



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

Université Badji Mokhtar Annaba
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en
Ecologie Animale
Option : Physiologie de la reproduction

Thème

**Etude des effets d'un pesticide carbamate sur le système de
défense antioxydant et sur le comportement de
Gambusia affinis (Poisson, Téléostéen) au cours du cycle
reproducteur.**

***Présenté par* : BOUZERAA Nawel**

Jury :

Directeur de mémoire : M^r. BENSOUILAH M. (Pr) Université d'ANNABA

Président : M^r. SOLTANI N.....Professeur Université d'ANNABA

Examineur : M^r. OUALI Kh.....Maître de conférence Université d'ANNABA

Examineur : M^r. BOUDJELIDA A.....Maître de conférence Université d'ANNABA

Année Universitaire 2009-2010

Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu qui m'a donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma vive gratitude à tous les membres de jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

*A monsieur **Soltani.N** pour son amabilité, son esprit scientifique et pour avoir accepté de présider ce jury.*

*A monsieur **Bensouilah M** pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et a mis a ma disposition tous le matériel nécessaire a la réalisation de ce travail.*

*A monsieur **Boudjelida A** pour sa gentillesse, ses précieux conseils et pour avoir pris de son temps afin d'examiner ce travail.*

*Je tiens à remercier monsieur **Ouali KH** pour la conception de ce thème, pour sa gentillesse, sa générosité, ses précieuses orientations et sa disponibilité malgré ses multiples tâches.*

*Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à M^{me} **Roquia** pour l'aide qu'elle m'a accordée tout au long de notre travail.*

Dédicaces

A ceux qui m'ont toujours entourée d'amour et de tendresse.

A ceux qui m'ont apporté aide et assistance afin que je puisse réussir dans ma vie.

A ceux qui sont pour moi le symbole de la force et de l'assistance.

A ceux qui ont supporté mes caprices et m'ont permis de vivre dans un milieu riche en connaissances, m'ont appris à aimer la science et à connaître le sens de la fierté.

A mes très chers parents « Papa et Maman », que Dieu les gardes et les protèges.

A mes très chers frères : Samir et lotfi.

A mes adorables sœurs : Hayette et Hanane.

A mon époux: Samir

A mon cher et adorable fils : Racym

Nawel

TABLE DES MATIERES

I. Introduction.....	1
II. Matériel et Méthodes.....	5
1. Présentation du matériel biologique.....	5
1.1. Intérêt de l'espèce.....	5
1.2. Position systématique.....	5
1.3. Morphologie de l'espèce.....	5
1.4 Comportement et reproduction.....	7
1.5 Ecologie.....	8
2. Présentation du xénobiotique.....	8
2.1 Caractéristiques physicochimiques.....	8
2.2 Intérêt de la molécule.....	8
3. Enceinte d'élevage.....	9
4. Collecte des poissons.....	10
5. Dispositif expérimental et mode de traitement	10
5.1 Dispositif expérimental.....	10
5.2 Mode de traitement.....	11
6. Pesée et mensuration biométrique.....	11
7. Dissection et prélèvement des organes.....	14
8. Dosage des biomarqueurs.....	14
8.1. Préparation des prélèvements et de l'homogénat.....	14
8.2. Dosage des protéines.....	15
8.3. Dosage de glutathion (GSH).....	15
8.3.1. Principe.....	15
8.3.2. Mode opératoire.....	15
8.3.3. Calcul de la concentration	16
8.4. Dosage de glutathion S transférase (GST).....	16
8.4.1. Principe.....	16
8.4.2. Mode opératoire.....	16
8.4.3. Calcul de l'activité de la GST.....	17
8.5. Dosage de la catalase (CAT).....	17
8.5.1. Principe.....	17
8.5.2. Mode opératoire.....	17
8.5.3. Calcul de l'activité de la CAT.....	18
8.6. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).....	18
8.6.1. Principe.....	18
8.6.2. Mode opératoire.....	19
8.6.3. Calcul de l'activité de l'AChE	19

9. Etude histologique des ovaires.....	19
9.1 Fixation du matériel.....	19
9.2. Déshydratation.....	20
9.3. Inclusion.....	20
9.4. Coupe et coloration.....	20
10. Etude du comportement de la nage.....	21
10.1 Mesure comportementale	21
10.2 Mesure neurochimique	21
11. Analyse statistique.....	22
III. Résultats.....	23
1. Effets sur la concentration des protéines hépatopancréatiques.....	23
1.1 Réalisation de la courbe d'étalonnage.....	23
1.2 Dosage des protéines hépatopancréatiques.....	24
2. Effet du carbofuran sur la variation des biomarqueurs chez les femelles.....	25
2.1. Effets sur la teneur du GSH hépatopancréatique.....	25
2.2. Effet du Carbofuran sur l'activité de la GST dans l'hépatopancréas.....	26
2.3. Effet du Carbofuran sur l'activité de la CAT dans l'hépatopancréas.....	27
2.4. Effet du Carbofuran sur l'activité de l'AchE cérébrale.....	28
3.Effet du carbofuran sur la croissance des alevins.....	29
4. Analyse des biomarqueurs chez les alevins	30
4.1. Variation de la teneur en GSH.....	30
4.2 Variation de l'activité de la GST.....	31
4.3. Variation de l'activité de la catalase.....	32
5. Analyse histologique des ovaires.....	33
6. Effet du carbofuran sur le comportement de la nage des femelles.....	35
6.1. Réponse comportementale au carbofuran.....	35
6.2. Effet neurochimique du carbofuran.....	36
IV. Discussion.....	37
V. Conclusion et perspectives.....	47
VI. Résumés.....	48
Références Bibliographiques.....	52

Liste des Tableaux

Tableaux	Titres	Pages
1	Caractéristiques physicochimiques du Carbofuran	9
2	Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines	15
3	Dosage des protéines : réalisation de la gamme d'étalonnage.	23
4	Concentration des protéines en μg hépatopancréatiques chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	24
5	Teneur du GSH hépatopancréatique en nmol/mg protéine chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4DL ₅₀).	25
6	Activité de la GST en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4DL ₅₀).	26
7	Activité de la CAT en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	27
8	Activité de la AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	28
9	Variation de la taille des alevins <i>G.affinis</i> témoins et traités à 1/4 DL ₅₀ de carbofuran	29
10	Variation du poids absolu des alevins <i>G.affinis</i> témoins et traités par le carbofuran à 1/4 DL ₅₀	30
11	Teneur du GSH en nmol/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL ₅₀).	30
12	Activité de la GST en μmol thioéther formé/min/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (¼ DL ₅₀).	31
13	Activité de la catalase en μmol H ₂ O ₂ métabolisé/min/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL ₅₀).	32
14	Activité de déplacement des femelles <i>Gambusia affins</i> après 2, 4 et 6h d'exposition au Carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀). Chaque point est la moyenne $\pm$ erreur type de 5 observations.	35
15	Activité de la AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀) pendant une exposition de 6 heures.	36

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
1	Famille des Poecilidés (<i>Gambusia affinis</i>)	6
2	Présentation du Dimorphisme sexuel de la gambusie	6
3	Cycle Vital de la gambusie à 25°	7
4	Site de prélèvement de <i>Gambusia affinis</i> (Oued Boularoug El-Kala)	10
5 (a)	Techniques expérimentales <i>Gambusia affinis</i> (Femelle)	12
5 (b)	Techniques expérimentales <i>Gambusia affinis</i> (Alevins)	13
6	Dissection de la femelle <i>Gambusia affinis</i>	14
7	Dispositif expérimental. Aquarium d'observation.	21
8	Dosage des protéines : droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de BSA (µg). (R^2 : coefficient de détermination).	23
9	Concentration des protéines en µg hépatopancréatiques chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	24
10	Teneur du GSH hépatopancréatique en nmol/mg protéine chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	25
11	Activité de la GST en µm/min/mg chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	26
12	Activité de la CAT en µm/min/mg chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	27
13	Activité de la AchE en µm/min/mg chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀).	28
14	Variation de la taille des alevins <i>G.affinis</i> témoins et traités à 1/4 DL ₅₀ de carbofuran	29
15	Variation du poids absolu des alevins <i>G.affinis</i> témoins et traités par le carbofuran à 1/4 DL ₅₀	30
16	. Teneur du GSH en nmol/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL ₅₀).	31
17	Activité de la GST en µmol thioéther formé/min/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL ₅₀).	32
18	Activité de la catalase en µmol H ₂ O ₂ métabolisé/min/mg protéine chez les alevins <i>Gambusia affinis</i> traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL ₅₀).	33
19	Coupes histologiques	34
20	Activité de déplacement des femelles <i>Gambusia affinis</i> après 2, 4 et 6h d'exposition au Carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀). Chaque point est la moyenne ± erreur type de 5 observations.	35
21	Activité de la AchE en µm/min/mg chez <i>Gambusia affinis</i> traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL ₅₀) pendant une exposition de 6 heures.	36

I. Introduction

Pendant longtemps les hommes se sont peu préoccupés de leur milieu naturel, s'ingérant dans la nature et usant d'elle sans compter, aménageant à tour de bras et rejetant largement effluents et déchets industriels, domestiques et agricoles dont la diversité et la quantité ne cesse de s'amplifier avec une urbanisation en croissance exponentielle. Le constat est aujourd'hui plus inquiétant, des régions entières sont dévastées et nombre de cours d'eau, lacs et nappes souterraines sont altérés de par le monde : une pollution que la nature a du mal à résorber.

L'utilisation abusive en agriculture intensive, des engrais chimiques et des pesticides est à l'origine de la situation dramatique des écosystèmes aquatiques particulièrement. Les substances évacuées dans les eaux usées par les industries, émises dans l'atmosphère ou répandues sur les sols sous forme de gaz, de substances dissoutes ou de particules, finissent pour la plupart par rejoindre les milieux aquatiques où elles ont tendance à s'accumuler en mince couche à la surface de l'eau. La fugacité, le maintien et la permanence à des concentrations diverses des molécules toxiques sont fonction de la rémanence du produit (Hurtig, 1972). Ces états peuvent provoquer dans le temps des fluctuations plus ou moins grandes des caractères physico-chimiques de l'eau, élément dont dépendent d'une façon extrêmement étroite les êtres vivants à respiration aquatique (Arrignon, 1998).

Ces composés ingérés par les organismes marins vont s'accumuler dans les différents tissus du consommateur (foie, os, graisse, muscles), entraînant en plus des différents troubles graves, la mort de l'individu et une bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire. Ainsi, les travaux de Buet *et al.*, (1998, 2001) ; Roche *et al.*, (2000, 2001), ont mis en évidence chez les poissons, la présence de concentrations notables d'insecticides organochlorés (O.C.), d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (H.A.P.) et de ChloroBiphényles (P.C.B.).

L'exposition répétée à la présence de certains polluants ou leur bioaccumulation peut avoir des conséquences sur la croissance, le développement et la reproduction des organismes marins. Cette situation résulte du fait que des composés chimiques qualifiés de perturbateurs endocriniens (Tiler *et al.*, 1999, Lyons, 1999) dont les carbamates, peuvent se fixer sur les récepteurs d'hormones dans la cellule et se comporter comme des hormones à activité œstrogène ou antiandrogène.

Leurs effets sublétaux se traduisent par des réponses hiérarchisées selon le type de perturbation, sa chronocité ou son intensité et le niveau d'organisation biologique de l'espèce

concernée. Ainsi la réponse primaire est endocrinienne, elle se concrétise par la libération des catécholamines dans le pool sanguin et la production de l'hormone corticostéroïde (Kumschembel et Lackner, 1993). La réponse secondaire associe les effets métaboliques des catécholamines et du cortisol aux prestations osmotiques et ioniques et aux effets hématologiques (Roche et Broge, 1996). Quant à la réponse tertiaire, elle est plus préoccupante, ses conséquences sont de nature démoécologique qui conduisent souvent à terme, au travers d'un ralentissement de la croissance et d'une discrète réduction du potentiel biotique, à un déclin des populations (Jobbling, 1995).

John et Mac Crean (1992) ont pu répertorier diverses pathologies chez différentes espèces aquatiques parmi lesquelles, les malformations et la mortalité accrue chez les alevins, embryons déformés et mortalité chez la tortue d'eau douce, stérilité, perturbation du système immunitaire et problèmes de développement chez les phoques, diminution du niveau d'hormone chez les baleines.

Le problème est suffisamment sérieux pour que les scientifiques du monde entier mettent en place un programme de surveillance de ces perturbateurs (Wright et Nebel, 2002).

De nombreux travaux ont été réalisés à cet effet sur le carbofuran (2,3-dihydro-2,2-diméthyl-benzofuran-7-diméthylcarbamate), un carbamate utilisé couramment en agriculture comme insecticide (Gupta, 1994). Certains chercheurs ont rapporté son extrême toxicité sur le poisson (Trotter *et al.* 1991). Il est connu comme producteur de l'activité hypercholinergique aussi bien du système central que périphérique (Gupta et Kabal, 1989 ; Yadav *et al.*, 1998) par inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme des synapses des brins et des jonctions neuromusculaires (Yadav *et al.*, 1998 ; Sing et Sharma, 1999).

Bhakt, (1998) ; Sing et Sharma, (1998) ont étudié l'effet du carbofuran sur la lactate déshydrogénase et le métabolisme des protéines. Quant à Bretau *et al.*, (2000) et Osten *et al.*, (2005), ils ont travaillé sur son impact sur la biochimie, le comportement et l'acétylcholinestérase du cerveau respectivement chez *Carassius auratus* et *Gambusia yucatama*. Begum et Vijavara, (2001) et Begum, (2004) ont étudié l'effet du carbofuran sur les lipides et les acides gras libres des différents tissus de *Clarias batrachus*.

Les recherches en écotoxicologie aquatique concernent le développement du concept de biosurveillance des écosystèmes. Actuellement les gestionnaires de l'environnement et les scientifiques envisagent un contrôle strict de l'utilisation des ressources naturelles, telle que l'eau qui tient compte du respect de l'ensemble des communautés vivant dans les écosystèmes

aquatiques. Pour atteindre un tel objectif une gestion adaptée et pertinente doit reposer sur des outils d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes mis à mal par le transfert et l'accumulation dans l'environnement des produits de l'activité humaine.

L'analyse chimique qui mesure les concentrations en produits toxiques dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique (Narbonne, 1998). Une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales ou végétales exposées aux polluants (Leveque, 1997), et ne peut à elle seule prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants (Dutka, 1998) ; De ce fait le gestionnaire manque d'information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes (Lascombe, 1997), ou protéger leur biodiversité et leur intégrité (Leveque, 1997 ; Flammarion *et al.*, 2000). Dans ce contexte, le suivi de la perturbation des cibles biologiques peut pallier cette difficulté et les variables biologiques sont un complément indispensable aux mesures chimiques utilisées au sein d'un programme de surveillance et d'alerte (Lascombe, 1997). La mesure de variables biologiques est désormais susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification (Leveque, 1997). En cela, elles viennent en complément des mesures traditionnelles de bioindication. C'est ainsi que les chercheurs se sont intéressés au développement des biomarqueurs qui traduisent l'interaction entre le système biologique et l'agent environnemental par un changement observable ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, physiologique, histologique ou même comportemental révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Amiard *et al.*, 1998). L'inhibition ou l'induction des biomarqueurs est un bon indicateur de la qualité du milieu pour connaître l'exposition et l'effet potentiel du xénobiotique sur les organismes (Dembale *et al.*, 1999 ; Ozmen *et al.*, 1999 ; McLoughlin *et al.*, 2000 ; Sturn *et al.*, 2000 ; Varo *et al.*, 2001).

Les organismes testés utilisés à cet effet sont des bioindicateurs, êtres vivants, animaux ou végétaux susceptibles de refléter la qualité du milieu de vie. *Gambusia affinis*, un poeciliidae rustique, d'élevage facile, constitue l'un des poissons le plus utilisé au laboratoire (Adraim, 1993). Il est le modèle biologique le plus précieux pour les toxicologues chargés de suivre le devenir et d'évaluer les effets immédiats et différés des substances étrangères dans les écosystèmes aquatiques (Goodsell et Kats, 1999).

De nombreux chercheurs l'ont utilisé dans des travaux réalisés sur le plan cytologique (Russo *et al.*, 1999), biologique (Nakamura *et al.*, 1998 ; Sepencer *et al.*, 1999 ; Koya et Kamia, 2000 ; Roya *et al.*, 2003), endocrinologique (Drysdal et Bortone, 1989 ; Bortone et David, 1994 ; Rosa-Moliner *et al.*, 1998 ; Tolar *et al.*, 2001 ; Park *et al.*, 2005), écologique et toxicologique (Orlando *et al.*, 2002 ; Sivagnaname et Kalyanasundaram, 2004).

En Algérie *Gambusia affinis* a fait l'objet de différentes études sur la physiologie et la reproduction. Ainsi Ouali (1997) a observé l'influence de quelques facteurs internes et externes sur les principales phases du cycle de reproduction, une étude sur l'écophysiologie de la reproduction a été réalisée par Drarja-Beldi (1993 et 2001) ; Tidjani (1997) a étudié la topographie et la structure des mécanorecepteurs. Des travaux réalisés sur la détermination de l'impact de quelques insecticides sur la reproduction et la croissance ont été réalisés par Aissaoui (1998), Soltani *et al.*, (1999), Bouzioukh (2000).

Dans ce contexte, ce travail s'inscrit dans une démarche de validation des effets toxiques d'un xénobiotique « le carbofuran » chez *Gambusia affinis*, un poisson larvivoire des milieux dulçaquicoles.

A cet effet nous avons privilégié une approche multibiomarqueurs en étudiant au sein de cet organisme, après son exposition à des conditions contrôlées, les variations de plusieurs paramètres biochimiques considérés comme biomarqueurs potentiels de pollution.

L'objectif de cette étude est principalement axé sur :

- L'évaluation de la nocivité du carbofuran sur la physiologie de la reproduction de *Gambusia affinis* notamment la phase de vitellogénèse et la croissance des alevins, par une exploration du système de défense antioxydant et un suivi histologique des gonades.
- L'étude du comportement du poisson vis-à-vis du polluant par l'appréciation de la corrélation entre l'activité de la nage et l'activité de l'acétylcholinestérase, un marqueur en puissance de la neurotoxicité.

II. Matériel et Méthodes

1. Présentation du matériel biologique

1.1 Intérêt de l'espèce :

Originaire des pays d'Amérique du Sud, *Gambusia affinis* est un petit poisson vivipare acclimaté en Algérie en 1928 pour servir dans la lutte biologique contre la prolifération des moustiques notamment les larves d'anophèles responsables du paludisme (O.M.S., 1977).

Le choix de cette espèce comme matériel biologique utilisé dans cette étude est motivé par :

- Son abondance dans les ruisseaux et les étangs de la région d'Annaba.
- Sa facilité d'élevage dans des aquariums grâce ses capacités (robustesse et rusticité) qui lui permettent de survivre et de s'adapter aux changements de pH et de température.

1.2 Position systématique

Embranchement	: Chordata
Classe	: Actinopterygii
Sous classe	: Neopterygii
Super ordre	: Acanthopterygii (Téléostéens)
Ordre	: Cyprinodontiformes
Famille	: Poeciliidae
Genre	: <i>Gambusia</i>
Espèce	: <i>affinis</i> (Baird et Girard, 1853)

1.3 Morphologie de l'espèce

Gambusia affinis (Fig.1), est un poisson appartenant à la grande famille des Poecilidés, comprenant dans le monde 30 genres et 293 espèces (Nelson, 1994). C'est un vivipare de petite taille variant de 2 à 6 cm, de couleur grise à bleuâtre, dos vert olive, flancs irisés et ventre blanc, la livrée est plus brillante chez le mâle que chez la femelle, la bouche dirigée vers le haut pour la capture des larves et des insectes dérivant à la surface de l'eau.

