en raison de 0.946g pour 100mL d'eau distillée et une autre solution (B) de Phosphate monopotassique en raison de 0.906g pour 100mL d'eau distillée
- Mélanger ensuite 80mL de solution A avec 20mL de solution B (Didier Pol, 1996).

Préparation de la gélose de Sabouraud

- Mettre en suspension dans 1 litre d'eau distillée 10g de polypeptone, 36.4g de glucose anhydre et 15g d'Agar agar
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes [8].

Préparation de la solution de Bradford :

- Bleu de Comassie G250 100mg
- Ethanol à 95%..... 50mL
- Acide phosphorique (H₃PO₄) à 85%..... 100mL
- H₂O..... QSP 1L

Agité pendant 2heures et conserver à +4°C à l'abri de la lumière.

Etude Statistique :

Modèle linéaire général : catalase en fonction de $\mu\text{moles/mn/mg}$ protéine

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
$\mu\text{moles/mn/mg}$ protéines	fixe	6	c1; c2; c3; c4; c5; témoin

Analyse de la variance pour catalase, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	SomCar							
	DL	SomCar	seq	ajust	CM	ajust	F	P
$\mu\text{moles/mn/mg}$ protéines	5	4,1663	4,1663	0,8333	3,74	0,017*		
Erreur	18	4,0136	4,0136	0,2230				
Total	23	8,1799						

S = 0,472208 R carré = 50,93 % R carré (ajust) = 37,30 %

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95,0%

protéines N Moyenne Groupement

c5 4 2,9 A

c4 4 2,7 A

c3 4 2,6 A B

c2 4 2,5 A B

c1 4 2,2 A B

témoin 4 1,6 B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

Modèle linéaire général : protéine en fonction de $\mu\text{g}/\text{mg}$

Facteur Type Niveaux Valeurs

$\mu\text{g}/\text{mg}$ fixe 6 c1; c2; c3; c4; c5; témoin

Analyse de la variance pour protéine, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

SomCar

Source	DL	SomCar séq	ajust	CM(ajust)	F	P
$\mu\text{g}/\text{mg}$	5	27,7509	27,7509	5,5502	170,54	0,000***
Error	14	0,5858	0,5858	0,0325		
Total	23	28,3367				

S = 0,180401 R carré = 97,93 % R carré (ajust) = 97,36 %

Observations aberrantes pour protéine

Valeurs

Valeur Valeur résiduelles

Observation protéine ajustée ErT ajust résiduelle normalisées

21 8,95000 8,58500 0,09020 0,36500 2,34 R

22 8,22000 8,58500 0,09020 -0,36500 -2,34 R

R indique une observation ayant des valeurs résiduelles normalisées importantes

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95,0%

$\mu\text{g}/\text{mg}$	N	Moyenne	Groupement
e5	4	8,6	A
e4	4	7,5	B
e3	4	6,8	C
e2	4	6,3	D
e1	4	5,7	E
temoin	4	5,5	E

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

Produced with ScanTOPDF

- Abhauer J., 1990.** Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment, in Pesticide chemistry, VCH, New York, 361-372.
- Ahlers J., Cascorbi L., Forêt M., Gies A., Köhler M., Pauli W., Rösick E., 1991.** Interaction with functional membrane proteins – A common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1-2, 111-113.
- Aksu Z., 2005.** Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026.
- Arnaud A., and Guiraud J.-P., 1993.** Le métabolisme microbien, in *Biotechnologie*, 4^{ème} édition, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 59-180.
- Blom J., De Matos, M. J. T., and Grivell L. A., 2000.** Redirection of the respiratory flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpressing of the transcriptional factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(5)**: 1970-1973.
- Bonaly R., 1991.** Ultrastructure des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170.
- Botton B., 1991.** La physiologie des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170.
- Buchenauer H., 1987.** Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, in *Modern selective fungicides*, Longman scientific & technical, New York, 205-232.
- Charpentier C., 1993.** Les arrêts de fermentation : rôle de l'éthanol, résistance de la levure. *Revue française d'oenologie*, 140, 49-52.
- Crabtree H. G., 1929.** Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem.J.* **23**: 536-545.
- Cerniglia C. E., 1984.** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Advances in applied microbiology*, 30, 31-71.
- Dalal J., 2006.** Etude de la toxicité de pesticide vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de doctorat. L'institut National Polytechnique de Toulouse, 12, 22, 110 p.
- Delia-Dupuy M.L., and Strehaiano P., 1996.** La fermentation alcoolique en vinification : observations cinétiques et physiologie. *Revue française d'oenologie*, 159, 19-23.
- Didier P., 1996.** Travaux pratiques de Biologie des levures, édition : Ellipses, Paris.
- Doignon F., Aigle M., Ribereau-Gayon P., 1993.** Resistance to Imidazoles and Triazoles in *Saccharomyces cerevisiae* as a New Dominant Marker. *Plasmid*, 30, 3, 224-233.