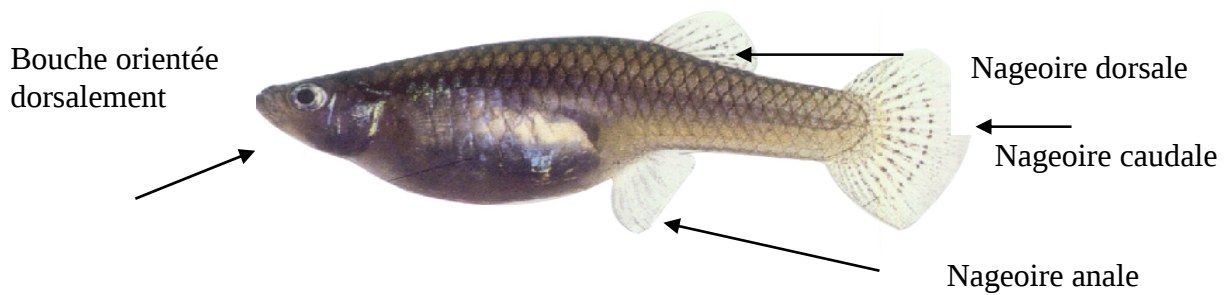
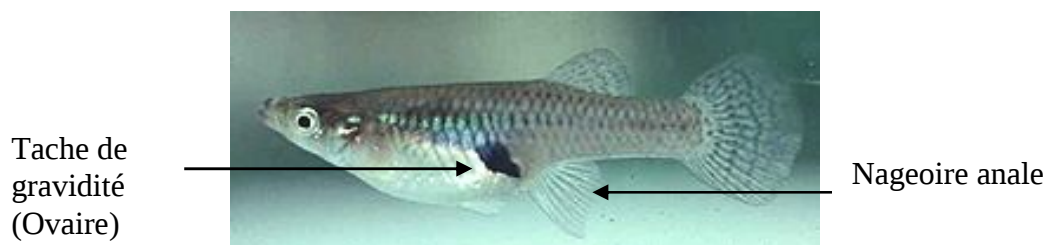


Figure 1 : *Gambusia affinis* (Famille des Poeciliidés) (Swanson

Gambusia affinis présente un dimorphisme sexuel se manifestant par une différence de taille très nette à l'état mature. La femelle peut atteindre jusqu'à 6 cm, son corps est trapu avec une tache sombre plus au moins étendue se trouvant du côté de la nageoire anale (Fig.2a), elle est plus nette au moment de la gestation et marque l'emplacement de l'ovaire unique qui est formé par les yeux des alevins qui transparaissent à travers la paroi ventrale (Pivincka et Cerny, 1996). Sa nageoire anale est ronde et transparente. Le mâle en revanche, à l'état de maturité est plus petit, il ne dépasse pas les 3,5 cm (Bentj et Dahalstrom, 1991), le corps allongé légèrement comprimé, les rayons de la nageoire anale forment une gouttière qui est l'organe copulateur dit gonopode (Fig.2b) assurant la fécondation interne des femelles grâce à des muscles associés permettant une grande mobilité (Jaques Bruslé *et al.*, 2002).



(a)-Femelle 2 à 6cm (x2)



(b)-Mâle

Figure 2 : Présentation du Dimorphisme sexuel de la gambusie (Swanson *et al.*, 1996).

1.3. Comportement et reproduction

Gambusia affinis est une espèce diurne qui fait appel à ses capacités visuelles pour son alimentation, sa sélection sexuelle et son évitement des prédateurs (Bruslé, 2001).

Extrêmement vorace elle consomme des crustacés, peut être prédatrice de ses alevins mais ce sont les larves des moustiques présentes à la surface de l'eau qui représentent son alimentation préférée (Sheldon et Meffe, 1993) d'où son nom mosquitofish.

Son cycle biologique (Fig.3) et ses diverses activités sont sous contrôle thermique. La température optimale se situe à 25C° (Swanson *et al.*, 1966). Après maturation des jeunes alevins, les femelles sont fécondées. Leur période de fécondation s'étale du mois de mars à septembre et leur fécondité tend à augmenter avec la taille mais diminue avec l'âge (Swanson *et al.*, 1966). Elles peuvent faire 4 à 5 gestations sans nouvelle insémination et ceci grâce à la chambre ovarienne qui se trouve au centre de l'ovaire et des replis qui assurent la longue survie des spermatozoïdes. La durée de ses cycles de gestations varie de 25 à 35 jours (Drardja-Beldi, 1993) ; celle du premier cycle dure plus longtemps (Tunner, 1937), elle est d'environ 35 jours selon Dreze *et al.*, 1998). Au moment de la gestation l'ovaire est plein d'alevins de taille homogène. Ces derniers quittent leur mère l'un après l'autre à des temps différents, alors que l'ovaire contient d'autres ovocytes déjà matures de la génération suivante (Chambole, 1973).

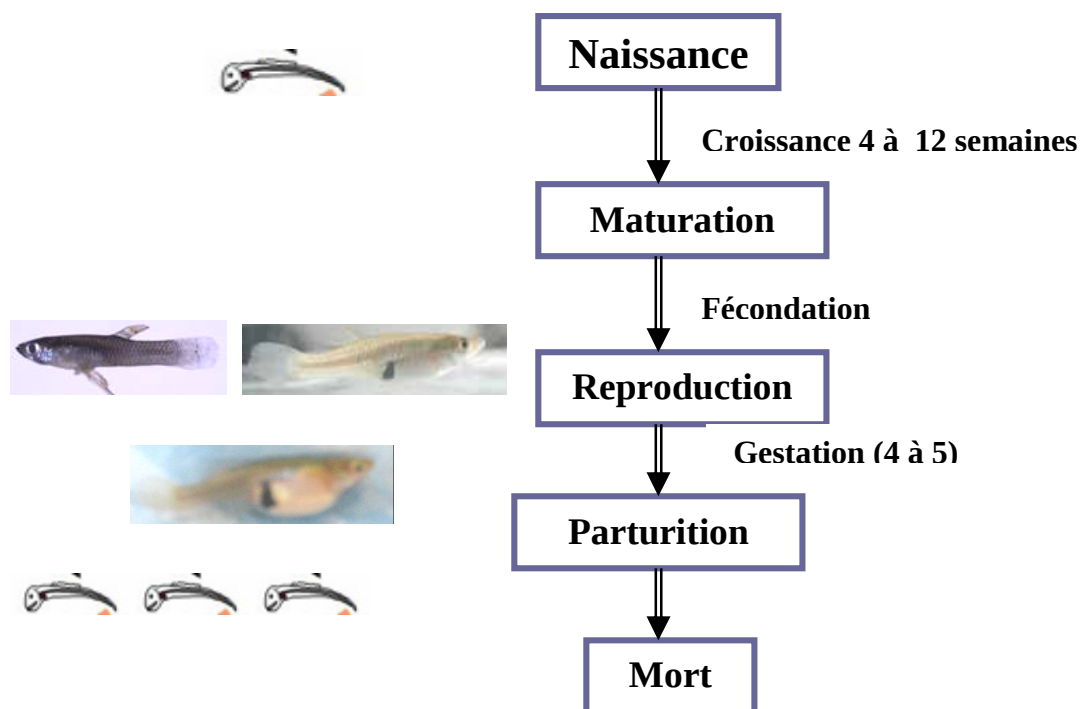


Figure 3 : Cycle Vital de la gambusie à 25° (Swanson *et al.*, 1966)

1.4. Ecologie :

Gambusia affinis est un petit poisson originaire de l'Est et du Sud des Etats-Unis. Compte tenu de sa robustesse, sa rusticité et sa facilité d'élevage il est très apprécié en aquariophilie.

On le trouve en abondance dans divers plans d'eau (Lac, Oued,...) et plus précisément dans les petits fonds et les ruisseaux (Drardja-Beldi, 1993). Son biotope est très intéressant car il est assez atypique pour cette espèce qui, dans son aire d'origine affectionne particulièrement les étangs d'eaux calmes, ensoleillées, de faible profondeur et de forte densité de végétation où elle se reproduit (Garcia-Berthou, 1993).

2. Présentation du xénobiotique

2.1 Caractères physicochimiques

Le Carbofuran dont les caractéristiques physicochimiques portés par le tableau (1), appartient à la grande famille des carbamates. C'est un produit cristallin, stable en milieu neutre ou acide, mais instable en milieu alcalin. Il se dégrade facilement lors d'une augmentation de température, changement de pH ou en présence des rayons solaires. Dans le sol sa mobilité est très élevée et dans l'eau il se dégrade par hydrolyse, photolyse ou par dégradation microbienne. Sa concentration peut être déterminée par :

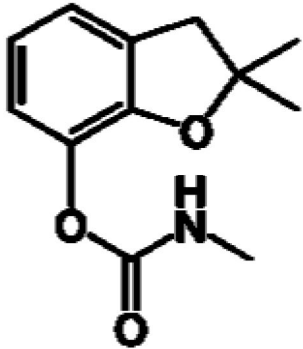
- chromatographie liquide à haute performance.
- hydrolyse de sodium.
- chromatographie sur phase gazeuse.

2.2. Intérêt de la molécule

Le carbofuran est une substance active utilisée comme insecticide et nématicide en agriculture pour lutter contre une grande variété d'insectes foliateurs et fousisseurs. Il est considéré comme un des pesticides utilisés le plus souvent de façon anarchique. On le trouve en forte concentration dans les régions agricoles, dans l'atmosphère et dans les cours d'eaux, où il est fréquemment détecté dans les eaux superficielles (Trotter *et al.*, 1991 ; Bushway *et al.*, 1992 ; Gutta, 1995).

Le Carbofuran peut être ingéré par voie orale ou par inhalation (Baron, 1991). Il est fortement toxique pour l'homme, la végétation et aussi pour les poissons (Trotter *et al.*, 1991), car il est connu pour altérer les fonctions neurologiques et surtout l'acétylcholinestérase sa cible privilégiée qui est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans la transmission des cholinergiques (Trotter *et al.*, 1991 ; Grue *et al.*, 1997 ; heath *et al.*, 1997).

Tableau 1 : caractéristiques physicochimiques du Carbofuran

Propriété physicochimique		Présentation de la molécule
Apparence	Cristaux incolores	 Carbofuran
Propriété chimique		
Formule brute	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	
Masse molaire	C 65,14 %, H 6,83 %, N 6,33 %, O 21,69 %	
Propriété physique		
<u>T° fusion</u>	153°C	
<u>T° ébullition</u>	Décomposition à 295°C	
<u>Solubilité</u>	Dans l'eau à 25°C : 0.7g/l	
<u>Masse volumique</u>	à 22 °C : 1,2 g·cm ³	
<u>Pression de vapeur saturante</u>		
Précautions	  T	
<u>Directive 67/548/EEC</u>		

(<http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Carbofuran.svg>).

3. Enceinte d'élevage

L'élevage des poissons a été réalisé dans des aquariums d'une capacité de 50 à 70 litres remplis d'eau du robinet préalablement exposée à l'air libre pendant 48 heures pour la débarrasser de l'hypochlorite de sodium qui peut causer des mortalités surtout chez les alevins. Afin de désinfecter l'eau, quelques gouttes de bleu de méthylène ont été ajoutées. *Gambusia affinis* est un poisson résistant surtout au changement thermique progressif (Vondreck, 1988) donc il n'est pas nécessaire de chauffer leur bac (Guv, 2002). Au fond des aquariums nous avons mis une couche mince de gravier soigneusement lavé qui servira à maintenir les déchets des poissons et le reste de l'alimentation en profondeur pour garder la netteté de l'eau. A cet égard nous avons équipé les aquariums de pompes filtrantes (ATMAN, AT-1000F) et une pompe à air (NIROX 5) munie d'un diffuseur d'oxygène.

Afin de précipiter la période de reproduction qui, dans le milieu naturel se déroule entre le printemps et l'été, nous avons augmenté la température de l'eau jusqu'à 26 °C. Cette

régulation thermique est obtenue à l'aide d'une résistance couplée à un thermostat. Les poissons sont alors nourris deux fois par jour par la TETRAMIN (préparation commercialisée à base de crevettes et de poissons déshydratés) et exposés pendant 12 à 13 heures à la lumière pour ne pas changer leur système naturel de photopériode.

4. Collecte des poissons

L'échantillonnage a été réalisé à oued Boularoug (Fig.4) qui prend sa source au Sud-Ouest du lac Oubeira (36°50 Nord et 8°23 Est) et se jette au Sud du lac El Mellah (36°53 Nord et 8°20 Est). La collecte a été effectuée à l'aide d'un filet de 0,40 mm de vide de maille. La capture des poissons a été meilleure en matinée (entre 8 et 11 heures), car en cette période les poissons montent en surface pour s'alimenter. Ces poissons sont alors transportés au laboratoire et mis dans des enceintes d'élevage.



Figure 4 : Site de prélèvement de *Gambusia affinis* (Oued Boularoug El-Kala)

5. Dispositif expérimentale et mode de traitement

5.1 Dispositif expérimental

Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé trois aquariums: un pour les témoins et les deux autres pour les traités. Chaque aquarium contient une trentaine de poissons (5 males, 25 femelles). Par la suite une dizaine de femelles est prélevée de chaque lot et en deux étapes :

-la première étape a eu lieu 15 jours après l'élévation de la température (phase de vitellogenèse).

-la deuxième étape après 45 jours. Lors de cette étape deux prélèvements ont été effectués (Fig. 5a): le premier concerne les femelles qui ont mis bas et le second leurs alevins qui sont séparés dans des pondoirs pour qu'ils ne soient pas dévorés par les adultes. Les femelles

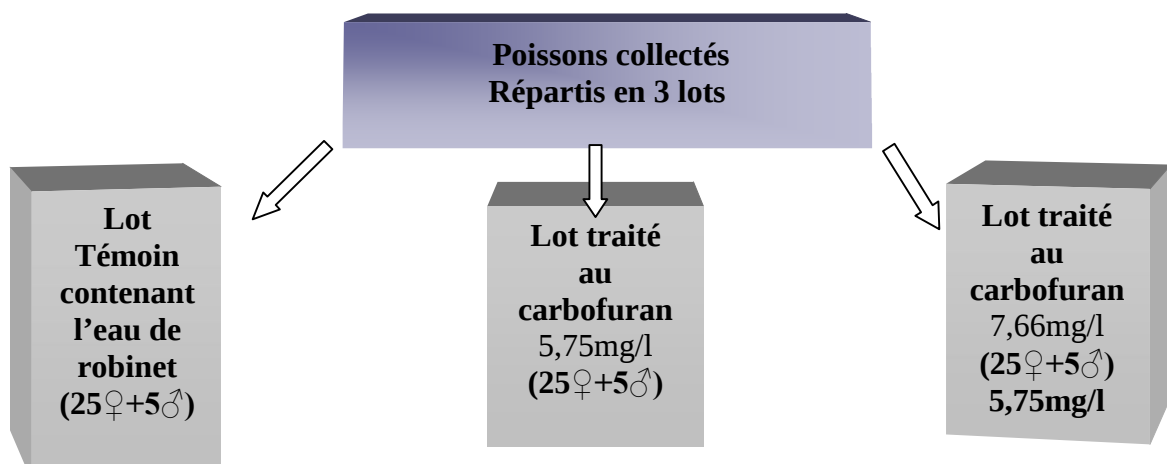
prélevées sont disséquées pour l'extraction de leurs organes (ovaire, hépatopancréas, SNC). Quant aux alevins, ils sont récupérés et mis dans des bacs (Fig. 5b) où ils poursuivent leur croissance dans les mêmes conditions que leurs mères.

5.2. Mode de traitement

Les femelles à traiter sont réparties en deux lots d'une trentaine de femelles chacun. Le 1^{er} lot et le 2^e lot reçoivent des doses respectives de carbofuran de l'ordre de 7,66 et 5,75 mg/l correspondant respectivement au 1/3 et au 1/4 de la DL_{50} . Les doses sont obtenues par mélange de la quantité requise de pesticide avec de l'eau physiologique. Une fois préparées, les doses sont versées dans l'eau contenant les différents lots de poissons destinés à être traités. Des prélèvements de femelles des différents lots sont réalisés après 15 jours de traitement et après la mise bas.

6. Pesées et mensurations biométriques

Ces paramètres ont été analysées seulement sur les alevins traités au 1/4 de la DL_{50} . Afin de suivre leur croissance, des prélèvements ont été effectués à partir du lot témoin et du lot traité à la dose indiquée. Après avoir pesé leur corps entier à l'aide d'une balance de précision SARTORIUS (1/10mg), les alevins sont étalés sur du papier millimétrique pour la détermination de leur longueur totale (Macer, 1977) qui est la distance entre l'extrémité de la nageoire caudale et l'extrémité du maxillaire. En attendant leur utilisation pour les dosages des biomarqueurs (Fig.5b), les corps entiers des alevins sont conservés dans des tubes à basse température.



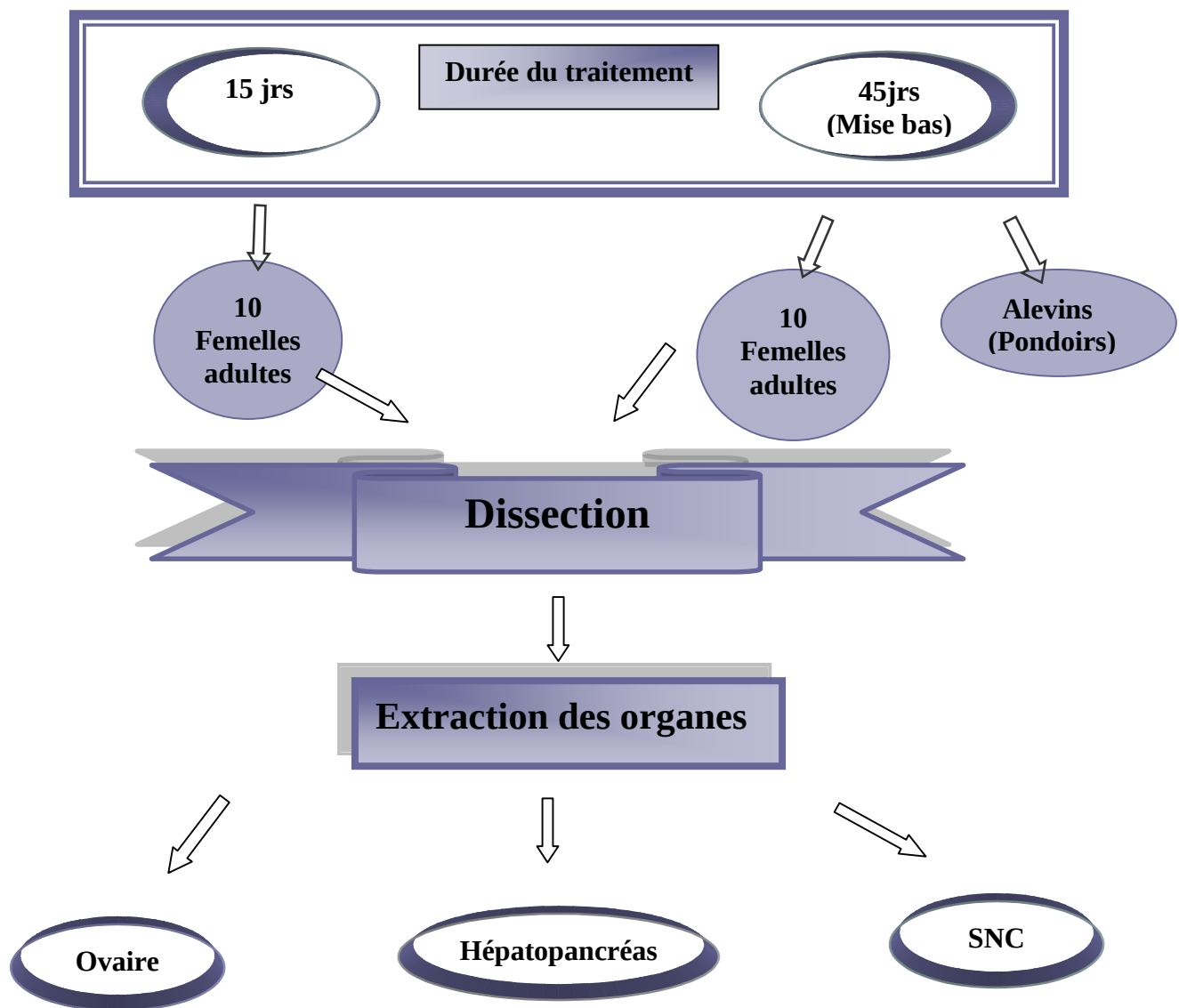
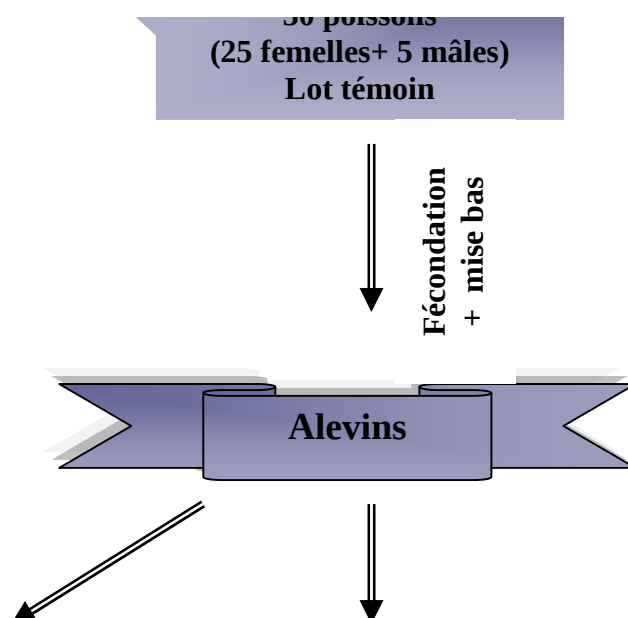


Figure 5 « a »: Techniques expérimentales *Gambusia affinis* (Femelles)



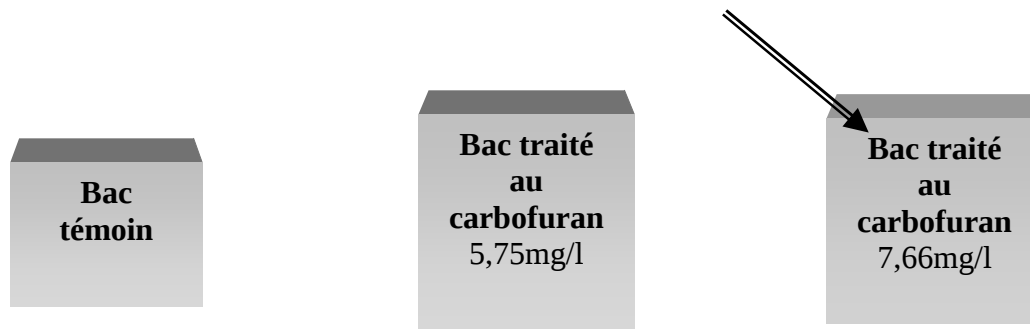


Figure 5 « b »: Techniques expérimentales *Gambusia affinis* (Alevins)

7. Dissection et prélèvement des organes

La dissection des poissons a été réalisée sous binoculaire à l'aide de microciseaux. Ainsi le poisson prélevé est fixé en position dorsale sur une plaque de paraffine à l'aide d'épingles par l'orifice buccal et l'opercule. **Figure 6 :** Mesure de la taille de la femelle *Gambusia affinis* (A : Extrémité caudale ; B : Extrémité maxillaire) (X3). L'ovaire retiré, le système

L'hépatopancréas et le SNC ont été pesés à l'aide d'une balance à précision (SARTORIUS 1/10 mg) puis mis dans des tubes à une température de -4°C afin d'inhiber toute activité

enzymatique et servir par la suite au dosage des bio marqueurs. Quelques ovaires sont fixés dans du formol à 10% pour l'étude histologique. (Fig.5a)



Figure 6 : Dissection de la femelle *Gambusia affinis*

8. Dosage des biomarqueurs

8.1 Préparation des prélèvements et de l'homogénat

Les organes prélevés (hépatopancréas, SNC) des femelles des différents lots et différentes périodes, sont mis séparément dans des tubes eppendorf et additionnés du tampon TBS à pH = 7,4 et le DTT (dithiothreitol dilué au 1/100^{ème} dans le tampon TBS à pH=7,4) et le cocktail anti- protéase (dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon TBS à PH=7,4) puis broyés à l'aide d'un broyeur à ultrason en maintenant les tubes à basse température. Après avoir homogénéisé tous les tubes nous les avons placés dans la centrifugeuse à 9000 tours/25 min à 4°C. Les surnageants récupérés sont fractionnés dans d'autres tubes et conservés à -80°C pour la réalisation des dosages.

8.2 Dosage des protéines

La quantification des protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Nous avons utilisé 100 µl du surnageant de chaque organe, homogénéisé avec 4 ml de bleu brillant de comassie (BBC) (G250), Merck) comme réactif. Le mélange est agité et laissé à température ambiante (T°C) pendant 5 mn pour la stabilisation de la couleur (pour le blanc à la place du surnageant nous avons mis de l'eau distillée). La lecture s'effectue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

Pour la gamme d'étalonnage nous avons utilisé le sérum albumine de bœuf (Sigma, France) comme standard selon les indications du tableau 2.

Tableau 2 : Réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution d'Albumine (BSA μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

8.3. Dosage de glutathion (GSH)

8.3.1. Principe

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance du DTNB (2-nitro-5 mercapturique) résultant de la réduction d'acide 5,5' dithio-bis-2-nitro benzoïque (connu sous le nom de réactif d'Ellman) par les groupements (-SH) du glutathion. (Weckberker et cory, 1988)

8.3.2. Mode opératoire

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat
- Ajouter 0,2 ml de SSA (0,25% solution acide salicylique) et laisser pendant 15 mn dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours /mn pendant 15 mn.
- Prélever 0,5 ml de surnageant.
- Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, PH=9,6)
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB (acide 5,5' dithio-bis-2-nitro benzoïque à 0,01 M dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser à T° ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur (la réaction colorimétrique se développe instantanément).

- Mesurer l'absorbance optique à 412 nm.

8.3.3. Calcul de la concentration

Elle est obtenue après application de la formule suivante :

$$[\text{GSH}] \mu\text{M/mg de protéine} = \text{Do} \times \text{L} \times 1,525 / 13100 \times 0,8 \times 0,5 \times [\text{Prt}] \text{ mg}$$

DO : Densité optique.

L : Volume totale des solutions utilisées dans la protéinisation.

1,525 : le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant.

13100 : Coefficient d'absorbance (concernant le groupement –SH à 412 nm).

0.8 : le volume d'homogénat tracer dans 1 ml.

0.5 Le volume de surnageant trouvé dans 1,525 µl.

8.4. Dosage de glutathion S transférase (GST)

8.4.1. Principe :

Les glutathion S transférase appartiennent à une famille d'enzyme multifonctionnelle essentiellement cytosolique, impliqués dans le transport et la biosynthèse intracellulaire, elles catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles. La technique que nous avons utilisée et celle d'Habig *et al.*, (1974) elle mesure la cinétique de formation entre un substrat modèle, le chlorodinitrobenzene (CDNB) et le glutathion, qui absorbe la lumière à 340 nm. La vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite dans la cuve.

8.4.2. Mode opératoire

-Mettre au bain marie à 37°C les solutions CDNB, Tampon phosphate et GSH.

-La lecture au spectrophotomètre se fait en micro cuve en quartz et à l'abri de la lumière. -La mesure des échantillons doit se faire en plusieurs temps pour établir une moyenne.

Longueur d'Onde :		340nm
Introduire dans les tubes :		
	Blanc	Dosage
CDNB (µl)	50	50
Tampon phosphate pH=7	850	840
Echantillon (µl)	0	10
GSH (µl)	100	100

8.4.3 Calcul de l'activité de la GST

$$AV = \frac{\Delta DO \text{ ech} - \Delta DO \text{ Blanc}}{\varepsilon \times L} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}}$$

$\Delta DO_{\text{ech}} - \Delta DO_{\text{blanc}}$: moyenne des DO des échantillons par minute-moyenne des DO des Blancs par minute

$\varepsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ représente le coefficient d'extinction moléculaire du CDNB.

L : Trajet optique de la micro cuve = 1cm.

L'activité spécifique de l'enzyme (AS) se calcule en rapportant l'AV à la concentration de protéines de l'échantillon : $AS = AV \times 1000 / [Prot]$

[Prot] : représente la concentration en protéines de l'échantillon en mg/ml de protéines.

8.5. Dosage de la catalase

8.5.1. Principe

Les catalases sont des enzymes tétramériques qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces oxygénées réactives et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (qui peut être toxique pour la cellule) en eau et en oxygène (Regoli et Principato, 1995).

8.5.2. Mode opératoire

Remplir les cuves comme indiquées ci-dessous en se plaçant à l'obscurité :

- 990 µl de solution Tampon phosphate + H₂O₂ qui ont été mis préalablement au bain marie à 25°C et dont la valeur de la densité optique de cette solution doit être entre 0,520 et 0,550.
- Echantillon : 10µl
- Bien agiter la cuve pour avoir un mélange homogène
- La lecture est une cinétique sur environ 1mn, la réaction commence dès l'ajout de l'échantillon.
- Mesurer la pente. La valeur de la pente sans échantillon nous sert de blanc.

8.5.3. Calcul de l'activité de la catalase

L'activité est mesurée par la disparition de l'eau oxygénée

$$AV_{\mu\text{mol/min/ml}} = \frac{\Delta DO_{\text{ech}}}{\varepsilon \times L} \times \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{enz}}}$$

ΔDO_{ech} : Moyenne des densités optiques des échantillons par minute.

$\varepsilon = 0.040 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ représente le coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée.

L : Trajet optique de la micro cuve = 1cm.

L'activité spécifique de l'enzyme (AS) se calcule en rapportant l'AV à la concentration de protéines de l'échantillon [Prot] : $AS = AV \times 1000 / [Prt]$

8.6. Dosage de l'acétylcholinestérase

8.6.1. Principe

La méthode de dosage d'acétylcholinestérase la plus courante (Ellman *et al.*, 1961) consiste à fournir à l'enzyme un substrat, l'acétylcholine (AChE), dont l'hydrolyse catalysée libère de la thiocholine (SCh) et de l'acide acétique. La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique ; on la révèle grâce à une méthode colorimétrique faisant intervenir un ion (le dithiobisnitrobenzoate ou DTNB) qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune que l'on mesure à 410nm.

8.6.2. Mode opératoire

Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml du tampon phosphate puis centrifugés à 9000 tours/5mn, le surnageant récupéré est utilisé immédiatement pour le dosage comme suit :

-La lecture au spectrophotomètre est immédiate elle se fait tout de suite après avoir mis l'AChE.

-La D.O. à 410 nm est suivie en fonction du temps (15mn) après la dernière addition d'AChE. La pente de la courbe D.O.= f(t) donnera donc une valeur proportionnelle à la quantité d'enzyme présente.

8.6.3. Calcul de l'activité de l'acétylcholinestérase

$$AV = \frac{\Delta DO_{ech} \times 1000 \times V_{tot}/V_{ech}}{\epsilon \times L \times [Prot]}$$

ΔDO_{ech} : Moyenne des densités optiques des échantillons par minute.

$\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ représente le coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée.

1000 : pour être en nmole.

L : Trajet optique de la micro cuve= 1cm.

[Prot] : concentration des protéines en mg/ml.

V_{tot}/V_{ech} : dilution de l'échantillon dans la microcuve.

9. Etude histologique des ovaires

L'étude histologique a été effectuée sur les ovaires des femelles adultes. L'épaisseur des coupes réalisées se situe aux alentours de 7 μ . En effet le microscope photonique ne peut fournir d'images que si la préparation à examiner est suffisamment fine pour se laisser traverser partiellement par la lumière. La préparation des coupes histologiques a été réalisée selon la méthode de Martoja et Martoja (1967) qui comporte plusieurs étapes.

9.1. Fixation du matériel

La fixation doit être réalisée pendant 24h à 48h dans un fixateur tel que F.A.A (Formol, acide acétique et alcool) ou le liquide de Bouin (fixateur couramment utilisé, bien qu'il serve souvent de liquide d'attente). Il est déconseillé par Marjota et Marjota (1967) de laisser reposer les coupes plus de 48h. Pour une bonne pénétration des différents milieux plus les coupes sont petites et fines plus la pénétration est meilleure et rapide.

Les pièces après fixation sont bien rincées à l'eau distillée pour les débarrasser du fixateur puis déshydratées à l'alcool éthylique à titrage croissant 70°, 90°, 100° ceci permettra une bonne inclusion par la suite.

9.2. Inclusion

La résistance des tissus à la pression de l'instrument coupant n'est pas suffisante, ce qui entraîne des détériorations qui rendent inexploitable les observations qui en résultent ; c'est pourquoi on pratique l'inclusion dans un milieu qui va se substituer à l'eau tissulaire pour augmenter la tenue du bloc à couper.

Pour cette étude nous avons choisi la paraffine qui existe en plusieurs déclinaisons et qui est la plus connue et la plus utilisée ; l'inclusion des échantillons se fait d'une façon séparée en utilisant les barres de leuckard pour former un moule dans lequel la paraffine encore liquide est versée, puis la pièce est placée dedans en prenant soin de bien l'orienter.

9.3. Coupes et coloration

Les blocs d'inclusion sont collés sur un porte échantillon. La surface à coller est ramollie au moyen d'une lame métallique chauffée modérément à la flamme puis posée sur le bloc porte-objet sur lequel le bloc adhère très bien après une légère pression. Les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (Microtome 2030 Reichert Jung). Ces séries de coupes sont reliées entre elles sous forme de ruban, ce qui facilite la reconstitution (tridimensionnelle) des structures observées. L'épaisseur des coupes est de 4 à 7 microns.

Les rubans des coupes obtenues sont déposés sur des lames de verre dégraissées enduites de glycéralbumine, puis recouverts d'eau distillée et posés sur une platine chauffante (dont la température est inférieure à la température de fusion de la paraffine). La chaleur permet l'étalement des rubans de coupes.

Les coupes déparaffinées sont colorées à l'hémalum-éosine. On déshydrate la préparation dans des bains d'alcool et on monte au baume de canada ou à l'eukitt.

L'observation des coupes est réalisée à l'aide d'un microscope photonique équipé d'un appareil photographique.

10. Etude du comportement de la nage

10.1 Mesure comportemental

L'activité de nage de *Gambusia affinis* a été suivie dans 3 aquariums contenant les différents lots de poissons témoins et traités par les 2 doses sublétales (7,66mg/l et 5,75mg/l) (Fig.8). Des repères visuels ont été apposés sur les vitres afin de déterminer 3 zones d'observation de 21cm et permettre la quantification des déplacements. Chaque observation effectuée a porté sur des groupes de 5 individus naïfs (testés une seule fois). Au cours de 6 heures d'exposition, un suivi des déplacements des poissons a été effectué toutes les 2 heures, pendant une période de 15mn, avec un relevé de positionnement toutes les 30 secondes. L'activité de déplacement est donnée par le nombre d'individus qui sont passés d'une zone à une autre au cours des 15mn d'observation. Chaque traitement a fait l'objet de 5 répétitions.

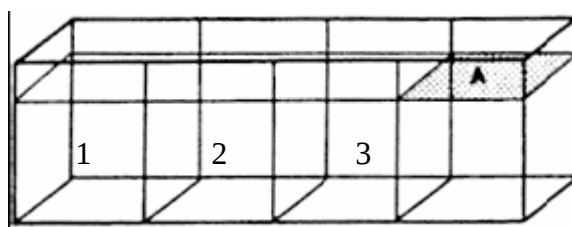


Figure 7 : Aquarium d'observation. (1, 2, 3: zones d'observations. A : zone d'abri.)

10.2 Mesure neurochimique

L'activité de l'AChE du cerveau des femelles adultes de *Gambusia affinis* a été mesurée après 2h, 4h, et 6h d'exposition au carbofuran aux mêmes concentrations sublétales testées pour le suivi de l'activité de nage. Les poissons ont été exposés par groupe de 5 dans des aquariums. Des groupes témoins ont été également constitués. Au terme de chaque période d'exposition, les cerveaux sont rapidement prélevés et l'activité de l'acétylcholinestérase a été mesurée selon la méthode d'Ellman déjà citée. Les résultats ainsi obtenus ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de l'AChE par rapport aux témoins non traités.

11. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes et écart-type. Nous avons utilisé le test d'analyse de la variance à deux critères de classification « ANOVA » suivi du test « Tukey » pour comparer les moyennes entre elles d'une part et entre celles des témoins d'autre part. $P < 0,05$ est considéré comme étant le seuil significatif.

III. Résultats

1. Effets du carbofuran sur la concentration des protéines hépatopancréatiques

1.1 Réalisation de la courbe d'étalonnage

Tableau 3 : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Quantité d'albumine BSA ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
DO	0	0,08	0,172	0,303	0,434	0,591

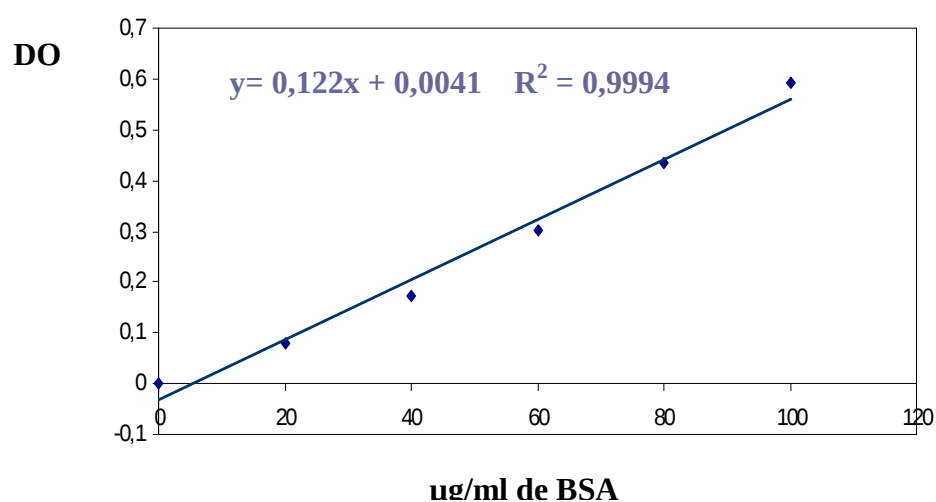


Figure 8: Droite de régression exprimant les absorbances en fonction des quantités de BSA (μg). (R^2 : coefficient de détermination).

1.2 Dosage des protéines hépatopancréatiques :

Le carbofuran entraîne chez les femelles exposées aux 2 doses, une baisse de la teneur en protéines hépatopancréatique par rapport au lot témoin. Chez les deux lots traités, cette baisse est de 40% et 30% respectivement à 15 jours et 40 jours d'exposition

La comparaison des moyennes des teneurs en protéines entre le lot témoin et le lot traité révèle l'existence d'une différence très significative à la dose de 5,75mg/l (1/4 DL₅₀) après 15 jours et 40 jours de traitement (Tableau 4, Figure 9).

Tableau 4 : Concentration des protéines en µg hépatopancréatiques chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL₅₀).