- Flikweert M. T., van der Zanden L., Janssen W. M. T. M., de Steensma H. Y., van Dijken J. P., and Pronk J. T., 1996.** Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*. **12**: 247-257.
- Freire-Picos M. A., Hollenberg C. R., Breunig K. D., Cerdan M. E., 1995.** Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces fragilis*. *FEBS Letters*, **360**, 39-42.
- Gisèle C., 2001.** Influence des pesticides sur les levures de fermentation vinicole et cidricole. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies. Université Libanaise, **59**, 78 p.
- Goin C. J., and Mayer V. W., 1995.** Induction of chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. *Mutation Research*, **343**, 185-199.
- Gombert A. K., dos Santos M. M., Christensen B., and Nielsen J., 2001.** Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* **183** : 1441-1451.
- Hargreaves J. A., Keon J. P. R., Croxen R., 1996.** Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, in *Modern fungicides and antifungal compounds*, Intercept, U.K., 117-125.
- Lal S., and Lal R., 1987.** Bioaccumulation, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **16**, 753-757.
- Leveau J-Y., Bouix M., 1993.** *Microbiologie industrielle*, édition : Lavoisier, Paris.
- Magasanik B., 1961.** Catabolite repression. *Symposium Biol.* **26**: 249-256.
- Martínez P., Valcarcel M. J., Pérez L., Benitez T., 1998.** Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *American Journal of enology and viticulture*, **49**, 3, 240-250.
- Mouret J., 2006.** Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 175 p.
- Marlène C., 2006.** Etudes physiologiques de l'adaptation et de la résistance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la production intensive d'éthanol. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 265 p.

- Magdolen V., Oechsner U., Trömmel P., Bandlow W., 1990.** Transcriptional control by galactose of a yeast gene encoding a protein homologous to mammalian aldo/keto reductases. *Gene*, 90, 1, 105-114.
- Morace G., Sanguinetti M., Posteraro B., Lo Cascio G., Fadda G., 1997.** Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 667-672.
- ORE - Comité Régional de l'Environnement - Qualité des ressources en eau et production d'eau potable. La situation en Poitou-Charentes. Tome I. 2002.**
- Pronk J.T., de Steensma H.Y., Van Dijken j.p., 1996.** Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Sohn H. Y., Kwon C. S., Kwon G. S., Lee J. B., Kim E., 2004.** Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters*, 151, 357-365.
- SYNGENTA., 2008.** Fiche de Données de Sécurité – FORCE 1.5 G.
- Thuriaux P., 2004.** Les organismes modèles la levure, édition : Belin, Paris.
- Tsakiris I. N., Toutoudaki M., Nikitovic D. P., Danis T. G., Stratis I. A., Tsatsakis A. M., 2002.** Field study for degradation of methyl parathion in apples cultivated with integrated pest management system. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 69, 6, 771-778.
- Urban D. J., and Cook N. J., 1986.** Standard evaluation procedure: ecological risk assessment. EPA 540/9-95-001. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., 102 p.
- Wang X., Yin C., Wang L., 2002.** Structure-activity relationships and response-surface analysis of nitroaromatics toxicity to the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Chemosphere*, 46, 1045-1051.
- Watanabe-Akanuma M., Ohta T., Sasaki Y. F., 2005.** A novel genotoxic aspect of thiabendazole as a photomutagen in bacteria and cultured human cells. *Toxicology Letters*, 158, 3, 213-219.

Internet: Sites web

[1]: biologie. [En ligne]. [Consulté le 28 décembre 2010]. Disponible sur :

www.biologie.univ-mrs.fr/upload/p235/UElevurepart1.pdf .PDF

[2]: Clermont. [En ligne]. [Consulté le 17 mars 2011]. Disponible sur :

[http://www.univ-bpclermont.fr/FORMATIONS/Licence/chimie/UE/36BIOF22/II%20\)%20Ia%20levure%20Saccharomyces%20cerevisiae.pdf](http://www.univ-bpclermont.fr/FORMATIONS/Licence/chimie/UE/36BIOF22/II%20)%20Ia%20levure%20Saccharomyces%20cerevisiae.pdf)