Lots Durée	T (0 mg/l)	Traité ¼ DL ₅₀	Traité 1/3 DL ₅₀
15 jours	39.2 ± 2.1	23.9 ± 3.1**	23.6 ± 1.4**
40 jours	29.4 ± 1.5	21.2 ± 1.2**	20.8 ± 1.1****

** : P < 0.01 vs T ; **** : P < 0.001 vs T

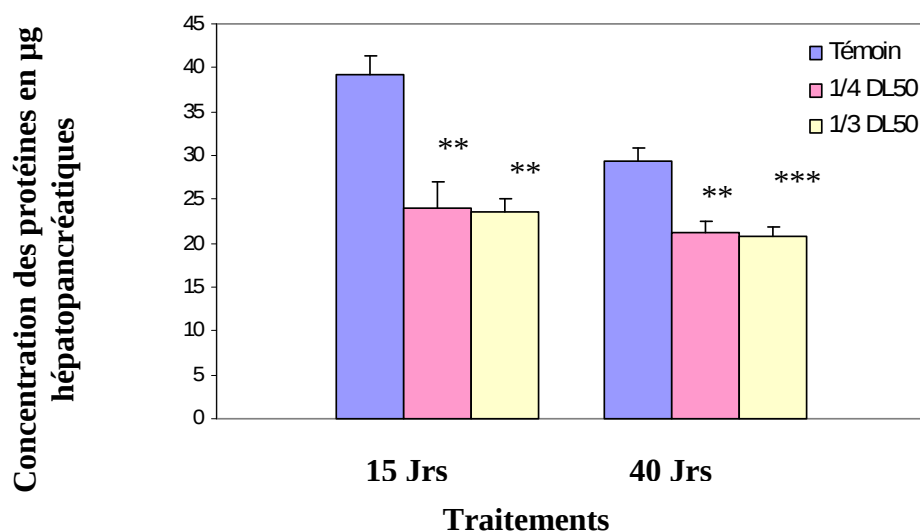


Figure 9: Concentration des protéines en µg hépatopancréatiques chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL₅₀).

2. Effet du carbofuran sur la variation des biomarqueurs chez les femelles

2.1. Effet sur la teneur du GSH hépatopancréatique

Les résultats portés par la figure (10) et le tableau (5) révèlent que le traitement des femelles adultes de *Gambusia affinis* par le carbofuran induit une réduction de la teneur en GSH hépatopancréatique. Chez les femelles traitées pendant 15 jours aux deux doses (1/4 DL₅₀, 1/3 DL₅₀) (5,75mg/l, 7,66mg/l), la diminution est respectivement de l'ordre de 27% et de 33% par rapport au témoin ; mais après 40 jours de traitement cette baisse s'amplifie et atteint 37% et 48% respectivement au ¼ DL₅₀, et au 1/3 DL₅₀.

. La comparaison des moyennes des taux de GSH (nmole/mg de protéine) par rapport au témoin par ANOVA révèle que la différence est significative ($p < 0,05$) et très significative ($p < 0,001$) respectivement après 15 et 40 jours de traitement à 5,75mg/l de carbofuran. Cette différence devient très significative et hautement significative respectivement pendant les deux périodes d'exposition à la dose 7,66 mg/l.

Tableau 5 : Teneur du GSH hépatopancréatique en nmol/mg protéine chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4DL₅₀).

Durée \ Lots	T (0 mg/l)	Traité ¼ DL ₅₀	Traité 1/3 DL ₅₀
15 jours	68.9 ± 4.6	50.6 ± 3.2*	46.5 ± 3.6**
40 jours	65.4 ± 4.3	41.8 ± 4.2**	34.4 ± 2.7***ab

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T et *** : $P < 0.001$ vs T

a : $P < 0.05$ effet dose à 40 jours et b : $P < 0.05$ effet temps

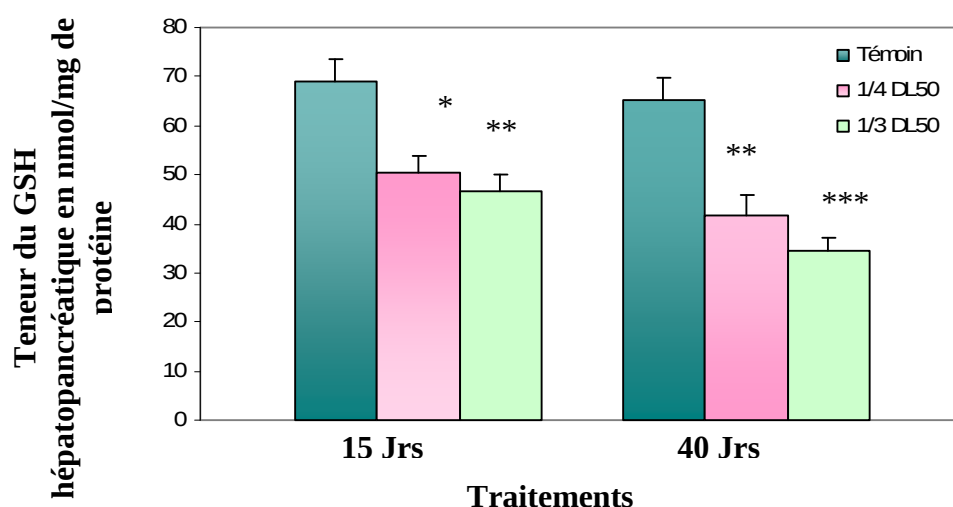


Figure 10: Teneur du GSH hépatopancréatique en nmol/mg protéine chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4DL₅₀).

2.2. Effet sur l'activité de la GST dans l'hépatopancréas

Selon le tableau (5) et la figure (11), la comparaison des résultats du témoin par rapport à ceux des femelles traitées pendant 15 jours au 1/4 et au 1/3 DL₅₀ du carbofuran révèle chez ces dernières, une augmentation de l'activité de la GST hépatopancréatique de l'ordre de 55% et 185% respectivement. Ces augmentations passent à 79% et à 176% par rapport aux témoins après 40 jours de traitement respectivement pour les deux doses citées.

La comparaison par ANOVA, des moyennes de l'activité enzymatique ($\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$) par rapport au témoin révèle que la différence est significative ($p < 0,05$) à la dose 5,75mg/l durant toute la période du traitement. Avec la dose 7,66mg/l cette différence est très significative ($p < 0,01$) et hautement significative ($p < 0,001$) respectivement après 15 jours et 40 jours du traitement (Tableau 6, Figure 12).

Tableau 6 : Activité de la GST en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4DL₅₀).

Durée \ Lots	T (0 mg/l)	Traité ¼ DL ₅₀	Traité 1/3 DL ₅₀
15 jours	9.32 $\pm$ 1.7	14.52 $\pm$ 0.97*	26.6 $\pm$ 0.86**a
40 jours	10.34 $\pm$ 1.3	18.6 $\pm$ 1.9*	28.6 $\pm$ 1.2***a

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T et *** : $P < 0.001$ vs T
a : $P < 0.05$ effet dose à 15 et 40 jours

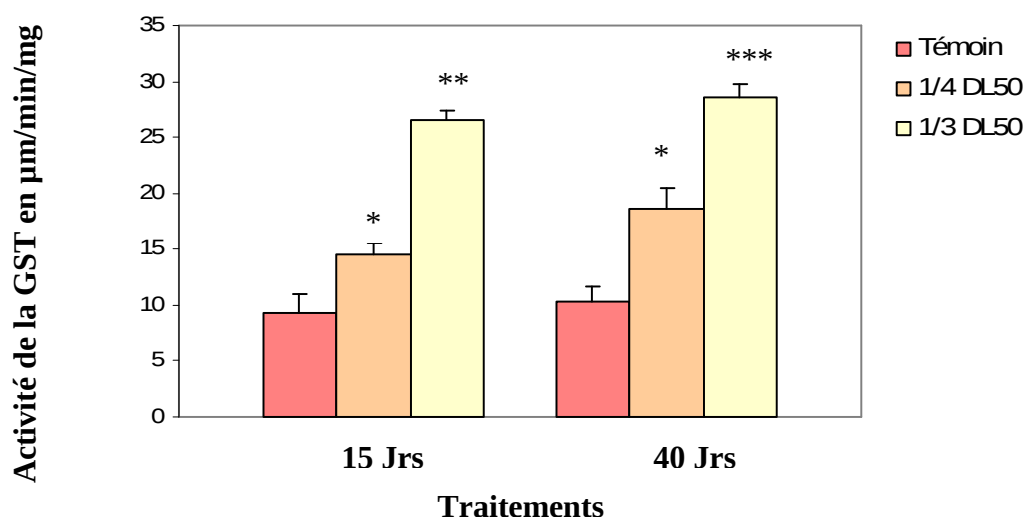


Figure 11: Activité de la GST en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL₅₀).

2.3 Effet sur l'activité de la CAT dans l'hépatopancréas

En comparaison avec les femelles témoins, chez les femelles traitées pendant 15 jours aux doses de 5,75mg/l et de 7,66mg/l de carbofuran, nous relevons une augmentation de l'activité de la catalase de l'ordre de 24% et 64 % respectivement. Après 40 jours de traitement les augmentations relevées sont de l'ordre de 89% à la dose de 5,75mg/l et de 144% à la dose de 7,66mg/l La comparaison des moyennes de l'activité de la catalase ($\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$) par rapport aux témoins par le test de Tukey's a montré qu'il y a une différence significative ($p < 0,05$) à la dose 5,75mg/l après 40 jours du traitement. A la plus forte dose (7,66mg/l) les différences sont significative ($p < 0,05$) et très significative ($p < 0,01$) respectivement après 15 et 40 jours de traitement (Tableau 7, Figure 12).

Tableau 7 : Activité de la CAT en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL_{50}).

Durée \ Lots	T (0 mg/l)	Traité $\frac{1}{4} \text{DL}_{50}$	Traité $\frac{1}{3} \text{DL}_{50}$
15 jours	4.9 ± 0.14	6.12 ± 0.84	$8.05 \pm 0.46^*$
40 jours	4.2 ± 0.12	$7.96 \pm 1.09^*$	$9.02 \pm 1.12^{**}$

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T.

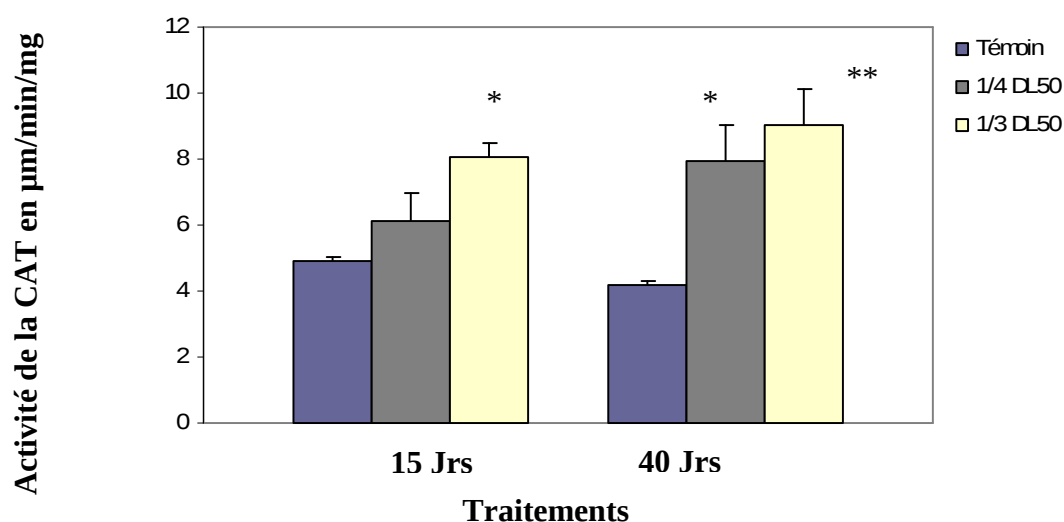


Figure 12 : Activité de la CAT en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran à raison de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL_{50}).

2.4. Effet sur l'activité de l'AchE cérébrale

Chez les femelles traitées au carbofuran, l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale est inhibée. Aux doses 1/4 et 1/3 de la DL₅₀ on enregistre respectivement des réductions de l'ordre de 30% et 37% par rapport au témoin après 15 jours d'exposition. Mais après 40 jours de traitement les réductions relevées sont de l'ordre de 40% et 50% respectivement aux doses citées (Tableau 8, Figure.13).

Tableau 8 : Activité de la AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL₅₀).

Durée \ Lots	T (0 mg/l)	Traité 1/4 DL ₅₀	Traité 1/3 DL ₅₀
15 jours % d'inhibition	1.14 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.04* 28.84%	0.72 $\pm$ 0.03**a 52.18%
40 jours % d'inhibition	1.25 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.06** 40.1%	0.63 $\pm$ 0.05***a 62.2%

* : P < 0.05 vs T, ** : P < 0.01 vs T et *** : P < 0.001 vs T

a : P < 0.05 effet dose à 15 et 40 jours

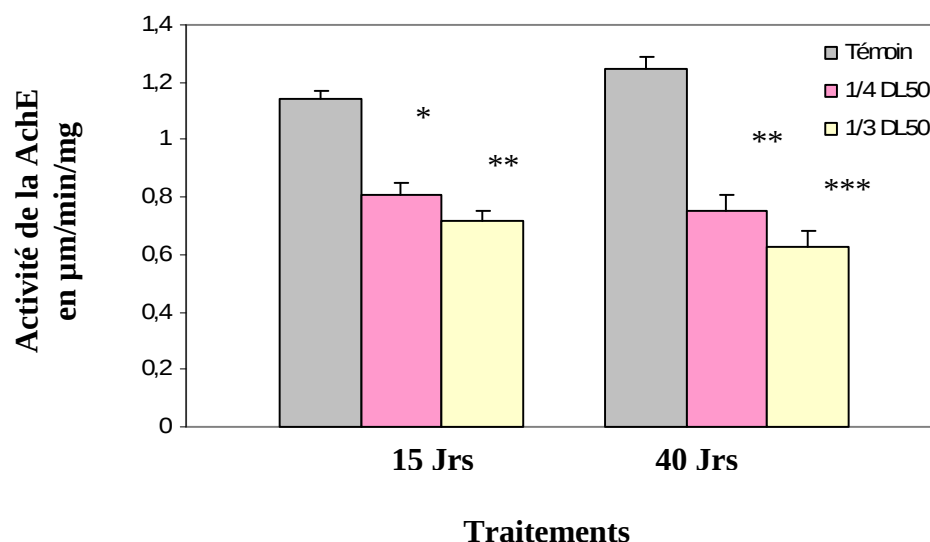


Figure 13 : Activité de la AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL₅₀).

3. Effet du carbofuran sur la croissance des alevins

Les résultats relatifs à la croissance des alevins en l'occurrence le poids et la taille chez le lot témoin et le lot traité par le carbofuran au 1/4 de la DL 50 montrent au 2^{ème} mois d'exposition au xénobiotique une diminution de la taille et du poids absolu respectivement significative et très significative.

Au 3^{ème} mois les différences sont statistiquement très significatives pour les deux paramètres mesurés.(Tableau 9,10 ; Figure 14,15).

Tableau 9 : Variation de la taille des alevins *G.affinis* témoins et traités à 1/4 DL₅₀ de carbofuran

Lots	1 jour	1 mois	2 mois	3 mois
Témoin	8,33 ±0,96	9,16 ±0,36	13,75± 0,67	16,75 ±0,87
Traité 1/4 DL ₅₀	8,2 ±0,66	8,95 ±1,16	10,66± 0,95*	13,2 ±1,2**

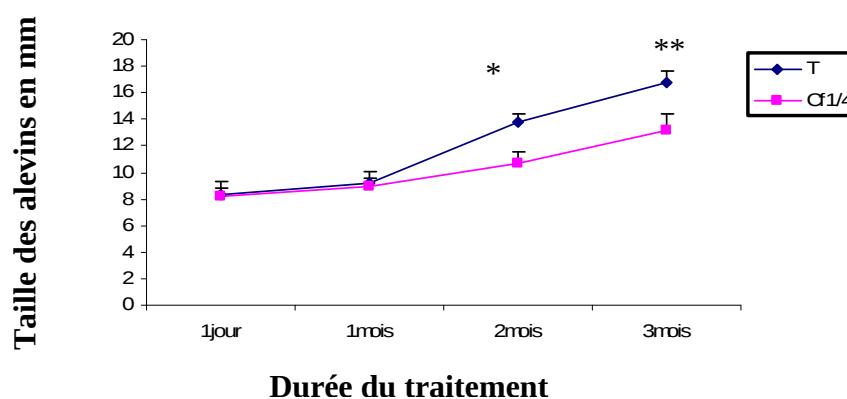


Figure 14 : Variation de la taille des alevins *G.affinis* témoins et traités à 1/4 DL₅₀ de carbofuran

Tableau 10: Variation du poids absolu des alevins *G.affinis* témoins et traités par le carbofuran à 1/4 DL₅₀

Lots	1 jour	1 mois	2 mois	3 mois
Témoin	4,25 ±0,8	18,1 ±1,6	57,75± 3,5	69,5 ±2,16
Traité 1/4 DL ₅₀	4,33 ±0,6	16,25 ±1,2	38,82± 4,7**	51,33±4,2**

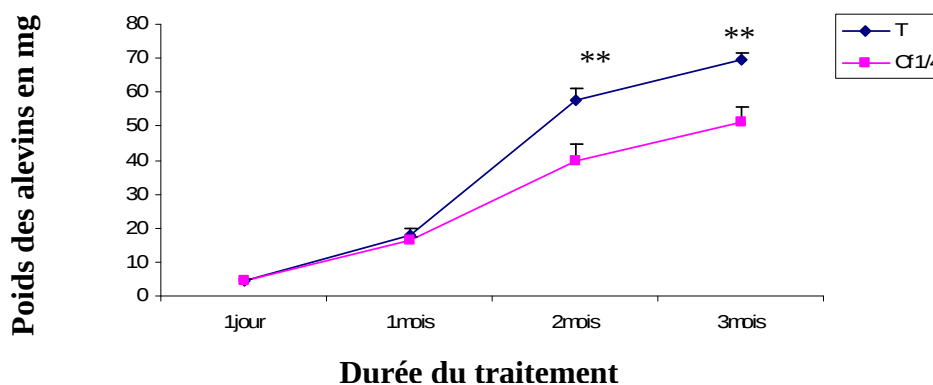


Figure 15: Variation du poids absolu des alevins *G.affinis* témoins et traités par le carbofuran à 1/4 DL₅₀

4. Analyse des biomarqueurs chez les alevins

4.1 Variation de la teneur en GSH

Le taux de GSH diminue significativement et d'une manière croissante sous l'effet du carbofuran. Par rapport aux témoins, le taux de diminution est de 28% au premier mois, 57% au 2^{ème} mois et il atteint la valeur de 59% après 3 mois de traitement.

La comparaison des moyennes du taux de GSH par rapport au témoin révèle l'existence des différences significatives, très significatives et hautement significatives respectivement après 1 mois, 2 mois et 3 mois d'exposition (Tableau 11, Figure 16).

Tableau 11 : Teneur du GSH en nmol/mg protéine chez les alevins *Gambusia affinis* traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4 DL₅₀).

Durée	1 mois	2 mois	3 mois
Lots			
témoin	33.5 ± 3.6	38.20 ± 4.2	37.80 ± 3.4
Traité 1/4 DL ₅₀	24.20 ± 2.6*	16.61 ± 2.33**b	14.75 ± 2.06 ***b

* : P < 0.05 vs T, ** : P < 0.01 vs T et *** : P < 0.001 vs T

b : P < 0.05 vs 1/4 1mois : effet temps

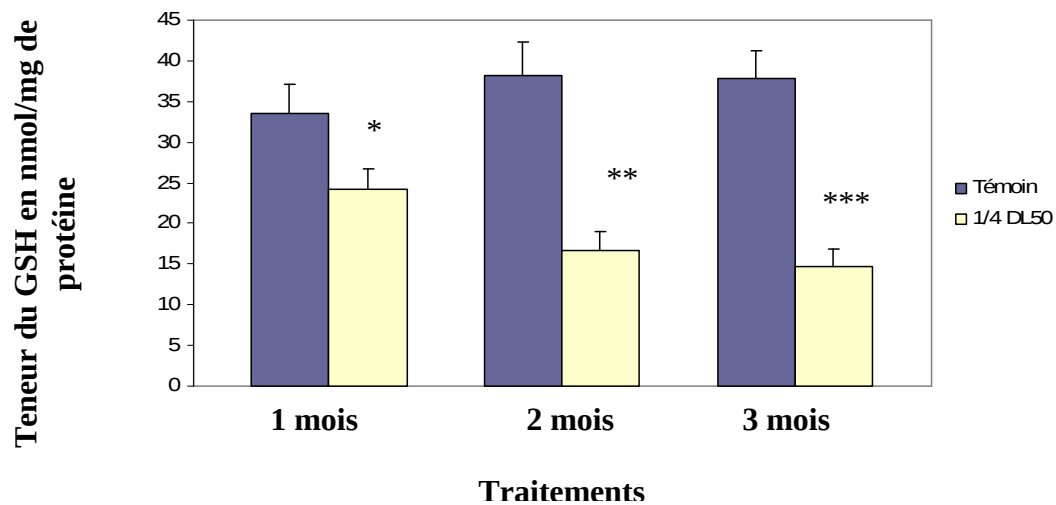


Figure 16 : Teneur du GSH en nmol/mg protéine chez les alevins de *Gambusia affinis* exposés au carbofuran à la dose de 5.75 mg/l (1/4 DL₅₀).

4.2. Variation de l'activité de la GST

Nos résultats montrent clairement que le cabofuran induit une augmentation hautement significative de l'activité de la GST chez les alevins exposés au 1/4 de la DL₅₀ de ce xénobiotique pendant une période de 3 mois. Nous constatons que cette augmentation est corrélée avec le temps d'exposition et que par rapport aux témoins, elle est de 82%, 152% et 184% respectivement au 1^{er}, 2^e et 3^e mois du traitement (Tableau 12, Figure 17).

Tableau 12 : Activité de la GST en μmol thioéther formé/min/mg protéine chez les alevins *Gambusia affinis* traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l ($\frac{1}{4}$ DL₅₀).

Durée Lots	1 mois	2 mois	3 mois
témoin	3.8 $\pm$ 0.18	4.35 $\pm$ 0.47	4.66 $\pm$ 1.03
Traité 1/4 DL ₅₀	6.95 $\pm$ 0.47*b	9.25 $\pm$ 1.06*b	13.26 $\pm$ 1.25 **

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T et b : $P < 0.05$ vs $\frac{1}{4}$ 1mois : effet temps

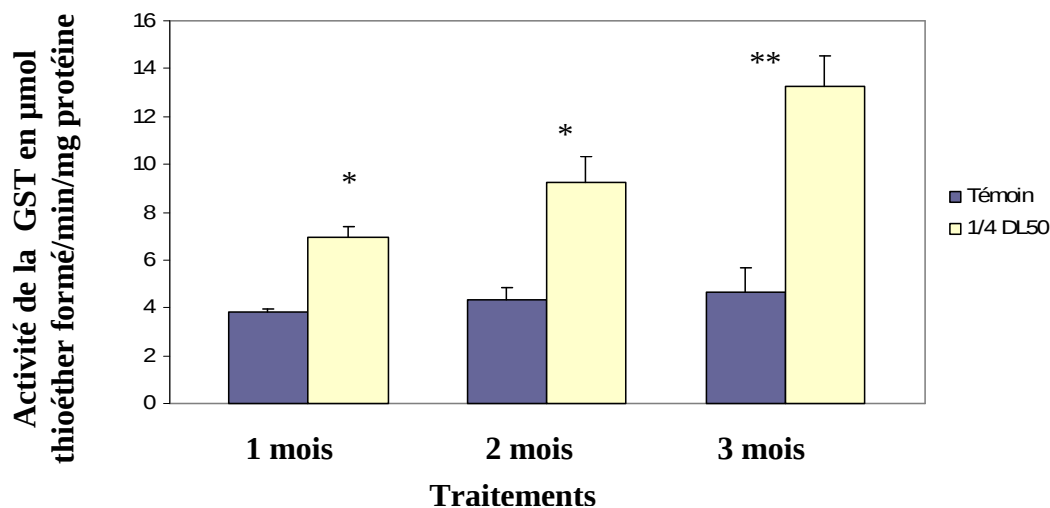


Figure 17 : Activité de la GST en μmol thioéther formé/min/mg protéine chez les alevins de *Gambusia affinis* exposés à 5.75 mg/l (1/4 DL₅₀) de carbofuran.

4.3. Variation de l'activité de la catalase (CAT)

Le carbofuran provoque également une augmentation de l'activité de la catalase qui, par rapport aux témoins elle passe de 30% à 61% et 85% respectivement après un mois, deux mois et trois mois d'exposition.

La comparaison par ANOVA des moyennes révèle l'existence d'une différence significative au 1^{er} et au 2^e mois. Cette différence est très significative au 3^e mois d'exposition (Tableau 13, Figure 18).

Tableau 13 : Activité de la catalase en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ métabolisé/min/mg protéine chez les alevins de *Gambusia affinis* exposés à 5.75 mg/l (1/4 DL₅₀) de carbofuran.

Lots \ Durée	1 mois	2 mois	3 mois
témoin	4.85 ± 0.22	5.06 ± 0.66	4.79 ± 0.86
Traités au 1/4 DL ₅₀	6.32 ± 0.81*	8.16 ± 0.49*	9.83 ± 0.69 **b

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T et b : $P < 0.05$ vs 1/4 1mois : effet temps

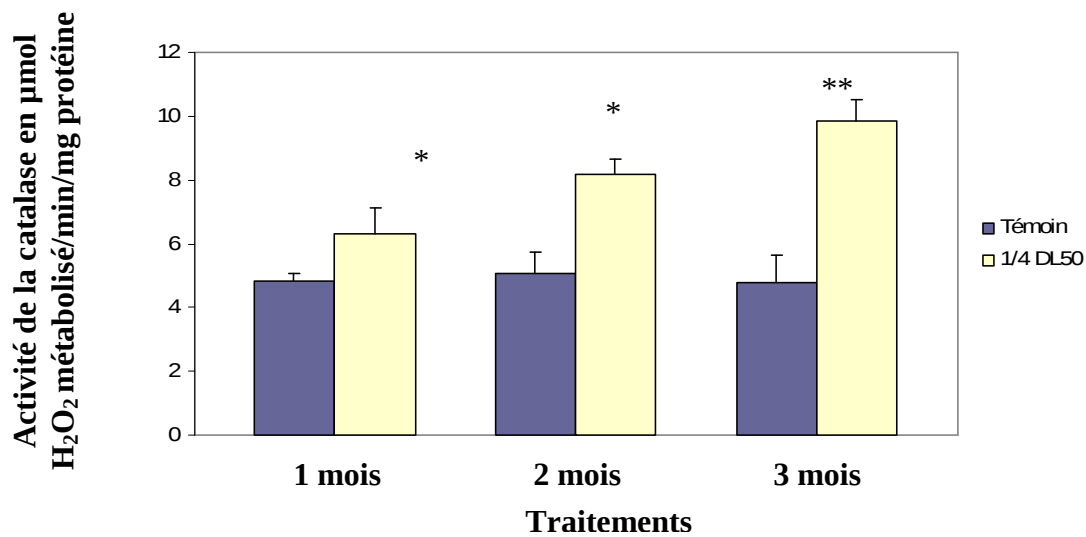


Figure 18 : Activité de la catalase en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ métabolisé/min/mg protéine chez les alevins *Gambusia affinis* traités par le carbofuran à raison de 5.75 mg/l (1/4DL₅₀).

5. Suivi Histologique des ovaires

Les photographies des coupes sériées pratiquées au niveau de l'ovaire de *Gambusia affinis* des femelles adultes témoins et de celles traitées au 1/4 de la DL50 du carbofuran, nous ont permis d'établir un suivi histologique et une analyse comparative des ovaires en phase de vitellogénèse.

Sur le plan topographique, les coupes (fig.19) montrent des structures ovariennes confirmant les différentes phases de la vitellogénèse.

Les ovaires des femelles témoins (figure 20, A, B et C) sont en pleine évolution. On note le développement d'une cavité ovarienne préparant la fécondation ainsi que la présence d'ovocytes aux différents stades de développement avec maturation ovocytaire active.

La figure (2, C) révèle la présence d'un oviducte signe d'un ovaire post-partum.

Les ovaires des femelles traitées (Fig.19, D, E et F) montrent en revanche, une altération de la cavité et de l'épithélium ovariens ainsi qu'une diminution significative du nombre d'ovocytes de différents stades. La présence de plusieurs follicules atrophiques correspondant à l'ensemble ovocytes et follicules en dégénérescence a été également observé.

La photo (22, F.) montre un ovaire avec dégénérescence totale des follicules.

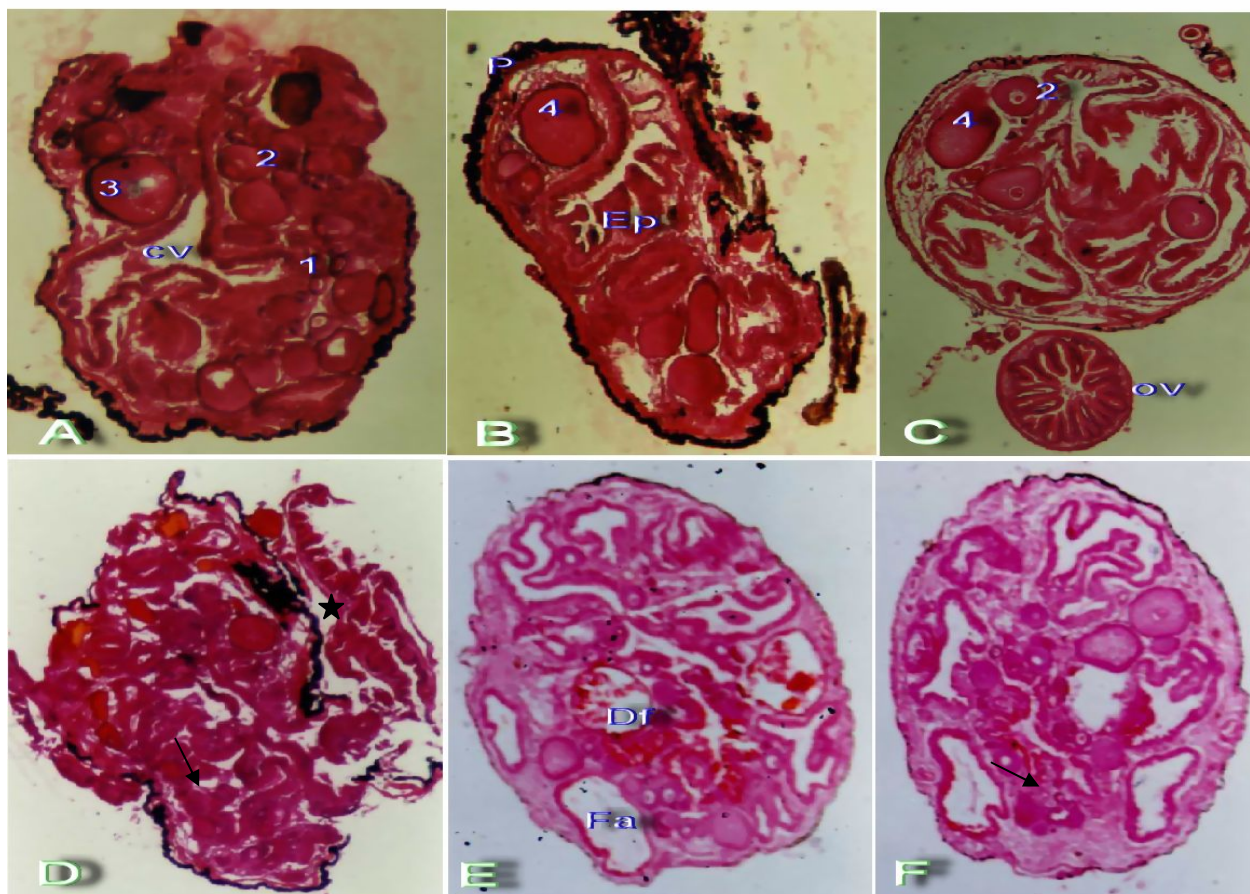


Figure 19: Coupes histologiques colorées à l'hémalun éosine montrant la topographie des ovaires de *Gambusia affinis* témoins (**A**, **B** et **C**) et *Gambusia affinis* traitées au carbofuran à la dose de $1/4 DL_{50}$ (**D**, **E** et **F**) (grossissement 150X). **A** : ovaire témoin au début de la phase de vitellogénèse montrant des ovocytes à différents stades de développement 1, 2 et 3 avec une cavité ovarienne réduite (cv) préparant la fécondation. **B** : ovaire témoin montrant des stades ovocytaires plus avancés stade 4, avec un épithélium ovarien bien développé (**Ep**) et une paroi ovarienne noirâtre (**P**). **C** : ovaire témoin post-partum montrant des ovocytes 3 et 4 avec présence d'un oviducte signe d'une mise bas. **D** : ovaire traité au carbofuran montrant une altération de l'épithélium ovarien (étoile) et de la cavité (flèche) et une diminution significative des ovocytes matures stade 3. **E** : ovaire traité montrant un début de dégénérescence folliculaire (**Df**) et présence de plusieurs follicules atrésiques (**Fa**). **F** : ovaire traité montrant une diminution du nombre d'ovocytes principalement les ovocytes de stades 3 et 4. La flèche montre une dégénérescence totale du follicule.

6. Effet du carbofuran sur le comportement de la nage des femelles.

6.1. Réponse comportementale au carbofuran

Chez les femelles exposées à 5,75mg/l et 7,66mg/l de carbofuran nous notons une faiblesse de l'activité de nage après 2 heures d'exposition au xénobiotique. Cette activité diminue au fur et à mesure qu'on augmente la dose du carbofuran ainsi que la durée d'exposition. Ainsi par rapport au témoin des diminutions de la nage de l'ordre de 40% et 50% ont été observées respectivement après 4h et 6h d'exposition (Tableau 14, Figure 20).

La comparaison par ANOVA des moyennes des activités de déplacement, montre que ces diminutions sont significatives jusqu'à 4h d'exposition aux doses 5,75mg/l et 7,66mg/l de carbofuran. Elles sont significatives à très significatives après 6h d'exposition respectivement au 1/4 et au 1/3 de la DL50.

Tableau 14 : Activité de déplacement des femelles de *Gambusia affinis* après 2, 4 et 6h d'exposition à 7.66 et 5.75 mg/l de carbofuran. Chaque point est la moyenne $\pm$ l'erreur type de 5 observations.

Concentrations	Durée d'expérimentation		
	2 h	4 h	6 h
0	86.4 $\pm$ 3.34	94.8 $\pm$ 5.10	96.6 $\pm$ 7.9
1/4	78.6 $\pm$ 7.34	74.9 $\pm$ 9.8*	65.6 $\pm$ 8.3*
1/3	71.6 $\pm$ 6.9*	58.5 $\pm$ 6.6*	49.2 $\pm$ 7.5 **ab

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T.

a : $P < 0.05$ effet dose à 6 h et b : $P < 0.05$ effet temps

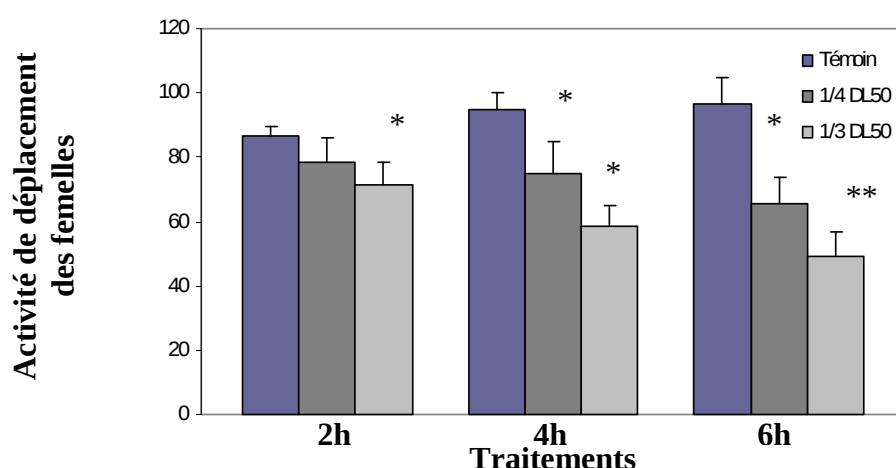


Figure 20: Activité de déplacement des femelles de *Gambusia affinis* après 2, 4 et 6h d'exposition à 7.66 et 5.75 mg/l de carbofuran. Chaque point est la moyenne $\pm$ l'erreur type de 5 observations.

6.2. Effet neurochimique au carbofuran

L'activité de l'acétylcholinestérase diminue en fonction des concentrations et des durées d'exposition au carbofuran. Les inhibitions de cette activité passent de 26% à 44,2% puis à 49,1% avec la dose de 5,75mg/l respectivement après 2h, 4h et 6h d'exposition. Aux mêmes périodes les inhibitions passent respectivement de 42% à 57,3% et à 60,3% avec la dose de 7,66mg/l (Tableau15, Figure21). La comparaison par ANOVA des moyennes des activités de l'acétylcholinestérase montre qu'avec la dose de 5,75mg/l de carbofuran la différence est significative après 2h d'exposition, elle devient très significative après 4h et 6h d'exposition. Avec la dose de 7,66mg/l, les différences sont très significatives à partir de 2h et 4h d'exposition et hautement significative après 6h de traitement.

Tableau 15 : Activité de l'AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL_{50}) pendant une exposition de 2h, 4h, et 6 heures.

Durée concentrations	2 h	4 h	6 h
0	1.15 ± 0.03	1.20 ± 0.05	$1.18 \pm 0.06\text{a}$
1/4 % d'inhibition	$0.89 \pm 0.04^*$ 26%	$0.76 \pm 0.13^{**\text{ b}}$ 44.2%	$0.69 \pm 0.08^{**\text{b}}$ 49.1%
1/3 % d'inhibition	$0.73 \pm 0.03^{**\text{a}}$ 42%	$0.63 \pm 0.07^{**}$ 57.3%	$0.58 \pm 0.05^{***\text{b}}$ 60.3%

* : $P < 0.05$ vs T, ** : $P < 0.01$ vs T et *** : $P < 0.001$ vs T
a : $P < 0.05$ effet dose à 2h et 6 h, b : effet temps à 4 et 6 h.

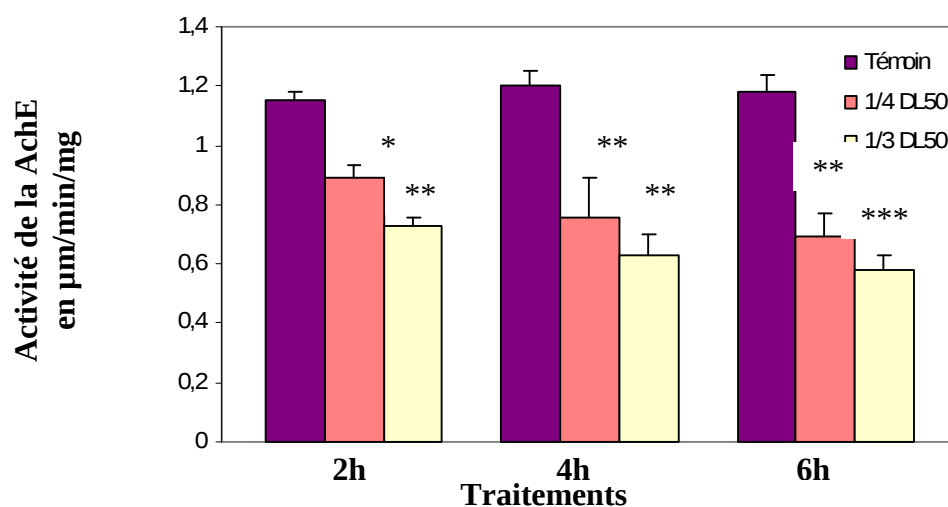


Figure 21: Activité de l'AchE en $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ chez *Gambusia affinis* traité par le carbofuran aux doses de 7.66 et 5.75 mg/l (1/3 et 1/4 DL_{50}) pendant une exposition de 2h, 4h, et 6 heures.