[3]: didel. [En ligne]. [Consulté le 15 avril 2011]. Disponible sur :

<http://didel.script.univ-paris-diderot.fr/claroline/backends/download.php?url=L0dGTU9NLWxldnVyZS0xQS5wZGY%3D&cidReset=true&cidReq=33GF3116>

[4]: ingdz. [En ligne]. [Consulté le 27 avril 2011]. Disponible sur :

www.ingdz.com/vb/archive/.../t-61330.html

[5]: ethesis. [En ligne]. [Consulté le 5 mai 2011]. Disponible sur :

<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000329/01/jawich.pdf>

[6]: wikipedia. [En ligne]. [Consulté le 5 mai 2011]. Disponible sur :

http://fr.wikipedia.org/wiki/pesticides_santé

[7]: danger. [En ligne]. [Consulté le 11 mai 2011]. Disponible sur :

<http://www.danger-sante.org/effets-des-pesticides>

[8]: biokar. [En ligne]. [Consulté le 15 mai 2011]. Disponible sur :

<http://www.biokar-diagnostics.fr>

[9] : vwr. [En ligne]. [Consulté le 15 mai 2011]. Disponible sur :

http://fr.vwr.com/tedis/fr_FR/img/4/1.0410.0001.JPG

[10] : pdbbnl. [En ligne]. [Consulté le 17 Mai 2011]. Disponible sur :

<http://www.pdb.bnl.gov/scop/data/scop.1.000.html>

[11] : Surcov. [En ligne]. [Consulté le 17 Mai 2011]. Disponible sur :

www.surcov.fr

RESUME

Afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des pesticides utilisés dans les traitements phytosanitaires et leur persistance dans le sol, qui génèrent un risque pour la santé et l'environnement, nous avons utilisé la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) considéré actuellement parmi les modèles cellulaires de base en expérimentation toxicologique.

Une approche biologique a été élaborée pour l'évaluation de l'impact généré par le pesticide (téfluthrine). Des perturbations ont été enregistrées au cours de l'évolution du cycle de reproduction à travers certains paramètres (biomasse, métabolisme et activité enzymatique,...). Les tests menés sur *Saccharomyces cerevisiae* au laboratoire ont montré des variations au niveau des paramètres cités ci-dessus.

Ces résultats nécessitent d'être vérifiés par des études complémentaires. Le scénario présenté conduit à une évaluation semi quantitative des risques.

Il doit être amélioré sur certains aspects, particulièrement ceux concernant d'autres biomarqueurs prédictifs.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, téfluthrine, toxicité, catalase, bioindicateur

Produced with ScanTopdf

Summary

To better understand the mechanisms of toxicity of pesticides used in the treatment of plant and its persistence in soil, which generate a risk to health and the environment, we used the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered among current models of cell Basic toxicological testing.

A biological approach was developed to assess the impact generated by the pesticide (tefluthrin). Disturbances were recorded during the evolution of the reproductive cycle through certain parameters (biomass, metabolism and enzymatic activity,...). Tests conducted in *Saccharomyces cerevisiae* in the laboratory have shown variations in the parameters mentioned above.

These results must be verified by further studies. The scenario leads to a semi quantitative risk assessment.

It must be improved in certain aspects, particularly those for other biomarkers.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, tefluthrin, toxicity, catalase, bioindicator

Produced with Scantopdf

موجز

إلى فهم أفضل للآليات سمية المبيدات المستخدمة في محطة المعالجة وبيئاتها في التربة، التي تولد مخاطر على الصحة والبيئة ، واستخدمنا الخميرة (خميرة الخباز) يعتبر من بين النماذج الحالية من الخلايا الأساسية اختبار السمية. وقد تم وضع نهج البيولوجية لتقييم الأثر التي تم إنشاؤها بواسطة المبيدات (تيفلوثرين). وكانت الاضطرابات التي سجلت خلال تطور دورة الإنجابية من خلال معايير معينة (الكتلة الحيوية، والتمثيل الغذائي والنشاط الأنزيمي...). وقد أظهرت التجارب التي أجريت في خميرة الخباز في المختبر تغيرات في بارامترات المذكورة اعلاه. يجب التحقق من هذه النتائج من خلال مزيد من الدراسات. السيناريو يؤدي إلى تقييم المخاطر الكمية نصف النهائي. يجب أن يحسن في بعض الجوانب، لا سيما تلك المتعلقة بالمؤشرات الحيوية الأخرى.

bioindicator كلمات البحث : خميرة الخباز، تيفلوثرين، سمية، الكاتالاز،

Produced with Scantopdf