IV. Discussion

Les écosystèmes aquatiques sont menacés par le rejet dans l'environnement d'un nombre croissant de polluants dont la toxicité souvent mal définie affecte les organismes marins qui y vivent et qui peuvent avoir un intérêt bénéfique pour l'homme tel que *Gambusia affinis* utilisé dans la lutte biologique contre les moustiques. Ce poisson est considéré comme matériel médical et sert pour la démoustication (procédé de lutte biologique) surtout dans les régions menacées de Malaria. Pour cela il est impératif de prendre conscience de la nécessité de protéger cette espèce tout comme les autres organismes vivants. Dans cette optique et afin d'estimer la toxicité des effluents sur les écosystèmes, plusieurs approches de dépistage des effets ont été élaborées parmi lesquelles l'utilisation intégrée des biomarqueurs. Cette approche est plus appropriée pour l'estimation des risques engendrés par la pollution sur la santé des écosystèmes (Langlois et Lapierre, 1989 ; Pellerin-Massicotte et *al.* 1989 ; Pelletier & Pellerin-Massicotte, 1990 ; Hugget et *al.* 1992 ; Tarvis, 1993). Elle permet l'évaluation de l'exposition et des effets des polluants sur un organisme vivant.

La capacité d'adaptation d'un organisme à l'environnement dépend principalement des mécanismes efficaces de la détoxification de divers composés endogènes et exogènes (Jakanovic, 2001) ; chez les organismes aquatiques ces mécanismes sont les premiers sollicités par la présence des xénobiotiques (Roche *et al.*, 2003) ; de ce fait les biomarqueurs constituent un signal précoce d'effets de la contamination sur ces organismes. Ils permettent d'évaluer leur état de santé et celui des populations des écosystèmes (Flammarion et *al.*, 2000). Leur inhibition ou leur induction *in vivo* est un bon outil environnemental pour évaluer les effets potentiels des xénobiotiques et de leur niveau de toxicité à différents niveaux d'organisation biologique d'un organisme vivant (Dembélé et *al.*, 1999 ; Ozmen et *al.*, 1999 ; Mc longhlin et *al.*, 2000 ; Sturn et *al.*, 2000 ; Varo et *al.*, 2001). Afin de prendre en compte la multiplicité des effets des contaminants il est apparu nécessaire de recourir à une approche multi-biomarqueurs basée sur la mesure de plusieurs biomarqueurs complémentaires (Blaise et *al.*, 2002 ; Galloway et *al.*, 2004).

1. Effet du carbofuran sur la variation des biomarqueurs

11. Effet sur la teneur de la GSH hépatopancréatique

Face au dommage oxydatif causé par les radicaux libres oxygénés (souvent endogènes), et à l'effet toxique provoqué par les métabolites actifs des xénobiotiques, la cellule vivante

peut se défendre grâce à plusieurs systèmes de détoxification dont le plus important est celui du glutathion (kaplowitz *et al.*, 1985). Cette propriété réside dans sa grande capacité de détoxifier un grand nombre de composés dont l'organisme vivant n'a pas besoin. Ces composés nuisibles peuvent être endogéniques (métabolites actifs des hormones), ou exogéniques (métabolites toxiques des xénobiotiques).

De notre travail il ressort que les doses sublétales (1/3 et 1/4 DL₅₀) peuvent réduire de manière significative à très significative le taux de GSH hépatopancréatique chez *G.affinis*. Cette altération augmente avec la dose administrée du carbofuran, l'âge de l'individu et sa durée d'exposition. En effet chez les alevins traités au 1/4 de la DL₅₀ le taux de réduction est de 28% au premier mois, puis il atteint 57% au deuxième mois et continue de progresser jusqu'à la fin de traitement. Pour la même dose nous notons chez les femelles adultes que le taux subit des réductions de l'ordre de 27% et 37% respectivement après 15 jours et 40 jours d'exposition. Ces valeurs sont encore plus importantes chez les femelles exposées au 1/3 de la DL₅₀.

La diminution du taux de la GSH a été également signalée chez plusieurs espèces animales traitées par divers xénobiotiques :

Selon Drarja-Beldi et Soltani, (2003) ; Zaidi, (2005), l'exposition des poissons femelles de *G.affinis* au diflubenzuron provoque également une réduction du taux de GSH hépatique.

Raho et scharma, (2001) ont observé chez des souris mâles adultes (*Mus musculus*) traités pendant 45 jours avec du HgCl₂ (1,25mg/kg/j), une diminution du glutathion testiculaire. Avec une dose plus faible de ce xénobiotique (0,25mg/Kg) du poids corporel chez le rat mâle Wistar (*Ratus ratus*) , Merzoug, (2005) a observé également après 45 jours de traitement, une diminution de la teneur hépatique en glutathion.

Une diminution de la GSH a été rapportée par Thoma et Wofford, 1984 chez le Mulet (*Mugil cephalus*) après une exposition à un mélange de cadmium et de mercure.

Ringwood *et al.*, (2000) et Wang *et al.*, (2008) ont observé chez *Crassostrima verginica* et le crabe d'eau douce (*Sinopotam yangtsekede*) exposés durant 4h au cadmium une réduction de la GSH hépatopancréatique.

Une diminution du taux de glutathion chez *Gambusia affinis* traité au malarion et au cadmium, chez *Donax trunculus* et la dorade (*Sparus aurata*) exposés pendant 24h au malathion, a été observée respectivement par Roquia et Rouachdia, (2006) ; Braya, (2009) et Rosety *et al.*, (2005).

En revanche des résultats contradictoires révélant l'augmentation du taux de GSH ont été signalés au niveau de la glande digestive de *Mytilus galoprovencialis* et du foie de la truite traitées au cadmium respectivement avec des concentrations de l'ordre de 1,5mg/100g de poids corporel (Viarengo *et al.*, 1999 ; Regali et Principato, 1995) et 200µg/l (Ait-Aissa *et al.*, 2003).

12. Effet sur l'activité de la GST dans l'hépatopancréas

La GST est une enzyme qui catalyse dans le cytosol la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère électrophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire qui est le glutathion (Habig *et al.* 1974).

Cette enzyme a été employée dans le laboratoire et dans les études sur terrain comme biomarqueur pour plusieurs contaminants (Alman *et al.*, 1998 ; Fenet, 1998 ; Yu *et al.*, 2000 ; 2002).

En marge de la GST cytosolique, il existe la GST membranaire, une isoenzyme qui est activée par les espèces réactives de l'oxygène. Elle participe à la protection cellulaire vis-à-vis des dommages induits par des molécules oxydantes (Aniya et Anders, 1989).

Nos résultats relatifs au dosage de la GST dans l'hépatopancréas des femelles adultes et chez les alevins des *G.affinis* traités au carbofuran aux concentrations sublétales testés révèlent une stimulation de l'activité de la GST en réponse aux effets de la plus faible concentration du carbofuran (1/4 de la DL₅₀). Cette réaction s'amplifie avec la dose du carbofuran et reste progressive jusqu'à la fin de l'exposition (40 jours).

D'après les résultats de notre travail, nous constatons que l'augmentation de la teneur en GST est accompagnée de la diminution du taux de GSH. Selon Chatter glu et Bhattacharya, (1984) le carbofuran conjugué par le GSH est démenagé par la GST dans le but de diminuer son effet toxique sachant que la GST fait parti des enzymes substrats spécifiques qui catalysent la conjugaison de GSH avec les xénobiotiques favorisant leur élimination de l'organisme (Leaver *et al.*, 1992 ; Malmezet, 2000).

Dans notre travail nous signalons que l'augmentation de l'activité GST est plus importante chez les alevins que chez les adultes. Les effets du 1/4 de la DL₅₀ induisent chez les alevins une stimulation de 82% au premier mois, 152% au deuxième mois et 184% au troisième mois, alors que chez les femelles adultes, la même dose du carbofuran entraîne

seulement une augmentation de 55% et 79% respectivement après 15 et 40 jours de traitement.

L'induction de l'activité de la GST a été observée par Leinio *et al.*, (2005) chez *Perna viridis* exposé aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et aux pesticides organochlorés et par Yao *et al.*, (2002) chez *Sogatella furcifera*, un insecte ravageur de riz récolté au niveau du site pollué de Zhejianj (Chine).

La stimulation de cette activité a été signalée également chez les larves de *Grassoshea gigas* (Guiniou *et al.*, 2007) chez le crabe, *Carsinus maenas* (Morales-caselle *et al.*, 2008), chez *Mytilus edulis* (Gagné *et al.*, 2008) exposés à une pollution par les hydrocarbures respectivement sur la Cote atlantique française, la cote espagnole et la cote canadienne.

Manjit *et al.*, (2006) ont démontré que l'activité du glutathion S-transférase est stimulée tant après l'exposition aigue que chronique au carbofuran. L'augmentation était beaucoup plus haute chez les animaux chroniquement exposés en comparaison avec les animaux exposés à une pollution intense.

Une augmentation de la GST a été également obtenue chez les femelles adultes et les alevins de *G.affinis* traités pendant 60 jours par le halofénozide. Les mêmes effets ont été observés avec le malathion et le cadmium (Rouachdia et Roquia, 2006). Des effets sur des alevins traités au cadmium ont été également observés par Chouahda (2006).

Des résultats similaires ont été observés après exposition de divers organismes à différents xénobiotiques. Chez les femelles adultes de *G.affinis* traitées au diflubenzuron (Zaidi, 2005), chez *Angilla angilla* du lac woodruff (Giallagher *et al.*, 2001), chez *Poecilia reticulata* (Frasco et guilhermino, 2002) exposée à la naphtalène.

Braia, (2009) a pu constaté une augmentation progressive jusqu'à la fin de traitement (24h) de la GST dans le manteau de *Donax trunculus* traité par le malathion. Avec le même xénobiotique le résultat est comparable après 28h d'exposition dans le foie des rats (Naraharisetti *et al.*, 2008), chez *Anopheles arabiensis* Patton (Matambo *et al.*, 2007), chez les larves de *Carponisa niponensis* (Zhnj *et al.*, 2007) et chez les rats (Brocardo *et al.*, 2005).

Les métaux lourds semblent eux aussi augmenter l'activité de la GST. Une induction de la GST a été remarquée dans le foie et le rein des crabes (Dautrenepuits *et al.*, 2002), chez les poissons (Ritola *et al.*, 2000) et (Iqubal *et al.*, 2000).

Différents auteurs ont remarqué la stimulation de la GST chez *Mytilus trossulus* exposé à 50µg/l de cadmium pendant 2 semaines (Pempkowiak *et al.*, 2006). Ola-Mudathir *et al.*, (2008) sont arrivés aux mêmes résultats chez les rats traités pendant 7 jours avec 1,5 mg de

cadmium pour 100 g de poids corporel. Une induction de la GST provoquée par une exposition au cadmium a été observée tout aussi bien chez *Gambusia affinis* (Rouachdia et Roquia, 2006) que chez *Daphnia magna* traité avec 25µg/l (Jemec *et al.*, 2007), ainsi que dans le foie de la dorade *Sparus aurata* exposée pendant 48h à une concentration de 200µg/Kg (Bouraoui *et al.*, 2008).

La stimulation de l'activité de GST s'explique par une biotransformation des xénobiotiques et des substances androgéniques. La GST joue donc un rôle important dans la neutralisation et la détoxification de certains xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité et en facilitant ainsi leur élimination (Van der Oost *et al.*, 2003). Donc le rôle physiologique de la GST est dans la protection de l'organisme contre de nombreux composés toxiques et ceci a été démontré chez les poissons (Gallagher *et al.*, 2001 ; Ait Aissa *et al.*, 2003), et les Bivalves (Hugg *et al.*, 1992 ; Burgeot *et al.*, 1996 ; Sties *et al.*, 1996).

1.3. Effet sur l'activité de la catalase (CAT)

La catalase est une enzyme du système antioxydant. Elle est majoritairement localisée dans le cytosol et dans les péroxysomes principalement du foie et des reins où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Sa rapidité est l'une de ses caractéristiques, elle peut convertir 40 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en une seule seconde.

Elle apporte une information importante quant à l'exposition des organismes à des polluants inducteurs de stress oxydant et à leur capacité de défense vis-à-vis de ce dernier. Elle peut être mesurée soit par détermination monomérique de l'oxygène dégagé soit par dosage par le permanganate du H₂O₂ non transformé.

Dans notre travail les résultats ont montré que les deux doses de carbofuran utilisées ont causé une augmentation de l'activité de la catalase dans l'hépatopancréas des femelles adultes et chez les alevins de *Gambusia affinis* qui se prolonge jusqu'à la fin du traitement. Ceci pourrait être dû à une dégradation des radicaux oxygénés, et une catalyse de la conversion du peroxyde d'hydrogène (toxique pour les cellules) en oxygène gazeux et en eau selon la réaction suivante :



Cette augmentation a été enregistrée sur le muscle de *Hexaplex trunculus* (Romes *et al.*, 2005) et sur le cerveau des rats (Rai. et Sharma, 2007).

1.4. Effet sur l'activité de l'acétylcholinestérase cérébral (AChE)

Au niveau des jonctions neuromusculaires et interneuronales, l'influx nerveux est transmis grâce à la libération d'acétylcholine par la terminaison nerveuse dans l'espace synaptique, ce qui permet la transmission du message nerveux d'une cellule à une autre. Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est rapidement inactivée par l'acétylcholinestérase, ce qui permet au système de revenir à son état de repos.

L'inhibition de l'enzyme par de nombreux toxiques entraîne une accumulation du médiateur chimique dans les espaces synaptiques qui maintiennent de ce fait une transmission de l'influx, laquelle conduit généralement à la tétanie (Badila 1995 ; Boquené, 1996 ; Bains 2000).

Les mesures de l'activité de l'AChE que nous avons effectuées dans le cerveau de *G.affinis* après une durée d'exposition de 15 à 40 jours aux doses sublétales testées, montrent que le carbofuran induit chez cette espèce une réponse significative se traduisant après 15 jours d'exposition, par une réduction de l'ordre de 30 à 37% de l'activité de l'AChE.

Ces valeurs atteignent 50% après 40 jours d'exposition au 1/3 de DL50. Nos résultats sont en accord avec ceux de Renden-Von Osten *et al.*, (2005) qui rapportent que le carbofuran inhibe après 24h d'exposition, l'activité de l'AChE dans le cerveau de *Gambusia yucatana*.

De nombreux autres travaux ont démontré la capacité de divers xénobiotiques à inhiber in vitro et in vivo chez différentes espèces animales, l'activité de l'AChE.

La durée d'exposition, la concentration du xénobiotique, l'âge de l'individu et le stress peuvent influencer la sensibilité de l'activité de cette enzyme (Hogan, 1970 ; Zinkelrad, 1987 ; Fairbrother *et al.*, 1991 ; Chniko *et al.*, 1997).

Ainsi le dosage de l'AChE dans les têtes des alevins et des femelles adultes de *G.affinis* exposées au halofénozide révèle une inhibition de l'AChE après 60 jours de traitement.

Chuiko, (2000) ; Fernandez-Vega *et al.*, (2002) et Bernhoorn et Vuren, (2004) ont souligné eux aussi une diminution de l'AChE respectivement dans le cerveau de plusieurs familles de poissons exposées à un pesticide organophosphoré (DDVP), dans le muscle et le cerveau d'*Anguilla anguilla* traité par différentes concentrations d'un herbicide (le thiobencarbe) et dans le muscle d'autres poissons (*Oreochromis moscabicus* et *Labeo umbratus*) dans un écosystème pollué.

Une exposition de 24h au Chlorpyrifos inhibe l'activité de l'AChE dans le cerveau de *G.ucatama* (Rendon-Von Osten *et al.*, 2005).

Une diminution de l'activité de l'AchE au niveau de l'hépatopancréas chez les femelles adultes de *G.affinis* exposées au diflubenzuron a été également rapportée par Zaidi, (2005).

L'exposition au cadmium entraîne une diminution de ce paramètre seulement chez les femelles adultes (Chouahda, 2006).

Des résultats exprimant la diminution de l'activité de l'AchE dans les muscles et les cerveaux rapportés chez *Macoma balthica*, un mollusque bivalve dans le Nord de la mer baltique (Leino *et al.*, 2005), chez *Ceras todermaglaucum* exposé aux métaux lourds dans le golfe de Gabès (Machreki-Ajmi *et al.*, 2008), chez *Cronia contracta* vivant sur un site pollué par les métaux lourds de la Côte indienne (Gatant *et al.*, 2006) et chez *Hexaplex trunculus* exposé au carbofuran, cadmium et cuivre dans la lagune de Bizerte (Roméo *et al.*, 2006).

2. Effet du carbofuran sur la croissance des alevins

La croissance est considérée comme un indicateur de pollution chez les organismes vivants (Widdows *et al.*, 1997 ; Gomot, 1997).. Elle représente un élément essentiel d'aptitude et peut avoir un impact sur le devenir des populations naturelles (Burrows & Hughes, 1990 ; Wo *et al.*, 1999). La croissance d'un animal dépend de l'efficacité de son métabolisme qui est abaissée par les xénobiotiques (Folker-Hansen *et al.*, 1996).

L'analyse de la croissance estimée par rapport à la longueur et au poids absolu des alevins traités avec le 1/4 de la DL50 du carbofuran révèle une diminution des deux paramètres à partir du 2^{ème} mois d'exposition. Les résultats de l'analyse statistique font apparaître l'existence des différences significatives et très significatives respectivement pour la taille et le poids absolu. Différences confortées par ANOVA sont significatives pour la taille et très significatives pour le poids absolu.

Au 3^{ème} mois les différences sont très significatives pour les deux paramètres.

3. Analyse histologique des ovaires

La vitellogenèse est une phase importante dans la reproduction des poissons téléostéens au cours de laquelle l'ovocyte accumule les réserves nutritives pour arriver à maturité. Elle comporte deux étapes :

- La première étape est la vitellogenèse endogène : elle consiste en la mise en place des métabolites nécessaires à la croissance ultérieure de l'ovocyte.
- La deuxième étape est la vitellogenèse exogène : elle est caractérisée par l'incorporation de la vitellogenine, grosse molécule lipoprotéique

Chez *G.affinis* la maturation ovocytaire comprend 4 stades successives où l'ovocyte immature de volume assez petit acquiert pendant l'ovogenèse, des inclusions de vitelline qui fusionnent ensemble pour donner à l'ovocyte mure une taille importante. Au cours de la phase de repos les ovocytes du stade 1 sont prédominants. En phase d'activité de vitellogenèse les ovocytes du stade 4 sont plus nombreux.

En fin de vitellogenèse, la maturation ovocytaire et l'ovulation peuvent intéresser une partie où la totalité du stock d'ovocytes.

Dans ce travail l'observation des coupes sériées de l'ovaire au cours des différentes étapes de l'ovogenèse nous a permis de suivre l'évolution des principales structures qui composent l'ovaire des femelles adultes de *G. affinis* témoins et de celles traitées au carbofuran à la concentration 1/4 de la DL50.

Les ovaires des poissons non traitées présentent des ovocyte à différents stades de maturation avec une nette prédominance des ovocytes du stade (4) et l'apparition d'un oviducte illustrant la présence d'un ovaire post-partum ; l'histologie des ovaires des femelles traitées révèle en revanche une altération de la cavité ovarienne avec réduction du nombre d'ovocytes et une dégénérescence folliculaires.

Des travaux réalisés par Ram et al., (2001) sur l'impact du carbofuran sur les gonades de *Channa punctatus* révèlent une inhibition significative du développement des ovaires associée à des anomalies dégénératives des ovocytes.

4. Impact neurochimique et comportemental

Les carbamates comme dans le cas d'autres insecticides (organophosphorés), sont connus pour altérer les fonctions neurologiques. En effet, leur cible privilégiée est l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans la transmission cholinergique (Trotter et al., 1991; Grue et al., 1997!; Heath et al., 1997).

L'inhibition de l'AChE induite par les carbamates conduit à une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (Zinkl et al., 1991!; Saglio et al., 1996).

La relation entre l'impact neurochimique et comportementale des insecticides et en particulier des organophosphorés a été très peu étudiée chez les poissons (Dutta et *al.*, 1992 ; Pavlov et *al.*, 1992).

Afin d'apporter notre contribution à l'étude de ces relations, nous avons analysé dans ce travail en parallèle, les effets des mêmes conditions d'exposition (concentration et durée) au carbofuran sur l'activité de l'AChE cérébrale et sur l'activité de nage chez *Gambusia affinis*.

Nos résultats révèlent que le carbofuran semble agir de manière dose-dépendance puisque l'effet de l'insecticide augmente avec la concentration et la durée d'exposition. La même relation a été également mise en évidence chez *Carassius auratus* exposé au carbofuran (Bretaud et *al.*, 2001) et le saumon atlantique (*Salmo salar*) sous l'effet du penitritihion (insecticide organochloré).

L'estimation de l'importance de déplacement de *Gambusia affinis* que nous avons menée en parallèle avec les mesures de l'acétylcholinestérase, révèle aux doses expérimentales des effets significatifs qui se maintiennent jusqu'à 6h d'exposition. L'effet est très significatif au bout de 6h avec le 1/3 DL50. Ces effets se traduisent par une diminution de l'activité de nage de l'ordre de 10, 20 et 33% sous l'action du 1/4 DL50 et de 18, 40 et 50% sous celle du 1/3 DL50 respectivement après 2h, 4h et 6h d'exposition au carbofuran. Ces résultats semblent en accord avec ceux observés chez *Cyprinus carpio* (carpe commune) exposée pendant quatre heures à 10µg/l de carbofuran (Anonyme, 1991).

A des concentrations proches des valeurs de toxicité létales, des perturbations de l'activité locomotrice et de la vitesse de nage des poissons ont été également rapportées en réponse à l'exposition aux carbamates et à divers insecticides organophosphorés (Petterson, 1974 ; Rand, 1977 ; Little et al., 1990 ; Heath et al., 1993).

Dans la gamme des concentrations et des durées d'expositions testées, l'activité de l'AChE cérébrale s'est révélée plus sensible au 1/4 DL50 du carbofuran que l'activité locomotrice. En effet une diminution de 20% de l'activité de déplacement n'est observée qu'après 4h d'exposition, lorsque l'activité de l'AChE est inhibée à 37%.

Avec le 1/3 DL50 une inhibition de l'activité de déplacement de l'ordre de 18% est apparue après 2h d'exposition, période au cours de laquelle 37% de réduction d'acétylcholinestérase ont été observés.

Des observations concernant l'impact du carbofuran sur le comportement et l'activité de l'AChE de jeunes brochets (Amblard et *al.*, 1998) et de *Carriassus auratus* (Bretaud et *al.*,

2001), ont également montré un effet de l'exposition sur l'AChE avant que ne se manifeste un effet sur la capacité de nage.

En réponse à l'exposition au malathion (insecticide organochloré), Post et Leasure (1974) ont aussi noté que la capacité de nage de juvéniles de Salmonidae se trouvait moins diminuée (24 à 34%) que l'activité de l'AChE (55%).

En revanche Dutta et *al.*, (1992) et Rosic et *al.*, (1974) ont constaté que l'activité de nage était plus affectée que l'activité de l'AChE respectivement chez *Leponis machrochirus* (la perche Soleil) exposée au diazinon et chez *Seranus scriba* (Serranidae) ayant reçu une injection subcutanée d'un organophosphoré

Ainsi, les perturbations comportementales observées chez *Carrassius auratus* (Cyprinidea) en réponse à des expositions à court terme au carbofuran (Saglio et *al.*, 1996) et l'inhibition significative de l'activité de l'AChE au niveau du cerveau et du muscle de cette espèce exposée dans les mêmes conditions à ce carbamate (Breteaud et *al.*, 2000), suggèrent que les perturbations comportementales pourraient être étroitement liées à l'action de ce pesticide sur la transmission cholinergique.

V. Conclusion

Notre travail a porté sur l'évaluation des réponses du système de détoxification des femelles adultes de *Gambusia affinis* au cours de la vitellogénèse, traitées par le carbofuran aux doses sublétales (5,75 et 7,66 mg/l) (1/4 et 1/3 de la DL_{50}) diluées dans l'eau d'élevage de ce poisson larvivor.

Des résultats obtenus il en ressort que les biomarqueurs hépatopancréatiques des femelles adultes montrent une réduction significative du taux de GSH avec une induction des activités enzymatiques (GST, CAT) et une inhibition de l'AchE cérébrale durant les 40 jours d'exposition.

Chez les alevins, on note une diminution significative de la croissance à partir de 2 mois d'exposition et du taux de GSH avec une induction des activités enzymatiques (GST, CAT) durant les 3 mois d'évolution.

La réponse des biomarqueurs des femelles adultes de *G. affinis* et de leurs alevins montre que leur système de détoxification répond aux doses sublétales (1/3 et 1/4 de la DL_{50}) du carbofuran.

L'impact du carbofuran sur les réponses neurochimiques et comportementales aux doses et durées d'exposition testées révèlent des perturbations de l'activité locomotrice qui s'associent à une inhibition significative de l'acétylcholinestérase.

Sur le plan topographique de l'ovaire, le carbofuran induit une dégénérescence folliculaire avec réduction du nombre d'ovocytes durant le traitement.

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

En perspectives, notre travail sera poursuivi dans le cadre d'une thèse de doctorat par l'évaluation de la genotoxicité du carbofuran via le test micronoyaux et le dosage de vitellogenine.

Résumé

Ce travail porte sur l'évaluation de certaines réactions d'un poisson de l'espèce *Gambusia affinis* à la présence d'un carbamate, le carbofuran, un pesticide d'usage fréquent et très souvent rencontré dans les écosystèmes aquatiques.

L'expérimentation s'est déroulée dans des conditions de laboratoire. Elle a consisté à utiliser le 1/3 et le 1/4 de la DL_{50} du carbofuran correspondant à 7,66 mg/l et 5,75mg/l dilués dans l'eau de divers lots de femelles en phase de reproduction et des alevins en période de croissance.

L'évaluation de l'impact du carbofuran sur *Gambusia affinis* a consisté à observer chez les femelles exposées le comportement de nage, à doser certains biomarqueurs du stress oxydatif et à réaliser un suivi histologique des gonades. Chez les alevins, l'étude a porté sur la variabilité de leur croissance et de quelques marqueurs biochimiques.

L'exposition des femelles adultes à des doses de 7,66 et 5,75 mg/l de carbofuran, induit au niveau hépatique une baisse des teneurs de GSH et une hausse de l'activité de la GST et de la catalase. L'analyse statistique fait apparaître l'existence de différences hautement significative des teneurs de GSH et de l'activité de la GST chez les femelles exposées pendant 30jours au 1/3 de la DL_{50} par rapport aux femelles témoins ; mais en ce qui concerne l'activité de la catalase, les femelles de ce même lot montrent des différences très significatives. L'activité de l'AchE au niveau du système nerveux central montre une baisse très significative et hautement significative respectivement à 15j et 40j d'exposition à la dose de 7,66mg/l de carbofuran.

L'estimation de l'activité de déplacement des femelles révèlent des ralentissements proportionnels aux doses du carbofuran et aux durées d'exposition La comparaison des moyennes des activités de déplacement par ANOVA montre que ces diminutions sont significatives jusqu'à 4h d'exposition aux doses 5,75mg/l et 7,66mg/l de carbofuran. Elles sont significatives à très significatives après 6h d'exposition respectivement au 1/4 et au 1/3 de la DL_{50} . Dans les mêmes conditions, l'activité de l'AchE cérébrale s'est révélée plus sensible au carbofuran que l'activité locomotrice.

Chez les alevins exposés au 1/4 de la DL_{50} , nous notons, en comparaison avec les témoins, une diminution de la taille et du poids absolu respectivement significative et très significative à partir du 2^e mois d'exposition. Au 3^e mois la différence est très significative pour les deux paramètres. La GSH affiche une baisse des teneurs très significative et hautement significative

respectivement après 2 et 3 mois d'exposition. En ce qui concerne la GST et la catalase, leur activité montre une hausse très significative après 3 mois d'exposition.

L'étude histologique des gonades montre chez les femelles traitées une altération de l'épithélium et une dégénérescence folliculaire avec baisse du nombre d'ovocytes.

Mots clés : *Gambusia affinis* ; carbofuran ; biomarqueurs ; histologie des gonades ; comportement de nage.

Abstract

This work is about the assessment of certain reactions of a fish of *Gambusia affinis* species with the presence of carbamate “carbofuran”, it is a usual pest destroying, and it's often encountered in aquatic environmental systems.

The experimentation has occurred in laboratory conditions; it consists in the use of the 1/3, and the 1/4 of DL50 of carbofuran, corresponding to 7,66mg/l and 5,75mg/l diluted in water of different lots of females in stage of reproduction.

The impact of carbofuran consisted of observing the females which are exposed to the swimming behaviour, to dose certain biomarkers of oxidative stress and to achieve a histological monitoring of gonades

When adult females are exposed to 7, 66 and 5,75mg/l of carbofuran induced hepatic level, a decrease of amount of GSH, and an increase of the activity of GST and of catalase. The statistical analysis shows the existence of differences highly significant of amounts of GSH and of the activity of GST with females exposed for 30 days to the third (1/3) of DL50 in relation witness-females, but, as concerns the activity of catalase, the females of the same lot show very significant differences.

The activity of AchE at the level of central nervous system shows a very significant decrease and highly significant to 15 days, and 40 days of exposure to the amount of 7,66 mg/l of carbofuran.

The activity of displacement of females reaches its minimum value, after 6 hours of exposure to the third of DL50. The analysis of the number of conditions defining a physical or a chemical system with two criterions of classification shows the existence of interaction of amounts in a dose-duration of exposure

With the Alvins exposed to the third of DL50, we notice in comparison with the witness, a decrease in the height and the absolute weight respectively significant and very significant from the second month of exposure. At the third month, the difference is very significant for the 2 parameters. The amounts of GSH decrease very significant and highly significant respectively after 2 and 3 months of exposure. Concerning the GST and the catalase, their activity shows significant increase after 3 months of exposure.

The histological gonad study shows in the females treated a modification of the epithelium and for a follicular degeneracy with a decrease of the number of the oocytes.

Key words: *Gambusia affinis*, carbofuran, biomarkers, histology of gonad; swimming behaviour.

ملخص

يتعلق هذا العمل بتقييم بعض ردود الافعال لسمك المستنقعات من نوع (*Gambusia affinis*) وبحضور الكربمات وهو الكربوفوران وهو مبيد مقاوم للطفيليات كثير الاستعمال وكثير ما نصادفه في الانظمة البيئية المائية. وقد جرت التجربة في ظروف مخبرية . وقد اشتمل على ثلث و ربع DL 50 للكربوفوران المنطبق على 7.66 مغ / لترو 5.75 / لتر والمخفف في الماء لمختلف حصص الاناثي في مرحلة التكاثر. وقد اشتمل اثرالكربوفوران على ملاحظة تصرف السباحة لدى الاناثي وكذلك عل تعيين المعرضة للتجربة وكذلك على تعيين كميات المسجلات الاحيائية للضغط القابلة للتاكسد وتحقيق متابعةمتعلقة بعلم الانسجة للغدد التناسلية (المناسل) . ان تعرض الاناثي البالغين لجرعات 7.66 و 5.75 مغ / لتر للكربوفوران المتولد - على مستوى الكبد- على نقص في محتويات GSH وزيادة في نشاط GST وكذلك مادة الكتالاز. ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروق جد معتبرة لمحتويات GSH ونشاط GST لدى الاناثي المعرضة لمدة 40 يوم بثلث DL 50 بالنسبة للاناثي الشاهدات. لكن فيما يتعلق بنشاط الكتالاز فان اناثي نفس الحصة تظهر فروق جد معتبرة . ويظهر نشاط AchE على مستوى النظام العصبي المركزي نقص جد معتبر على التوالي ل15 يوم و 40 يوم من التعرض لجرعة 7.66 من الكربوفوران . ويبلغ نشاط تنقل الاناثي قيمتها الادنى بعد 6 ساعات من التعرض لثلث DL 50. ويظهر تحليل عدد من الظروف المحددة لنظام فيزيائي يمكن تغييرها اعتباريا مع الاحتفاظ بتوازن هذا النظام – وهذا بمقياسين من للترتيب- يظهر وجود تفاعل بين الجرعة ومدة التعرض. لدى صغار السمك المعرضين لربع DL 50 نلاحظ مقارنة مع الشاهدات - نقص في القامة و الوزن المطلق بالتوالي معتبر وجد معتبر ابتداء من الشهر الثاني للتعرض. وفي الشهر الثالث يكون الفرق جد معتبر بالنسبة للمقياسين. ويظهر GSH نقص في المحتويات جد معتبرة ومعتبرة بشكل مرتفع بالتوالي بعد الشهر الثاني من التعرض. فيما يتعلق ب GST والكتالاز يظهر نشاطها زيادة جد معتبرة بعد الشهر الثالث من التعرض. وتظهر دراسة في مجال علم الانسجة للغدد التناسلية لدى الاناثي المعالجة تظهر تغير يطرا عل الظهار(نسيج يكسو سطحا او يبطن تجويفا) وانحلال خلوي جراحي مع نقص لعدد من م المشيجات انثوية.

الكلمات الاساسية/

- GAMBUSIA AFFINIS
- الكربوفوران
- المسجلات الاحيائية
- علم انسجة الغدد التناسلية
- سلوك

Références Bibliographiques

- Aissaoui R., 1998.** Contribution à l'étude de la toxicité d'un insecticide organochloré, le lindane : impact sur quelques organes d'un poisson Téléostéen d'eau douce, *Gambusia affinis*. Thèse de Magistère. Université d'Annaba. Algérie.
- Ait Aissa S., Palluel O. et Porcher J-M., 2003.** Biomarqueurs précoces d'écotoxicité. INERIS, rapport final DRC 00-102. 49 pages.
- Almar M., Otero, L., Santo C. et Ganzalez Gallego J., 1998.** Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health.*, 33: 769-783.
- Amblard G., Bry C., Toutant J.P. & M. Arpagaus, 1998.** Effets de l'exposition à un insecticide carbamate, le carbofuran, sur les performances de jeunes stades de brochet (*Esox lucius* L., 1758): résultats préliminaires. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, (350-351): 529-534.
- Aniya, Y., Anders, M., 1989.** Activation of rat liver microsomal glutathione S transférase by reduced oxygen species . *Journal of Biological chemistry* 264:1998-2002
- Badila S., 1995.** regulation and research issues related to cholinesterase inhibition. *Toxicology.*, 102:105.
- Bainy A.C.D., 2000.** Biochemical responses in peneids caused by contaminants. *Aquaculture.*, 191: 163-168.
- Begum G., Vijayaraghavan S., 2001.** Carbofuran toxicity on total lipids and free fatty acids in air breathing fish during exposure and cessation of exposure- *in vivo*. *Environ Monit Assess.* 70: 233-239.
- Begum G ., 2004 .** Carbofuran insecticide induced biochemical alteration in liver and muscle tissue of the fish, *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquar Toxicol* 66: 83-92.
- Bent M et Dahalstrom P., 1991.** Guide des poissons d'eau douce et pêche. Delachaux et Nistlé. Paris. P 152.
- Bernhoorn I.E.J. and Van Vuren J.H.J., 2004.** The use of different enzymes in feral freshxater fish as a tool for the assessment of water pollution in Africa; *Ecotoxical. Environ. Saf.*, 59:180-185.
- Blaise, C, Gagne, F., Pellerin J., hansen, P.D., Trottier, S., 2002.** Molluscan shelfish biomarkers study of the quebec, canada saguenay fjord whith the soft-shell clau.
- Bocquené G. (1996).** L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité : application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse de Doctorat, Ecole pratique des hautes études. 250p.
- Bortone S.A. and Davis W.P., 1994.** Fish intersexuality as indicator of environmental stress. *Bio. Science.*, 44: 165-172.
- Bouzioukh F., 2000.** Effets secondaires de quelques insecticides nouveaux sur la croissance, le métabolisme et la reproduction chez un poisson larvivoire *Gambusia affinis* : aspect morphologique, histologique et biochimique. Thèse de Magistère. Université d'Annaba. Algérie.
- Bradford MM., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein–dye binding. *Analy Biochem* 72:248–254
- Braia., 2009.** Toxicité conparee du malathion et du cadmium a l'egard de Donax trunculus (Mollusca, Bivalvia) et mesures de biomarqueurs. D'ANNABA. Algérie.
- Bretau S., Toutant J.P. & P. Saglio, 2000.** - Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxical. Environ. Saf.*, 47:!!117-124.

Buet, A., Roche, H., Habert, H., Caquet, T. & Ramade, F. (1998). — Evaluation du niveau de contamination par les micropolluants organiques des poissons de la Réserve de Biosphère de Camargue. Proposition d'un plan expérimental pour la validation de biomarqueurs utilisables *in situ*. *Ichthyophysiological Acta*, 21 : 61-76.

Buet, A., Roche, H., Anhem, S. & Ramade, F. (2001). — Méthode d'évaluation du niveau de contamination par des polluants organiques persistants des communautés de la Réserve de Biosphère de Camargue. *Ichthyophysiological Acta*, 23 : 57-70.

Burgeot T., Boquené G., Porte C., Dimmet J., Santella R.M., D.L.P.L.M., Pfholl-Leszkowies A., Raoux G., Galgani., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the Northwestern mediterranean sea. *Mar.Ecol.Prog. Ser.*, 131:125-141.

Bushway R.J., Hurst H.L., Perkins L.B., Tian L., Cabanillas C.G., Young B.E.S.,Ferguson B.S. & H.S. Jennings, 1992. Atrazine, alachlor, and carbofuran contamination of well water in central Maine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**: 1-9.

Chambole P., 1973. Recherche sur les facteurs physiologiques de la reproduction chez les poissons "ovovivipares". Analyse expérimental sur *Gambusia sp.* Extrait de la revue "bulletin biologique", tome CVII, n°1.

Chatterjee S. and Bhattacharya S., 1984. Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testideneus* (Bloch). *Toxicol. Lett.*, 22:187-198.

Chouahda S., 2006. Impact de deux xenobiotiques (cadmium et halofénoside) sur *Gambusia affinis* et évaluation du stress environnemental dans le golf de ANNABA par l'utilisation de *Donax trunculus*. Mémoire de Magister. Université d'ANNABA.

Chuiko G.M., Zhelnin Y.Y et Podgornaya V.A., 1997. Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus L.*): a freshwater fish from Northwest Russia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107 : 251-257.

Chuiko G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.*, **127**: 233-242.

Dautrenepuits C. et Betoull S., 2002. Réponse au cuivre du système antioxydant de la Crape (*Cyprinus carpio L.*) saine ou parasitée par le cestode *ptychobotrium sp.* *Bull. Soc. Zool. Fr.* ; **12**(4) : 305-314.

Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, Ch., 1999 ; Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio L.*) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* **62**, 731-742.

Drarja-Beldi H., 1993. Contribution à l'étude de *Gambusia affinis* (Téléostéen, vivipare), croissance des alevins, étude du cycle sexuel et corrélation métabolique. Thèse de Magistère. Université d'Annaba. Algérie.

Drarja-Beldi H., 2001. Reproduction de *Gambusia affinis* (Poisson, téléostéen) dans la région de Annaba. *Synthèse.*, **9** :15-18.

Drarja-Beldi H. et Soltani N., 2003. Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathione activity in mosquitofish, a non-target species. *Comm. Appl. Biol. Sci.* Ghent University., **68** (4a): 299-304.

Dreze V, Gaulay O, Monod G., 1998. Development of mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) population in lentic mesocosms. Perspectives for ecotoxicological studies. *Bull. fr. pêche pisc.* **350-351**: 465-477.

Drysdale D.T and Bortone., 1989. Laboratory induction of intersexuality in the mosquitofish, *Gambusia affinis*, using paper mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**: 611-617.

Dutka, B.J., 1998. Forword. In « *Microscal testing in aquatic toxicology* », WELLS P.G., LEE., BLAISE C. (ed), CRC Press, Boca Raton.

Dutta H., Marcelino J. & C. Richmonds, 1992. Brain acetylcholinesterase activity and optomotor behavior in bluegills, *Lepomis macrochirus* exposed to different concentrations of diazinon. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, **100**: 331-334.

Ellman GL, Courtney D, Andres V Jr, Featherstone RM.,1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**:88–95.

Fairbrother A., Marden B.T., Bennet J.K and Hooper M.J., 1991; methods used in determination of cholinesterase activity in: Mineau p.(Ed), *Chemicals in Agriculture. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo*, Vol 2:35-71.

Fenet H., Casellas C. et Bontoux J.,1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in european eel and rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**: 137-143.

Fernandez-Vega C., Sancho E., Fernando M.D and Andreu-Moliner E., 2002. Thiobencarb induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pestic. Biochem. And Physiol.*, **72**:55-63.

Flammarion P., Brion F., Palazzi X., Babut M., Garric J., Migeon B., Noury P., Thybaud E., Tyler C.R., 2000. Estrogenic effects on chub (*Leuciscus cephalus*): induction of vitellogenin and effects on the testicular structure. *Ecotoxicology*, **9**: 127-135.

Frasco M.Fand guilhermino L., 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and biochemistry.*, **26**:149-156.

G. Amblard (1), C, Bry Toutan (2) et M. Arpagaus 1998. Effets de l'exposition à un insecticide carbamate 3350-351 :529-534

Gagné F., Burgeot T., Hellou J., St-Jean S., Farcy E., Blaise C., 2008. Spatial variations in biomarkers of *Mytilus edulis* mussels at four polluted spanning yhe Northern Hemisphere. *Environ Res.*, **107**:201-217

Gallahher E.P., Gross T.S and Sheehy K.M., 2001. Decreased glutathione S-transférase expression and activity and altered sex xteroids in lake Apoka brown bulheads (*Ameriurus nebulosus*). *Aquatic Toxicology.*, **55**:223-237.

Gomot A., 1997.Dose dependent effects of cadmium on the growth of smails in toxicity bioassays. *Archive of Environmental Contamination and Toxicity.* , **33**:209-216.

Goodsell J.A. and Kats L.B., 1999. Effect of introduced mosquitofish on pacific treefrogs and the role of alternative prey. *Conservatio Biol.* , **13**(4): 921- 924.

Grue C.E., Gibert P.L. & M.E. Seeley, 1997. Neurophysiological and behavioral changes in nontarget wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticide: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Am. Zool.*, **37**: 369-388.

Gupta R.C et Kadal W.L., 1989. Concerted role of carboxylesterase in the potentiation of carbofuran toxicity by ISA-OMPA pretreatment. *J toxicol Environ Health.* **26**:447-456.

Gupta R.C., 1994. Carbofuran toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **43**: 383-418.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB.,1974. Glutathione-Stransferases: on the first enzymatic step in mercapturic acid biosynthesis. *J Biol Chem* **249**:7130–7137.

Heath A.G., Cech J.J. Jr, Zinkl J.G. & M.D. Steel, 1993. Sublethal effects of three pesticides on Japanese Medaka. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**: 485-491.

Heath AG, Cech JJ Jr, Brink L, Moberg P, Zinkl JG.,1997. Physiological responses of fathead minnow larvae to rice pesticides. *Ecotox Environ Saf* **37**:280–288.

Hogan, 1970 ; Zinkelrad, 1987

Huggett, R.J., R.A. Kimerle, P.M. Mehrle Jr & H.L. Bergman, eds., 1992. Biomarkers. Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic Stress. *Boca Raton, Fla., Lewis Publishers*, 347 pp.

Hurtig H., 1972. Long-distancetransport of pesticides. In Matsumura F., Boush G.M., Misato T. *Environmental toxicology of pesticides. Academic Press, New York*: 257-280.

Iqbal A., Tariq H., Masroor F., Hitendra S.C., Swatantra K.J., Mohammad A. and Sheikh R., 2000. Nduction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*chamma punctatus boh*) is abiomarker of paper mill effluent exposure; *Biochem; Biophys; Acta.*, **1523**:37-48.

Jakanovic M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *toxicology.*, **166** :139-160.

Jaque bruslé- Jean pierre quignard , 2001. Biologie des poissons d'eau douces europeenes- collection aquaculture. Pisciculture p 535-544.

Jemec A., Drobne D., Tisler T., Trebse P., Ros M., Sepcié K., 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transférase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, **144**:303-9.

Koya Y., et Kamia E., 2000. Environmental regulation of annual reprodutive cycle in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *J. Exp. Zool.*, **286**: 204-221.

Langloi, C. & L. Lapierre, 1989. Utilisation de l'écologie et de l'écotoxicologie de communautés biologiques pour mesurer l'état de santé des écosystèmes du fleuve Saint-Laurent. Montréal, Symposium sur le Saint-Laurent, novembre 1989. 11pp.

Lascombe., 1997. Les variables biologiques au service de la gestion des écoqystèmes aquatiques. In séminaire national « *Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques* » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994, CEMAGREF (EDs), p. 27-37.

Leaver M.J., clarke D.J and George S.D., 1992. Molecular studies of the phase 11 xenobiotic conjugative enzymes of marine pleuronectid flatfish. *Aquat. Toxicol.* **22** :265-278.

Leineo S., Lehtoten K.K, 2005. Seasonal variability in biomarkers in tfe bivalves *Mytilus edilus* and *Macoma Balthica* from the northen Baltic sea. *Comp.Biochem.Physiol.C Toxicol.Pharmacol.*, **140**: 408-21.

Leveque C., 1997. Etat de santé des ecosystems aquatiques : l'interet des variables biologiques. In séminaire national « *Les variables biologiques ; des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques* » Ministère de l'Environnement, 2-3 Novembre 1994, CEMAGREF (EDs), p. 13-26.

LittleE.E., Archeski R.D., Flerof B.A. & V.I. Kozlovskaya, 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**: 380-385.

Lyons G., 1999. Endocrine disrupting pesticides. *Pesticide News*, **46**: 16-19.

Macer C.T., 1977.Some aspects of Biology of the horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in waters around Britain. *J Fish.Biol.*, **10**:51-62.

Machreki-Ajmi M., Ketata I., Ladhar-Chaabouni R., Hamza-Chaffai A., 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Ceratoderma glaucum*. *Ecotoxicology.*, **17**:1-11.

Malmezat T., Breuille D., Capitan P., Mirand P.P and Obled C., 2000. Glutathione turnover is increased during the cute phase of sepsis in rats.*J. Nutr*; **130**:1239-1246.

Manjit Kaur and Rajat Sandhir., 2006. Comparative effects of Acute and chronic Carbofuran exposure on oxidative stress and Drug-Metabolizing enzymes in liver . Departement of biochimistry, Panjab University, Chandigarh, India. Vol **29**, No 4, Pages 415-421.

Martoja, R, Martoja, M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie éditeurs.

McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M and Yu H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental toxicology and chemistry.*, **19**: 2085-2092.

McLoughlin N., Yin D., Maltby L., Wood R.M. and Yu H.,2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environment Toxicology and Chemistry.*, **19**:2085-2092.

Merzoug S., 2005. Effet de la toxicité mercurielle chez le rat male Wistar ratus ratus: Aspect pondéral, biochimique et histologique.Université d'ANNABA. Algerie.

Morales-caselles C., Martin-Diaz M.L., Riba I., Sarasquete C., DelValls T.A., 2008. Sublethal responses in caged organisms exposed to dediments affected by oil spills. *Chemosphere.*, **72**: 819-25.

Nakamura M., Kobayashi T., Chang T., and Nagamaha Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, **281**: 362-372.

Naraharisetti S.B., Aggarwal M., Satkar S.N., Malik J.K., 2008. Concurrent subacute exposure to arsenic through drinking water and malathion via diet in male rats : effects on hepatic drug-metabolizing enzymes. *Arch toxicol.*, **82**:543-51.

Narbonne J.F.,1998. Historique-fondements biologiques de l'utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie. In « *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement* », LAGADIC L., CAQUET., AMIARD J.C., RAMADE F. (ed), tec et Doc Lavoisier, Paris, p. 1-7.

Ola-Mudathir K.F., Suru S.M., Fafunso M.A., Obioha U.E., Faremi T.Y., 2008. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.*

Orlando E.F., William P.D., Louis J.G.,2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the estern mosquitofish exposed to paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives.*, **10**: 429-433.

Osten R.J., Arana O.A., Guilhermino L, Soares AMVM 2005. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquito fish (*Gambusia yaucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* **58**: 627-636.

Ouali K., 1997. Observation de l'influence de quelques facteurs externes et internes sur les principales phases du cycle de reproduction d'un poisson téléostéen vivipare, *Gambusia affinis*. Mémoire de Magister. Université d'Annaba, Algérie.

Ozmen M., Sener S., Mete A. and Kucukbay H.,1999. *In vitro* and *in vivo* acetylcholinesterase inhibiption effect of new classes of organophosphorus compounds. *Environmental Toxicology and chemistry.*, **18**:241-246.

Park J.W., Rinchar J., Liu F., Anderson T.A., Kendall R.J., Theodorakis C.W., 2005. The thyroid endocrine disruptor perchlorate affects reproduction, growth and survival of mosquitofish. *Ecotoxicology and environmental Safety.*, (In press).

Pavlovd.D., Chuiko G.M., Gerassimo Y.V. & V.D. Tonkopi, 1992. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103C**: 563-568.

Pellerin Massicotte, J., Pelletier, E. & Pâquet, M. 1989. Cellular and biochemical indicators assessing the quality of a marine environment. *Hydrobiologia*, **188/189**:587-594

- Pellerin-Massicotte, J., B. Vincent and É. Pelletier, (1989).** *Évaluation de la qualité de l'estuaire du Saint-Laurent. Études spatiales*, Rapport de recherche, Université du Québec à Rimouski, 1989.
- Pelletier, E. and J. Pellerin-Massicotte, (1990).** Contribution au développement de sondes bioanalytiques pour évaluer la toxicité sous-létale des contaminants en milieu marin. Rapport soumis à la direction de l'environnement, Env. Canada, INRS-Océanologie.
- Pempkowiak J., Pazdro K., Kopeka J., Perez E., Sole M., 2006.** Toxicants accumulation rates and effects in *Mytilus trossulus* and *Nereis diversicolor* exposed separately or together to cadmium and PAHs. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 41: 2571-86.
- Peterson R.H., 1974.** Influence of fenitrothion on swimming velocities of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 31: 1757-1762.
- Pivincka K. & Cerny K., 1996.** Poissons : 256 illustrations en couleurs. Grund. P 303.
- Post G. & R.A. Leasure, 1974.** Sublethal effect to three salmonid species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12: 312-319.
- Quiniou F., Damiens G., Gnassia-Barelli M., Geffard A., Mouneyarc C., Budzinski H., Roméo M., 2007.** Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae., *Environ Int.*, 33:27-33.
- Ram R.N, Singh IJ, Singh DV. 2001.** Carbofuran induit une insuffisance dans l'hypothalamoneurohypophysaire complexes des gonades dans les téléostéens. *Chana punctatus* (bloch). *J environ Bio.*, 22(3) 193-200
- Rand G.M., 1977.** The effect of exposure to a subacute concentration of parathion on the general locomotor behavior of the goldfish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 259-266.
- Rao M.V., Sscharma P.S.N., 2001.** Protective effect of vitamine E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. *Reproductive Toxicology*; 15:705-712.
- Regoli F. & Principato G., 1995.** Glutathione dependent and antioxydant enzymes in mussels, *mytilus gallorovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicol.*, 3: 141-164.
- Renden-von Osten J., Ortiz-Arana A., Guirhermino L. and Soares A.M.V.M., 2005.** In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to pesticides. *Chemosphère.*, 58:627-636.
- Renden-Vonosten *et al.*, 2005
- Ritola O., Lyytikainen T., Pylkko P., Molsa H. and Pirjo Lindstrom-seppa P., 2000.** Glutathione-dependent defense system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. exposed to ozone. *Aquaculture.*, 185:219-233.
- Roche H., and Bogé G and (1996) and —;** Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by Environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.*, 41:27-43.
- Roche CHE, H. and Bogé, G. (2000) and —;** In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 125C: 345-353.
- Roche H., Buet, A., Jonot, O. & Ramade, F. (2000).** — Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), carps (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Reserve of Camargue)-Effects on some physiological parameters. *Aquat. Toxicol.*, 48 : 443-459.
- Roche H., Buet A., and Ramade F., 2003.** Mise en évidence et validation de biomarqueurs écotoxicologiques dans la population d'anguilles d'un étang de la réserve naturelle nationale de Camargue, le Vaccares exposée à des polluants organiques persistants. *Rev. Ecol.*, 58 :127-141.

- Roche, H., Dorval, J., Buet, A., Freitas, S. & Ramade, F. (2001).** — Contamination des anguilles de la Réserve Naturelle de Camargue par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et recherche de biomarqueurs. *Ichthyophysiological Acta*, 23 : 71-85.
- Roméo M., Gharbi-bouraoui S., Gnassia-Barelli M., Dellali M., Aissa P., 2006.** Responses of hexaplex (Mulex) trunculus to selected pollutants .Sci. Total Environ. 359 :135-44
- Rosa-Molinar E., Proskocil B.J., Hendricks S.E., Fritsch B., 1998.** A mechanism for anterior transposition of the anal fin and its appendicular support in the western mosquitofish, *Gambusia affinis* (Baird and girard, 1854). *Acta Anatomica.*, 163: 75-91.
- Rosety M., Rosety-Rodreguez M., Ordonez F.J., Rosety I.,2005.** Time course variations of antioxidant enzyme activities and histopathology of gilthead seabream gills exposed to malathion. *Histol Histopathol.*, 20: 1017-20.
- Rouchdia R., 2006.** effets du malathion et de cadmium sur le système antioxydant de *Gambusia affinis*
- Russo C., Rocoo L., Stingo V., Aprea G., Obierna G.,1999.** Acytogenetic analysis of *Gambusia holbrooki* (Cybrinodontiformes, Poecilidae) from the river Sarno. *Ital J Zool*, 66: 291-296.
- Saglio P., Trijasse S. & D. Azam, 1996.** Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 31: 232 -238.
- Sepencer C.C., Chlan C.A., Neigel J.E., Scribner K.T., Wooten M.C and Leberg P.L.,1999.** Polymorphic microsatellite markers in the western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Molecular Ecology.*, 8:157-168.
- Sheldon L et Meffe G. K., 1993.** Multivariate analysis of feeding relationships of fishes in blackwater streams. *Environ. Biol. Fish.* 37,2: 161-171.
- Singh R.K., Sharma B., 1998.** Carbofuran- induced Biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide Science* 53: 285-290.
- Sivignaname N., et Kalyanasundaram M., 2004.** Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stage of mosquitoes and non- target organisms. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 99 (1): 115-118.
- Soltani N., Rehim N., Beldi H., Bendali F., 1999.** Activité du triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera ; Culicidae) et impact sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 35 : 502-508.
- Sturn A., Wogram J., Segner H. and Liess M., 2000.** Differebt sensitivity to organophosphate of acetylchlinesterase and butyrylcholinesterase from three- spined stickleback (*Gasterosteus vaculeatus*): application on biomonitoring. *Environmental Toxicology and chemistry.*, 19: 1607-1617.
- Swanson C, Cech JJ. Piedrahica RH.,1996.** *Mosquitofish : Biology, culture and use in mosquito control*. University of californie pp 88.
- Thoma and Wofford H.W., 1984.** rffects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus L*) *toxicol; Appl. Pharmacol.*, 76:172-182
- Tidjani O.H.C., 1997.** Les mécanorécepteurs d'un prédateur de larves de moustiques, *Gambusia affinis*, topographie et structure. Mémoire de Magistère. Université d'Annaba.
- Tolar J.F., Mehohlin A.R., Watson R.D., Angus R.A., 2001.** Mosquitofish (*Gambusia affinis*) vitellogenin: identification, purification and immunoassay. *Comp Biochem Physiol.*, 128: 237-245.
- Travis, C.C.** Use of biomarkers in assessing health and environmental impacts of chemical pollutants. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences. New York Plenum Press, 284 pp.
- Trotler D.M., Kent R.A.,and P. Wong.,1991.** Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critic. Rev. Environ. Contr.*, 21:137-176.

Tunner C.L., 1937. Reproduction cycle and superfoetation in Poecillid fishes. *Biol. Bull.*, 72: 145-164.

Tyler C.R., Van Der Eerden B., Jobling S., Panter G., Sumpter J.P., 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *J. Comp. Physiol. B*, 166, 418-426.

Tyler C.R; Jobling S; Sumpter J.P., 1998. Endocrine disruptions in Wildlife: a critical review of evidence. *Crit Rev Toxicol*, 28: 319-361.

Van der Oost R., Beyer J. and vermuelen N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, 13:57-149.

Varo L., Navarro J.C., Amat F and Guilhermino., 2001. Characterization of cholinesterase and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.*, 48: 563-569.

Viarengo A., burlando B., cavaletto M., Marchi B., Ponzano E., Blasco J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol.*, 277:R1612-9.

Vondreck B., Wyane A.1988. Growth and reproduction of mosquitofish, *Gambusia affinis*, in relation to temperature and ration level. *ENV, BIOL.*

Wang L., Yan B., Liu N., wang Q., 2008. Effects of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*.

Weekbecker, G.and Coy, J.G., 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro *Cancer letters*, 40,257-264.

Who / IPCS., 1993. Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. IPCS, World Health Organization, Geneva.

Wo K.T., Lam P.K.S. and Wu R.S.S., 1999. A comparison of growth biomarkers for assessing sublethal effects of cadmium on marine gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Pollution Bulletin.*, 39: 165-173.

Wright R.T., Nebel B.J.,2002. Environmental Science. 8th edition, Pearson Education, new Jersey.

Yadav A., Singh R.K and Sharma B.,1998. Interaction of carbofuran with the acetylcholinesterase from the brain of the teleost, *Clarias batrachus*. *Toxicol environ chem.*, 65: 245-254.

Yao H., jiang C., Ye G., Cheng J., 2002. Insecticide resistance of different populations of white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae). *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 13:101-5.

Yu S.J and Abo-elghar G.E., 2000. Allelochemicals as Inhibitors of Glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. And Physiol.*, 68:173-183.

Yu S.J., 2002. Substrate specificity of glutathione S-transferase from the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and physiology.*, 74:41-51.

Yu S.J., 2002. Substrate specificity of glutathione-S- transferase from the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* ., 74:41-51.

Zaidi N., 2005. Effets secondaires d'un insecticide sélectif (Dimilin) sur un organisme non ciblé, *Gambusia affinis*: croissance, activités enzymatiques et analyse par CLHP des résidus. Mémoire de Magistère. Université d'ANNABA. Algérie.

Zinkl J.G., Lockhart W.L., Kenny S.A., & F.J. Ward, 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In*: Cholinesterase-Inhibiting Insecticides (Mineau P., ed.), pp. 233-254. New York: Elsevier.